

# استفاده از روش رنگ سنجی آلامار بلو جهت بررسی مقاومت چند دارویی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس

علیرضا محمدزاده<sup>۱</sup> - پریسا فرنیاز<sup>۲</sup> - طاهره راشد<sup>۳</sup> - کیارش قزوینی<sup>۴</sup> - مهدی بهدانی<sup>۵</sup> - جواد قناعت<sup>۶</sup>

## چکیده

**زمینه و هدف:** گسترش سویه های با مقاومت چند دارویی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس یک مشکل عمده در بسیاری از قسمتهای دنیا بخصوص در کشورهای با درآمد کم می باشد. استفاده از روشهای استاندارد جهت بررسی حساسیت دارویی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بسیار وقت گیر است. در این مطالعه ما از روش آلامار بلو (روش رنگ سنجی) به عنوان یک روش سریع و ارزان قیمت جهت تعیین سویه های با مقاومت چند دارویی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (مقاوم به ریفامپین و ایزونیاژید) استفاده نمودیم.

**روش تحقیق:** این مطالعه به صورت تجربی روی ۲۳ نمونه از مرکز تحقیقات ملی بیماریهای ریوی و سل بیمارستان مسیح دانشوری تهران انجام گردید. ابتدا رفتهای آنتی بیوتیکی ریفامپین و ایزونیاژید در محیط 7H9Gcbroth تهیه شد. از محلول فوق ۱/۶۵ میلی لیتر به لوله های فالکون ۱۵ میلی لیتر منتقل گردید. برای کنترل از محلول 7H9Gcbroth فاقد دارو استفاده شد. سپس ۲۵۰ میکرولیتر از مخلوط تازه تهیه شده معرف Alamar Blue به لوله های حاوی آنتی بیوتیکی و کنترل اضافه شد. در تمامی لوله های آزمایش ۰/۱ میلی لیتر از رقت باکتریایی  $10^6$  CFU/ml ( $3 \times 10^6$ ) تلقیح گردید. لوله ها در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۴ هفته انکوبه شدند.

**یافته ها:** در مقایسه با روش نسبی، ۱۱ مورد از ۱۲ مورد، توسط روش Alamar Blue به داروهای ایزونیاژید و ریفامپین حساس تشخیص داده شدند. حساسیت و اختصاصی بودن این روش برای دو داروی ایزونیاژید و ریفامپین به ترتیب ۱۰۰٪ و ۹۰٪ بود. طی این بررسی همخوانی بسیار خوبی بین روش آلامار بلو و روش نسبی دیده شد ( $\kappa$  value = 0.93,  $P < 0.001$ ). در این مطالعه نتایج طی ۶ روز حاصل گردید که این مدت زمان نسبت به روش نسبی (۲۸-۳۲ روز) بسیار کمتر است.

**نتیجه گیری:** به طور کلی می توان نتیجه گرفت که ردیابی اکسیداسیون- احیاء، ساده، قابل اعتماد و کم هزینه است که امکان نیاز به روشهای بررسی مقاومت گران قیمت بویژه در آزمایشگاه های تشخیص سل با منابع محدود را برطرف می نماید. در این مطالعه مشخص گردید که روش رنگ سنجی آلامار بلو میتواند به عنوان یک روش ساده، قابل اعتماد و سریع جهت بررسی حساسیت دارویی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بکار رود.

**کلید واژه ها:** مایکوباکتریوم توبرکلوزیس؛ مقاومت دارویی؛ آلامار بلو

افق دانش؛ مجله دانشکده علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی گناباد (دوره ۱۳؛ شماره ۳؛ پاییز سال ۱۳۸۶)

دریافت: ۱۳۸۶/۱۰/۲ اصلاح نهایی: ۱۳۸۷/۱/۳۰ پذیرش: ۱۳۸۷/۲/۲۹

۱- نویسنده مسؤول؛ کارشناس ارشد میکروب شناسی، عضو هیأت علمی دانشکده علوم پزشکی گناباد

آدرس: گناباد، دانشکده علوم پزشکی گناباد

تلفن: ۰۵۳۵-۷۲۲۳۰۲۸ - ۰۵۳۵-۷۲۲۳۸۱۴ - ۰۵۳۵ - پست الکترونیکی: alm13604@gmail.com

۲- دانشیار میکروب شناسی، مرکز تحقیقات ملی بیماریهای ریوی و سل بیمارستان مسیح دانشوری، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

۳- استاد میکروب شناسی، عضو هیأت علمی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

۴- استادیار میکروب شناسی، عضو هیأت علمی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

۵- دانشجوی Ph.D بیوتکنولوژی پزشکی، بخش پزشکی مولکولی انستیتو پاستور تهران

۶- استاد میکروب شناسی، عضو هیأت علمی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

## مقدمه

نیاز به یکسری روش‌های سریع و ارزان قیمت می‌باشد. استفاده از روش‌های استاندارد جهت بررسی حساسیت دارویی میکوباکتریوم توبرکلوزیس بسیار وقت گیر است (۴). بنابراین نیاز شدید به روش‌های سریع و قابل اعتماد جهت تعیین حساسیت دارویی می‌باشد. در این مطالعه از روش آلامار بلو (روش رنگ سنجی) به عنوان یک روش سریع و ارزان قیمت جهت تعیین سویه‌های با مقاومت چند دارویی میکوباکتریوم توبرکلوزیس (مقاوم به ریفامپین و ایزونیاژید) استفاده گردید. آلامار بلو یک اندیکاتور (معرف) اکسیداسیون - احیاء است که در حالت اکسیداسیون آبی‌رنگ بوده و پس از احیاء شدن توسط باکتری به رنگ صورتی در می‌آید. بنابراین در صورت رشد باکتری در محیط کشت مایع میدل بروک 7H9 حاوی آلامار بلو و آنتی بیوتیک رنگ محیط کشت از آبی به صورتی تغییر پیدا می‌کند که نشان دهنده مقاوم بودن باکتری به آنتی بیوتیک می‌باشد. در غیر این صورت باکتری به دارو حساس است (عدم تغییر رنگ محیط کشت). در نهایت این روش با روش نسبی (روش استاندارد بررسی حساسیت دارویی میکوباکتریوم توبرکلوزیس) مقایسه گردید.

## روش تحقیق

سویه‌های میکوباکتریوم توبرکلوزیس: این مطالعه به صورت تجربی روی ۲۳ نمونه از مرکز تحقیقات ملی بیماری‌های ریوی و سل بیمارستان مسیح دانشوری تهران انجام شد. حساسیت دارویی سویه‌ها به دو داروی ایزونیاژید و ریفامپین توسط روش نسبی قبلاً در مرکز تحقیقات ملی بیماری‌های ریوی و سل مشخص شده بود، که از این تعداد ۱۱ سویه به ریفامپین و ایزونیاژید مقاوم و ۱۲ سویه نسبت به این داروها حساس بودند.

آزمایش آلامار بلو: ابتدا رقت‌های آنتی‌بیوتیکی ریفامپین  $2 \mu\text{g/ml}$  و ایزونیاژید  $0.2 \mu\text{g/ml}$  در محیط 7H9GCbroth [۴/۷] گرم محیط پایه مایع میدل بروک 7H9، ۲۰ میلی‌لیتر گلیسرول ۱۰٪، ۱ گرم Bacto Casitone، ۸۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر، ۱۰۰ میلی‌لیتر اولتیک اسید، آلومین، دکستروز و کاتالاز (OADC) [تهیه شد. از محلول فوق  $1/65$  میلی‌لیتر به لوله‌های فالکون ۱۵ میلی‌لیتر منتقل گردید. برای کنترل رشد یا عدم رشد باکتریها از محلول 7H9GCbroth فاقد دارو استفاده شد.

سل یکی از قدیمی‌ترین بیماری‌های شناخته شده در دنیا است که در دو دهه اخیر مجدداً شایع گردیده است به طوری که حدود یک سوم جمعیت دنیا به میکوباکتریوم توبرکلوزیس آلوده هستند. اکثر موارد ابتلا به سل و مرگ و میرهای ناشی از این بیماری در کشورهای در حال توسعه دیده می‌شوند (۱). درمان عفونت‌های میکوباکتریومی، برخلاف اکثر عفونت‌های باکتریایی، پیچیده و بحث برانگیز است. به طور کلی بیماران باید چندین آنتی‌بیوتیک را برای دوره‌های طولانی (حداقل از ۶ تا ۹ ماه) دریافت نمایند، در غیر اینصورت سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک بوجود خواهند آمد (۲). درمان امروزی سل بر اساس تجویز داروهای مؤثر استوار است و به منظور پیشگیری از ایجاد موتانه‌های مقاوم به دارو حداقل به دو داروی مؤثر احتیاج می‌باشد. مهم‌ترین داروهایی که علیه میکوباکتریوم توبرکلوزیس بکار گرفته می‌شوند شامل ریفامپین، ایزونیاژید، اتامبوتول، پیرازین آمید و استرپتومایسین است (۳). مشکل عمده در برنامه‌های درمانی سل، سهل‌انگاری بیماران در مصرف دارو است. سهل‌انگاری در مصرف دارو نه تنها باعث شکست درمانی می‌گردد، بلکه باعث ایجاد ارگانیس‌های مقاوم به دارو و انتقال آنها نیز می‌شود.

گسترش سویه‌های با مقاومت چند دارویی<sup>۱</sup> میکوباکتریوم توبرکلوزیس یک مشکل عمده در بسیاری از قسمت‌های دنیا بخصوص در کشورهای با درآمد کم می‌باشد. امروزه دو روش به عنوان روش‌های استاندارد (Gold Standard) جهت بررسی تست حساسیت دارویی باسپیل سل استفاده می‌شود که عبارتند از:

۱. Proportion Method در محیط‌های LJ (لونشتاین جانسن) و میدل بروک 7H10
۲. BACTEC 460 System

این دو روش دارای معایب اساسی می‌باشند به طوری که روش نسبی (Proportion Method) نیاز به زمان زیادی دارد. (۴-۶ هفته) و روش BACTEC 460 System روش گران قیمت است. بنابراین جهت کاهش این زمان طولانی و کاهش هزینه‌ها

1- Multi-Drug Resistant (MDR)

## یافته ها

در مقایسه با روش نسبی، ۱۱ مورد از ۱۲ مورد، توسط روش Alamar Blue به داروهای ایزونیازید و ریفامپین حساس تشخیص داده شدند. در شکل ۱ حساس بودن باسیل سل به داروی ریفامپین دیده می‌شود. در مقایسه با روش نسبی، ۱۱ مورد از ۱۱ مورد، توسط روش Alamar Blue به داروهای ایزونیازید ریفامپین مقاوم تشخیص داده شدند. در شکل ۲ مقاوم بودن باسیل سل به داروی ریفامپین دیده می‌شود. حساسیت و اختصاصی بودن این روش برای دو داروی ایزونیازید و ریفامپین به ترتیب ۱۰۰٪ و ۹۰٪ بود. در این بررسی همخوانی بسیار خوبی بین روش آلامار بلو و روش نسبی دیده شد ( $\kappa$  value = 0.93,  $p < 0.001$ ). طی این مطالعه نتایج در مدت ۶ روز حاصل گردید، که این مدت نسبت به روش نسبی (۲۸-۳۲ روز) بسیار کمتر است.

سپس ۲۵۰ میکرولیتر از مخلوط تازه تهیه شده معرف Alamar Blue $\times 10$  و توئین ۸۰ ۱۰٪، با نسبت ۱ به ۱، به لوله‌های حاوی آنتی‌بیوتیکی و کنترل (فاقد آنتی‌بیوتیک) اضافه شد. در تمامی لوله‌های آزمایش ۰/۱ میلی‌لیتر از رقت باکتریایی  $10^{-1}$  ( $3 \times 10^6$  CFU/ml) تلقیح گردید. لوله‌ها در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۴ هفته انکوبه شدند و تغییر رنگ محیطها به صورت روزانه طی ۴ هفته قرائت شدند. رشد باکتری در لوله‌های حاوی دارو (تغییر رنگ آلامار بلو از آبی به صورتی) نشان دهنده مقاومت باکتری به دارو می‌باشد و در صورت عدم تغییر رنگ لوله‌ها، حساس بودن باکتری را مشخص می‌نماید. برای کنترل تغییر رنگ، از محیطهای 7H9GCbroth حاوی آنتی‌بیوتیک و فاقد آنتی‌بیوتیک و باکتری که به آنها ۲۵۰ میکرولیتر Alamar Blue اضافه شده بود استفاده گردید.



شکل ۲: تغییر رنگ آلامار بلو در محیط حاوی ریفامپین (سویه مقاوم)  
C: کنترل مثبت، C<sub>1</sub>: کنترل منفی



شکل ۱: عدم تغییر رنگ آلامار بلو در محیط حاوی ریفامپین (سویه حساس)  
C: کنترل مثبت، C<sub>1</sub>: کنترل منفی

**بحث**

به طور کلی برای تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی از روش‌های روتین و روش‌های سریع استفاده می‌شود. روش‌های روتین نیاز به زمان زیادی دارند از جمله این روشها، روش نسبی است که به صورت متداول در اکثر آزمایشگاه‌های تشخیص سل بخصوص در کشورهای در حال توسعه بکار گرفته می‌شوند.

این روش با وجود اینکه از مقبولیت بیشتری برخوردار است ولی دارای معایبی نیز می‌باشد، به طوری که بسیار وقت‌گیر و پرزحمت است، برای بررسی حساسیت دارویی توسط این روش ابتدا نیاز به کشت، جداکردن و سپس انجام حساسیت آنتی‌بیوتیکی می‌باشد. با توجه به مراحل فوق نیاز به زمان زیادی در حدود ۸ تا ۱۰ هفته دارد. از روش‌های سریع می‌توان به روش رادیومتری و روش‌های مولکولی اشاره نمود، این روشها با توجه به اینکه سریع هستند ولی نیاز به تجهیزات گران قیمت دارند، بنابراین بسیاری از آزمایشگاه‌ها، بخصوص در کشورهای فقیر یا در حال توسعه قادر به استفاده از این روش‌ها نمی‌باشند، پس بکارگیری روش‌هایی که ارزان و سریع باشند مورد نیاز می‌باشد.

فرنیا در سال ۲۰۰۳ به منظور ارزیابی زنده بودن میکوباکتریوم توبرکلوزیس در نمونه‌های خلط بیماران از آلاماربلو استفاده نمود (۵).

در سال ۱۹۹۵ یاجکو و همکاران، از ردیابی Alamar Blue در میکروپلیت به منظور تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی میکوباکتریوم توبرکلوزیس استفاده کردند. در مطالعه او همخوانی تفسیری میان ردیابی با روش نسبی تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی برای ایزونیازید و ریفامپین و اتامبوتول ۹۵٪ و برای استرپتومايسين ۹۴٪ بود (۶).

در مطالعه‌ای دیگر در سال ۲۰۰۲ Luz Caviedes جهت بررسی حساسیت دارویی باسیل سل از آزمایش میکروپلیت آلاماربلو<sup>۱</sup> استفاده نمود و نشان داد که این روش می‌تواند در طول ۶ تا ۷ روز نتایج قابل قبولی ارائه دهد (۷).

همچنین Scott در مطالعه‌ای مشابه در سال ۱۹۹۷ جهت تعیین MIC<sup>۲</sup> دارویی باسیل سل از آزمایش MABA استفاده

کرد. نتایج او برای تمام نمونه‌ها در طول ۸ روز بدست آمد. او نشان داد که همخوانی و توافق بین MIC بدست آمده توسط MABA و نتایج بدست آمده از سیستم BACTEC460 (روش استاندارد) ۸۷٪ می‌باشد که نتیجه قابل قبولی می‌باشد و می‌توان آن را به عنوان روش آسان و کم هزینه در کشورها در حال توسعه استفاده نمود (۸).

بررسی‌های ما در این مطالعه نشان داد که همخوانی و توافق میان نتایج لوله‌های کشت آلاماربلو با روش نسبی تعیین حساسیت میکوباکتریوم توبرکلوزیس برای دو داروی ایزونیازید و ریفامپین ۹۱٪ می‌باشد. میانگین مدت زمان برای این بررسی توسط آلاماربلو ۶ روز بود، در حالیکه همین زمان در روش نسبی ۳۵ روز بود ( $P > 0.01$ ). این گزارش سریع نتایج بوسیله آلاماربلو بسیار مفید است و به نظر می‌رسد که روش آلاماربلو در تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی، روش سریع و ارزان باشد.

**نتیجه گیری**

به طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که ردیابی اکسیداسیون-احیاء، ساده، قابل اعتماد و کم هزینه است که امکان نیاز به روشهای بررسی مقاومت گران قیمت بویژه در آزمایشگاه‌های تشخیص سل با منابع محدود را برطرف می‌نماید. در این مطالعه مشخص گردید که روش رنگ سنجی آلامار بلو میتواند به عنوان یک روش ساده، قابل اعتماد و سریع جهت بررسی حساسیت دارویی میکوباکتریوم توبرکلوزیس بکار رود.

**تشکر و قدردانی**

بدینوسیله مراتب سپاس و قدردانی خود را از مرکز تحقیقات ملی بیماریهای ریوی و سل بیمارستان مسیح دانشوری تهران و معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد می‌نمائیم.

1- Microplate Alamar Blue Assay (MABA)  
2- Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

منابع:

- 1- Grange J.M. Mycobacteria and human disease. Lonod; 1996.
- 2- Friedman Loyd N. Tuberculosis. Current concepts and treatment. Boca Raton, Florida: CRC press LLC; 2001: 1-106.
- 3- WHO. Global Facts about TB from “ Global Tuberculosis control: WHO Report, 2000”. <http://www.who-int/>.
- 4- WHO. Anti-tuberculosis drug resistance in the world. The WHO/IUA TLD global project on anti-tuberculosis surveillance. Geneva, Switzerland 1997.
- 5- Farnia P, et al. Bacteriological follow-up of pulmonary tuberculosis treatment: a study with a simple colorimetric assay. *Microbes and Infections* 2004; 972-976: [www.elsevier.com/locate/micinf](http://www.elsevier.com/locate/micinf).
- 6- Luz Caviedes, et al. Tetrazolium micro plate assay as a rapid and in expensive colorimetric method for determination of antibiotic susceptibility of Mycobacterium tuberculosis. *J Clin Microbial Maryland* 2002; 40(5): 1873-74.
- 7- Scott G, et al. Rapid, low – technology MIC determination with clinical Mycobacterium tuberculosis isolates by using the Micro plate Alamar Blue Assay. *J. Clin. Microbial.* 1997.
- 8- Yojko, DMJ, Made MV, Lan caster. Colorimetric method for determining of MIC of antimicrobial agent for M.tuberculosis. *J. Clin. Microbiol* 1995, 33: 2324-27.