Study of *Mycobacterium tuberculosis* resistance to first line of antibiotics used for treatment of tuberculosis

دراسة مقاومة بكتريا السل *Mycobacterium tuberculosis* لعدد من مضادات الخط الأول المستخدمة في علاج مرض السل

عفراء علي كاظم [1] د . محمد فرج المرجاني [2] د. أحمد أسمر منخي[3]
1 – بايولوجي اقدم / قسم علوم الحياة / كلية العلوم / الجامعة المستنصرية.
2 - استاذ مساعد / قسم علوم الحياة / كلية العلوم / الجامعة المستنصرية.
3 – طبيب استشاري / معهد الامراض الصدرية / بغداد

الخلاصة

تم تشخيص 208 عزلة تعود لبكتريا *Mycobacterium tuberculosis* من مجموع 685 عينة قشع وبنسبة عزل 30.3 % من المرضى الوافدين الى معهد الامراض الصدرية والتنفسية – بغداد تراوحت اعمارهم بين (4 أشهر الى 70 سنة) من كلا الجنسين .

أختبرت حساسية 134 عزلة تعود لبكتريا *Mycobacterium tuberculosis* لمضادات ريفامبيسين وأيزونيازيد و ستربتومايسين لمعرفة نسبة العزلات ذات المقاومة المتعددة للمضادات (MDR-TB) والتي تكون مقاومة لمضادات ريفامبيسين وأيزونيازيد ، اظهرت النتائج ان 20 عزله كانت مقاومه لمضاد أيزونيازيد (14.9%) وكانت 16 عزله مقاومه لمضاد ريفامبيسين (11.9%) و12 عزلة مقاومة لمضاد الستربتومايسين (8.9%) وكانت 26 عزله (19.4%) مقاومة لكلا من مضادي أيزونيازيد و ريفامبيسين وهي عزلات متعددة المقاومة للمضادات المايكروبية.

ABSTRACT

In the present study ,we diagnosied 208 isolates of *Mycobacterium tuberculosis* were collected from 685 sputum samples (30.3%) from patients coming to the center of chest and respiratory diseases – Baghdad. Aged (4 months - 70 years old) of both sex .

Sensitivity of bacterial isolates was tested to three antibacterial agent , rifampicin , isoniazid and Streptomycin to detect the Multi-Drug Resistant *Mycobacterium tuberculosis* (MDR-TB), results showed that (20) isolates were resistant to isoniazid (14.9%),16 isolates resistant to rifampicin (11.9%),12 isolates resistant to streptomycin and 26 isolates (19.4%) were resistant to both isoniazid and rifampicin (MDR-TB).

المقدمة:

تعود بكتريا *Mycobacterium tuberculosis* لعائلة *Mycobacteriaceae* (1)، ذات خلايا عصوية الشكل مستقيمة أو منحنية قليلا بطول 1.5-3.5 مايكرومتر ، وعرض 0.2-0.5 مايكرومتر تنتظم في حزم صغيرة أو عصيات متوازية غير متحركة غير مكونة للسبورات ولاتحتوي محفظة (2). تمتلك جداراً خلوياً يمثل الهيكل الرئيسي لضراوة هذه البكتريا ويتكون بالاساس من مادة Peptidoglycan يحوي دهون معقدة تشكل اكثر من 60% من الجدار (3). تم تقدير عدد المصابين بمرض التدرن عام 2007 بنحو (13,700,000) شخص وان معدل الاصابة السنوية تصل الى (363) شخص لكل (100,000) شخص في افريقيا (4). يحتل العراق المرتبة 17 بين 22 بلداً في اقليم الشرق الاوسط وفقاً لمعدلات حدوث جميع آشكال السل (5).

هنالك عدد من الادوية المؤثرة في هذه البكتيريا من اهمها حسب توصيات منظمة الصحة العالمية : Rifampicin و Pyrazinamide و Streptomycin و Ethambutol و Isoniazid وتوصف العزلات المقاومة لمضادي Isoniazid و Rifampicinبانها ذات المقاومة المتعددة للمضادات (MDR-TB) (6). يعد الريفامبسين قاتلا لبكتريا السل وهو غير سام نسبيا سرعان ما يمتص من القناة الهضمية ويفرز في الادرار والدموع والعرق وسوائل الجسم الباقية اذ يصبغها باللون البرتقالي (7). ومن مضادات التدرن المثالية هو Isoniazid وهو قاتل للجراثيم غير سام نسبيا وقليل الكلفة ذو فعالية ضد بكتريا التدرن ويكون أمتصاصه جيد من الجهاز الهضمي ثم يتضاءل في الدم بعد تناوله من 1-2 ساعة (8).

تعد عزلات بكتريا التدرن على انها ذات مقاومة متعددة للمضادات عندما تقاوم مضادي الريفامبسين والايزونيازيد اللذين يعدان من المضادات الفعالة من بين مضادات الخط الاول المضادة للسل (9)، تصنف مقاومة بكتريا السل للمضادات الأكثر استعمالا الى مقاومة اولية واخرى مكتسبة ، وتعد المقاومة المكتسبة هي الاكثر انتشارا في البلدان النامية وهي المقاومة الموجودة لدى المريض الذي تكون فيه العصيات حساسة مسبقا للمضادات (10).

يعود سبب تطور المقاومة للادوية في بكتريا السل الى وصف العلاجات غير المناسبة للمريض أو بسبب عدم اكمال الدورة العلاجية من قبل المريض عند احساسه بالشفاء او لتناوله الادوية بشكل متقطع (11).
نظرا لانتشار مرض التدرن وظهور سلالات من بكتيريا السل مقاومة للادوية جاءت هذه الدراسة لتهدف الى تحديد العزلات ذات المقاومة المتعددة للمضادات التي توصف بMDR TB ومعرفة مدى انتشار مقاومة العزلات المحلية لبكتريا السل للريفامبيسين وآيزونيازيد .

طرائق العمل :

1 – زرع العينات وتشخيص البكتريا:-

جمعت 685 عينة قشع من المرضى الوافدين الى مركز الامراض الصدرية والتنفسية – بغداد تراوحت اعمارهم بين 4 أشهر الى 71 سنة من كلا الجنسين للفترة من 2011/7/3 الى 2012/1/1 .
زرعت العينات الموجبة للفحص المباشر بصبغة Ziehl-neelsen على وسط Lowenstein-Jensen(L.J) agar اعتماداً على طريقة Petroff decontamination حسب دليل العمل المختبري(12) . شخصت العزلات اعتماداً على الصفات المظهرية والكيموحيوية**(13).**

2 – اختبار حساسية العزلات البكتيريه لمضادات الخط الآول ضد التدرن :-

اعتمدت طريقة Proportion method لفحص الحساسية حسب دليل العمل المختبري (12) وكالاتي **:-**

- تحضير المحلول الخزين للمضادات البكتيريه :-

*** الايزوينازيد:**

اخذ (5) مل من محلول محضر باذابة (10) ملغم من المضاد في (10) مل من ماء مقطر معقم واضيف الى (45) مل ماء مقطر معقم ، اخذ (5) مل من المحلول الاخير الى (45) مل من الماء المقطر المعقم وبعد ترشيحه نقل (5) مل الى (245) مل من وسط Lowenstein-Jensen(L.J) agar ليكون تركيزه النهائي (0.2) مايكروغرام/مل.

*** الريفامبيسين:**

أذيب (21) ملغم من المضاد في (5) مل آثيلين جيليكول في حمام مائي عند درجة حرارة (70) م^0 ، وبعد ذوبانه أضيف له (15) مل ماء مقطر معقم ثم رشح ، بعدها أخذ (5) مل من المحلول المرشح باوراق ترشيح ذات اقطار بقطر 0.22 مايكروميتر ونقل الى (200) مل من وسط Lowenstein-Jensen(L.J) agar ليكـــون تركيزه النهائي (40) مايكروغرام/مل.

*** الستربتومايسين:**

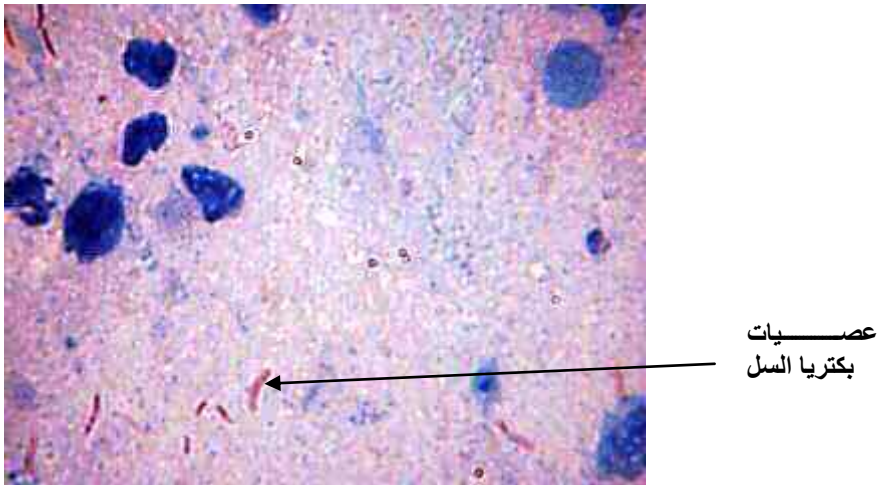
اخذ (2) مل من محلول محضر باذابة (5) ملغم من المضاد في (5) مل من ماء مقطر معقم واضيف الى (8) مل ماء مقطر معقم ، اخذ (5) مل من المحلول الاخير الى (245) مل من وسط Lowenstein-Jensen(L.J) agar ليكون تركيزه النهائي (4) مايكروغرام/مل.

2 - تحضير العالق البكتيري :-

حُضر العالق البكتيري مـــن مزروع حديـــث للبكتريا بعد ظهور النمو على الوسط الصلب (بعد الزرع ب6-8 اسابيع) واجريت لـــه تخافيـف ثم اخـذ من التخافيف (10^{-1} و 10^{-3} و 10^{-5}) خلية/ مل للزرع على الوسط الزرعي الحاوي مضاد الريفامبيسين والوسط الزرعي الحاوي مضاد ايزونيازيد المحضر في الفقرة واحد اعلاه . زرعت ايضا اوساط زرعية غير محتويه على المضاد للسيطرة و بعد الحضن بدرجة 37 م لمدة 6-8 اسابيع لوحظ وجود النمو من عدمه وحسب ما ذكر في (12).

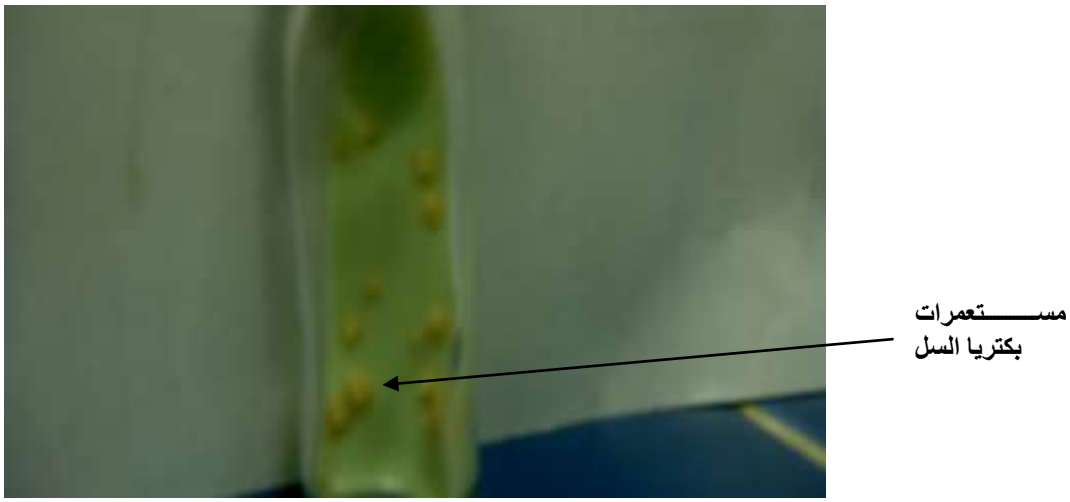
النتائج والمناقشة:-

تم تشخيص 208 عزلة تعود لبكتريا *M.tuberculosis* من 685 نموذج قشع (Sputum) وبنسبة عزل 30.3 % من المرضى الوافدين الى معهد الامراض الصدرية والتنفسية في بغداد باستعمال صبغة Acid Fast Stain والزرع على وسط Lowenstein-Jensen(L.J) agar ،تختلف نسبة العزل مع ما وجده (14) الذي وجد نسبة العزل 70% في دراسته عن بكتريا السل. ظهرت خلايا بكتريا *M.tuberculosis* بشكل عصيات رفيعة ذات لون احمر او وردي مع خلفية زرقاء وتكون على شكل حزم او مجاميع (شكل 1) .



شكل (1) عصيات بكتريا *M.tuberculosis* في نموذج قشع مصبوغ بصبغة Ziehl-neelsen

ظهرت مستعمرات هذه البكتريا خشنة السطح كريمية اللون متعرجة على وسط (L.J) وقد نمت المستعمرات بعد (6-8) اسابيع (شكل 2).



شكل (2) مستعمرات بكتريا *M.tuberculosis* على وسط Lowenstein-Jensen(L.J) agar

تم اختبار حساسية (134) عزلة تعود لبكتريا *M.tuberculosis* لمضادي الريفامبيسين والايزونيازيد والستربتومايسين باستعمال الوسط الزرعي مضاف له المضاد فضلاً عن وسطين زرعيين خاليين من المضاد للسيطرة , في حالة حساسية العزلة البكتيريه للمضاد لايظهر نمو بكتيري على الوسط الزرعي اما في حالة مقاومة العزلة للمضاد فيظهر نمو بكتيري على الوسط الزرعي .

اظهرت النتائج ان (20) عزلة كانت مقاومة لمضاد Isoniazed من مجموع (134) عزلة مختبره وبنسبة (14.9%) وكانت (16) عزلة مقاومة لمضاد الريفامبيسين بنسبة (11.9%) و 12 عزلة مقاومة لمضاد الستربتومايسين (8.9%).

من جانب اخر كانت هناك (26) عزلة (19.4%) مقاومة لمضادي Isoniazed وRifampicin وهي العزلات التي توصف بانها ذات المقاومة المتعددة للمضادات (MDR-TB) (جدول -1).

جدول 1: أعداد و نسب المقاومة التي أبدتها عزلات بكتريا السل تجاه المضادات المستعملة

المضاد المستعمل	عدد العزلات المقاومة	النسبة المئوية للمقاومة %
Isoniazed	20	14.9
Rifampicin	16	11.9
streptomycin	12	8.9
MDR-TB	26	19.4

يعود سبب مقاومة بكتريا السل لمضاد الريفامبيسين الى الاستخدام الشائع لهذا المضاد في معالجة الامراض المختلفة غير مرض التدرن فضلاً عن الطفرات في الوحده الفرعية بيتا (β) للانزيم الهدف وهو المسؤول عن فقدان حساسية البكتريا لهذا المضاد (15) .

كانت نتيجة مقاومة عزلات الدراسة لمضاد الريفامبيسين قليلة مقارنة لما توصل له ناصر(16) الذي وجد نسبة المقاومه لهذا المضاد (25.7%) بينما لم تتفق تماماً مع ما وجده الكريمي (17) و Jun وجماعته (18) الذين سجلوا مقاومة عالية لهذا المضاد بلغت (67.4%) و (100%) على التوالي.

من جانب اخر كانت نسبة المقاومه للايزونيازيد (14.9%) بين العزلات المحلية قيد الدراسة وهي ايضا قليلة عما وجده (17) و (18) , الذين سجلوا مقاومة عالية لهذا المضاد بلغت (45%) و (89%) على التوالي. تعود مقاومة بكتريا السل لمضـــاد الايزونيازيد الى الطفرات الحاصلــة في جين G *kat* (19).

ان ظهور سلالات من بكتريا السل مقاومة لمضادي ايزونيازيد وريفامبيسين يشكل تهديداً مميتاً لحياة المريض اذ توصف هذه العزلات بكونها متعددة المقاومة للمضادات , وبحسب إحصائيات منظمة الصحة العالمية في عام 2008 فإن نصف مليون حالة تدرن مقاوم للأدوية تحدث سنوياً في افريقيا وبمعدل اعلى في اوربا الشرقية ، وقد وضعت استراتيجية برنامج العلاج القصير الامد تحت الاشراف المباشر لايقاف التدرن في الدول الغنية والفقيرة على حد سواء وهي الطريقة الوحيدة والفعالة لخفض معدلات الوفيات والحد من انتشار التدرن في ارجاء العالم لمنع ظهور مقاومة بكتريا التدرن للمضادات الحيوية المتعددة (20).

ان العلاج الكيمياوي المستعمل في علاج مرض التدرن يختلف كثيرا عن غيره من حالات الالتهابات الرئوية ويعود السبب في ذلك الى بطء انقسام الخلية وقدرتها على السكون وكذلك انخفاض نشاطها الايضي مما يجعل من الصعوبة استهدافها من قبل المضاد ، كما ان وجودها داخل التجاويف يجعل من الصعوبة وصول المضادات اليها فضلا عن انخفاض الرقم الهيدروجيني مما يعمل على كبح نشاط معظم المضادات الحيوية(21).

المصادر

1 – Ryan ,K.J. and Ray , C.G.(2004). Sherni ' s Medical Microbiology (4th ed) .McGraw Hill.P.396-401.

2 – Todar , K.(2009) . *Mycobacterium tuberculosis* and Tuberculosis Todar's online textbook of Bacteriology . Univ. of Wisconsin Madison, Dept. of Bacteriology . P.4.

3 – Bhamidi , S.(2009) . Mycobacterial cell wall arabinogalactan . Bacterial Polysaccharides . Current innovations & Future Trends . Caister Academic Press.

4 – WHO (2007) . Tuberculosis , Fact sheet No . 104 .

5)NTP (2008).Overview of national Tuberculosis Control Program .Vision goals and stop TB strategy Burden of tuberculosis in Iraq.

6- WHO (2004) . TB/HIV , a clinical Manual , 2nd ed . Geneva .

7 – Charity, J.C.,Katz , E . and Moss , B . (2007) . Amino acid substitutions at multiple sites within the Vaccina Virus D13 scaffold Protein Confer resistance to rifampicin Virology 359 (1) : 227-32 .

8 – Hans , L.R.(2009) . Fourth – generation Fluoroquinolones in tuberculosis . Lancet 373 (9670) : 1148-1149 .

9)WHO,2008. Drug resistant Tuberculosis.Report.no.3.

10)Maryann,M.P.;Anne,L.D.;Neil,W.and Willian,N.R.(1996).Outcome of MDR TB Patients.1983-1993.Prolonged survival with appropriate therapy .Amj.Resp.Crit.Core.Med.153:317-24.

11 – Centers for Disease Control & Prevention , CDC. (2010) . Diagnosis of Tuberculosis Disease .

12 – منخي ، احمد اسمر (2009). دليل العمل المختبري لبرنامج التدرن في العراق . بغداد

13- Goldman,E. and Green,L.H. (2009). Practical Handbook of Microbiology. 2nd ed. CRC Press, Taylor & Francis Group.

14) حسن ،ضرغام حميد(2007).تقييم التقنيات المعتمدة على العاثي الجرثومي للتشخيص السريع واختبار الحساسية للمضادات الحيوية لمرضى التدرن الرئوي بالمقارنة مع طرق التشخيص التقليدية .رسالة ماجستير ، كلية التقنيات الصحية والطبية.

15 – Herrea , L.;Jimenez,s.;Valverde , A.;Garci Aranda , M.A. and Saez – Nieto,J.A.(2003) . Molecular analysis of rifampicin resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolated in (1996-2001) . Description J.Antimicrobial . Agents 21:403-408 .

16 – ناصر، عصام جمعة (2006) . استخدام التقنيات المتطورة (BACTEC MAGIT965 وتفاعل سلسلة البوليميريز) في عزل, تشخيص , واختبار الحساسية للمضادات الحيويه للبكتريا الفطرية, رسالة ماجستير,كلية التقنيات الصحية والطبية.

17 – الكريمي , خالدة كريم (2008) . دراسة وبائية لمقاومة عصيات بكتريا السل لمضادات الميكروبات وتأثير ثنائي الاستيل. رسالة ماجستير , جامعة بغداد , كلية الطب .

18 – Jun,I.S.;Zofia,Z.F.K.; Emiko,T.;Intetsu,K.;Koji,M.; Koichiro,K.;Seiya,K.; Tadatoshi ,k.; Toru,M.and Teruo,K.(2007) .Detection of Multidrug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* .J.Clin-Micro 45(1) : 179-192 .

19 – Slayden ,R.A.and Barry,C.E.(2000) .The genetics and biochemistry of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Microbes . Infect.2:659-669.

20 –Sterling,T.R.;Lehman,H.P. and Frieden,T.R. (2003).Impact of DOTs compared with DOTs –Plus on multidrug resistant tuberculosis and tuberculosis death decision analysis.BMJ,326(7389):574.

21-Mckinney,J.D.;Honer,Z.K.;Munor,E.J.;Chan,W.T;Jacob,W.R. an Russel,D.G.(2000) Persistance of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophage and mice requires the glyoxylate isocitrate .Nature.406:735-738.