

Determining the Drug Susceptibility of Mycobacterium Tuberculosis Strains to the Pyrazinamide

Seyyed Reza Moaddab¹, Keivan Amini², Behzad Kazemi Haki^{3*}

¹Tuberculosis and Lung Disease Research Center, School of Paramedical, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

²School of Medicine, Student Research Committee, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

³Department of Anesthesiology, School of Paramedical, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

Received: 4 Feb, 2015 Accepted: 11 Apr, 2015

Abstract

Background and Objectives: Pyrazinamide (PZA) is an important first anti tuberculosis medication and PZA resistance can be affect the successful tuberculosis (TB) control program. The aim of this study was to determine the PZA resistance among Mycobacterium tuberculosis (MTB) isolated strains.

Materials and Methods: These strains were isolated from foreigners and Iranian patients. 100 MTB strains collected at the research center for TB and Pulmonary diseases in Tabriz and for detections of PZA 7H10 agar medium by proportion method was used.

Results: Out of 100 MTB strains, 60 isolated strains were resistant to at least one of the main drugs (isoniazid, rifampin, streptomycin, ehambuthol) and 40 isolated strains were susceptible to all of these drugs. One strain (2.5%) from 40 susceptible and 22 strains (36%) from 60 MTB resistant strains was found to be resistant to PZA. Out of 21 MDR (Multi Drug Resistant) strains, 11 isolates were resistant to PZA (57%) The most of the PZA resistant strains were isolated from the foreigner patients (72%).

Conclusion: The rate of PZA resistance among East Azerbaijan province patients is low and the sensitivity test of this drug is not necessary as a routine method for MTB susceptible strains.

Keywords: Mycobacterium tuberculosis, resistance, Pyrazinamide

*Corresponding author:

E-mail: behzad_empt@yahoo.com

تعیین حساسیت دارویی سویه های مایکو باکتریوم توبرکلوزیس نسبت به پیرازینامید

سید رضا مودب^۱، کیوان امینی^۲، بهزاد کاظمی حکمی^{۳*}

^۱ مرکز تحقیقات سل و بیماریهای ریوی تبریز، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران.
^۲ دانشکده پزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران.
^۳ گروه هوشبری، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران.

دریافت: ۹۳/۱۱/۱۵ پذیرش: ۹۴/۱/۲۲

چکیده

زمینه و اهداف: (Pyrazinamide, PZA) یکی از داروهای مهم رده اول ضد سل می باشد و بروز مقاومت به آن می تواند به برنامه کنترل بیماری سل تأثیر بگذارد. هدف از این تحقیق بررسی میزان مقاومت به PZA میان سویه های (*Mycobacterium tuberculosis*, MTB) بود.
مواد و روش ها: سویه های MTB از بیماران ایرانی و خارجی جدا شده بودند که به مرکز تحقیقات سل و بیماریهای ریوی تبریز ارجاع داده شده بودند. تعداد ۱۰۰ سویه MTB برای تعیین مقاومت دارویی به PZA با روش نسبی در محیط 7H10 مورد مطالعه قرار گرفتند.
یافته ها: از تعداد ۱۰۰ سویه MTB، تعداد ۶۰ سویه حداقل به یکی از داروهای اصلی (ایزونیازید، ریفامپین، اتامبوتل، استرپتوماکسین) مقاوم بودند. تعداد ۴۰ سویه به تمامی داروهای مذکور حساس تشخیص داده شده بودند.
 براساس نتیجه حاصل از این مطالعه، صرفاً یک مورد از ۴۰ سویه MTB حساس به داروهای اصلی به PZA مقاوم بود (۵۲٪) و تعداد ۲۲ سویه از ۶۰ سویه مقاوم به داروهای اصلی MTB به PZA نیز مقاوم تشخیص داده شدند (۳۶٪). از تعداد ۲۱ سویه MTB مقاوم به چند دارو (Multi Drug Resistant, MDR) تعداد ۱۲ مورد (۵۷٪) مقاوم به PZA بودند. اغلب سویه های مقاوم به PZA از بیماران خارجی جدا شدند (۷۲٪).
نتیجه گیری: میزان مقاومت به PZA در میان بیماران آذربایجان شرقی پایین می باشد و آزمایش تعیین حساسیت دارویی با این دارو بعنوان روش روتین در سویه های حساس توصیه نمی شود.

کلید واژه ها: مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، مقاومت، پیرازینامید

* ایمیل نویسنده ربط: behzad_emt@yahoo.com

مقدمه

به فرم فعال، اسید پیرازینوئیک تبدیل می شود، این دارو در شرایط اسیدی بر روی مایکوباکتریوم ها در داخل سلول و باسیل های نیمه خفته بسیار موثر می باشد (۵-۱). سویه های عامل سل مقاوم به دارو، که موجب نگرانی جهانی شده اند، سویه های هستند که به دو داروی اصل یعنی ایزونیازید و ریفامپین همزمان مقاومت نشان می دهند که این سویه ها، به سویه های (MDR Multi Drug Resistant) سویه هایی با مقاومت چند دارویی مشهور هستند (۱). سویه های MDR به معضل جهانی تبدیل شده اند به طوری که در سال ۲۰۰۸ وجود ۳۹۰۰۰۰ الی ۵۱۰۰۰۰ سل MDR در جهان گزارش شد و همچنین تخمین زده می شود که در جهان از بین سویه های ایجادکننده بیماری سل، حدود ۳.۶٪ موارد شامل سویه های MDR می شوند (۱). سویه های MDR در کشورهای پیشرفته، در حال توسعه و عقب مانده بطور کلی به یک معضل بین

(Pyrazinamide, PZA) در سال ۱۹۵۲ در نتیجه ادامه تحقیقات اثرات ضد سل نیکوتینامید (ماده اولیه ویتامین B3) سنتز شد. البته قبلاً اسید پیرازینوئیک (Pyrozinic acid) متابولیت فعال PZA، مجوز تولید دریافت کرده بود. PZA صرفاً روی گونه های مایکوباکتریایی موثر است ولی مایکوباکتریوم بویس به آن مقاومت ذاتی دارد. علیرغم مشخص بودن اثر باکتریوسیدال آن یا مورد استفاده قرار نمی گرفت و یا صرفاً در موارد شکست درمان، مورد استفاده قرار می گرفت ولیکن، مطالعات گسترده نشان داد که این دارو می تواند یکی از داروهای موثر در کاهش مدت درمان سل باشد. بطوریکه بعد از بکار گرفتن آن مدت درمان استاندارد سل از ۹ ماه به ۶ ماه کاهش یافت. و در هر حال حاضر با ایزونیازید و ریفامپین بعنوان داروهای اصلی ضد سل بکار میروند. PZA یک پیش دارو می باشد که توسط باسیل سل توسط آنزیم پیرازینامیداز

شیشه ای سوسپانسیون میکروبی آماده گردید. رقت یک مک فارلند آماده گردید. سپس از این سوسپانسیون اصلی رقت های یک صدم و یک صد هزارم لازم طبق روش استاندارد نسبی، در محیط های کشت تلقیح گردید. قرائت نتایج بعد از ۲۸ الی ۴۲ روز با توجه به رشد باکتری روی محیط کشت شاهد بدون آنتی بیوتیک و محیط آنتی بیوتیک دار بررسی گردید. با استفاده از فرمول ($100 \times$ تعداد کلنی در محیط شاهد / تعداد کلنی در محیط کشت آنتی بیوتیک دار) درصد مقاومت محاسبه گردید. موارد برابر یا بیش از ۱٪ مقاوم تشخیص داده شد (۱،۷). بعنوان کنترل کیفی از سویه استاندارد H37RV حساس به تمامی آنتی بیوتیک ها استفاده شد. از آمار توصیفی برای تجزیه و تحلیل داده ها که شامل فراوانی و درصد می باشد استفاده گردید.

نتایج

از مجموع تعداد ۱۰۰ سویه MTB تعداد ۳۶ سویه های در سال ۸۹-۱۳۸۸ و تعداد ۶۴ سویه در سال ۹۱-۱۳۹۰ جدا شده بودند. از مجموع این سویه ها، تعداد ۲۳ سویه از بیماران ایرانی استان آذربایجان شرقی، تعداد ۴۹ مورد از بیماران خارج از استان آذربایجان شرقی و تعداد ۲۸ مورد از بیماران غیر ایرانی مراجعه کننده به مرکز تحقیقات سل و بیماریهای ریوی یا بیماران خارجی مراجعه کننده به سایر استان ها بودند. تمامی بیماران مبتلا به سل ریوی بودند. از این تعداد ۱۰۰ سویه که از ۱۰۰ بیمار جدا شده بود تعداد ۶۱٪ از مردان و تعداد ۳۹٪ سویه از زنان جدا شده بود. اطلاعات کافی در مورد سن بیماران حاصل نشده است. آنتی بیوگرام این سویه ها قبلاً نسبت به داروهای اصلی ایزونیاژید، ریفامپین، اتاموتل و استرپتوماکسین در محیط لوانشتاین جانسون با روش نسبی انجام گرفته بود و مقاوم بودن این سویه ها به این داروها مشخص گردیده بوده، نحوه انتخاب این سویه ها با توجه به تعداد کافی کلنی در محیط کشت بوده است. از مجموع ۱۰۰ سویه MTB تعداد ۴۰ سویه به تمامی داروهای اصلی یعنی ایزونیاژید، ریفامپین، اتاموتل و استرپتوماکسین حساس و تعداد ۶۰ سویه حداقل به یکی از این داروها مقاوم تشخیص داده شده بودند. تعداد سویه هایی که به یک، دو، سه، چهار دارو مقاوم بودند با تفکیک نوع مقاومت در جدول ۱ نشان داده شده است. مقاومت نسبت به PZA در مجموع ۱۸٪ بوده است و مقاومت تکی به این دارو فقط یک سویه (۲/۵٪) مشاهده گردید. با توجه به جدول (۱)، در مجموع ۱۰۰ سویه MTB نسبت به داروهای اصلی ضد سل یعنی ایزونیاژید، ریفامپین، اتاموتل و استرپتوماکسین تعیین حساسیت دارویی شده بودند. از سویه هایی که به این دارو ها بصورت تکی مقاوم بودند، سویه مقاوم به اتاموتل به PZA حساس بود. در سایر سویه ها از هر کدام یک مورد مقاوم به PZA وجود داشت. سویه مقاوم به ایزونیاژید و ریفامپین به PZA هم مقاوم بود. تنها سویه مقاوم به ایزونیاژید و اتاموتل حساس به PZA بود. از ۵ سویه مقاوم به ایزونیاژید و استرپتوماکسین یک سویه به PZA مقاوم بود. سویه مقاوم به اتاموتل و استرپتوماکسین به PZA نیز مقاوم تشخیص داده شد. تعداد ۱۲ سویه MDR مقاوم

المللی تبدیل شده اند. بنابراین تشخیص حساسیت سویه های (*Mycobacterium tuberculosis*, MTB) نسبت به PZA از اهمیت خاص تشخیصی برخوردار شده است (۱،۲). از آنجائیکه PZA حداکثر تأثیر خود را در شرایط اسیدی اعمال می کند و در شرایط آزمایشگاهی سنجش حساسیت باسیل سل به این دارو را با مشکل روبرو می نماید، لذا اغلب مراکز از انجام آزمایشهای تعیین حساسیت دارویی نسبت به PZA خودداری می نمایند و به همین علت بیشتر گزارش های حساسیت دارویی شامل چهار داروی اصلی یعنی ایزونیاژید، ریفامپین، اتاموتل و استرپتوماکسین می شود (۷-۱). نظر به اینکه مطالعات و بررسی های متعددی در مرکز تحقیقات سل و بیماریهای ریوی تبریز در مورد داروهای اصلی انجام گرفته است ولی تاکنون امکان آنتی بیوگرام به PZA فراهم نشده بود، لذا در قالب طرح تحقیقاتی، تصمیم به انجام تعیین حساسیت دارویی سویه های ایزوله شده MTB نسبت به PZA گرفته شد.

مواد و روش ها

این مطالعه توصیفی- مقطعی در طی سال های ۱۳۸۸ الی ۱۳۹۱، بر روی سویه های MTB ایزوله شده از بیماران بین سال های ۱۳۸۸ تا سال های ۱۳۹۱ که امکان آنتی بیوگرام بر روی آنها با توجه به تعداد کافی کلنی سویه در روی محیط کشت اولیه بود، انجام گرفته است. سویه ها از بیماران ایرانی آذربایجان شرقی، خارج از استان آذربایجان شرقی و همچنین از بیماران خارجی مراجعه کننده به مراکز مبارزه با سل استان آذربایجان شرقی و خارج از استان آذربایجان شرقی جدا شده بودند. تعداد ۴۰ سویه مقاوم به داروهای رده اول با روش نمونه گیری آسان و در دسترس و تعداد ۶۰ سویه بصورت نمونه گیری تصادفی انجام گرفت. روش مورد استفاده روش نسبی (Proportion) با استفاده از محیط کشت H10 Agar بوده است. بدین منظور ابتدا ۱۰/۵ گرم از پودر آماده H10 ۷، به ۴۵۰ میلی لیتر آب اضافه شد و سپس مقدار ۳/۳ گرم مونو پتاسیم فسفات ۰/۵ گرم کازئین هیدرولیز^{CC} ۲/۵ گلیسرول به آن اضافه گردید و محلول فوق الذکر در اتوکلاو استریل شد. سپس با سرد شدن محلول آماده شده به دمای ۵۴ درجه سانتیگراد، به آن محلول OADC (Oleic Acid, Albumin, Dextrose, Catalase) اضافه گردید و در ظروف مک کارتنی بلافاصله پخش شد. به منظور آماده کردن محیط کشت آنتی بیوتیک دار از محلول PZA، ابتدا از پودر آنتی بیوتیک به مقدار ۱۰۰ میلی گرم برداشت شد و در ۱۰^{CC} آب مقطر حل گردید. محلول آنتی بیوتیک قبل از مصرف با استفاده از فیلتر غشایی ۰/۲۲ میکرون استریل شده بود. سپس از این محلول اصلی که دارای غلظت PZA، ۱۰۰۰۰ μg/ml می باشد مقدار ۲/۵^{CC} به ارلن مایر حاوی مقدار ۲۴۷/۵^{CC} محیط کشت H10 ۷ اضافه گردید. که در نهایت مقدار دارو در محیط کشت برای آنتی بیوگرام ۱۰۰ μg/ml بود. برای تهیه سوسپانسیون باکتری از سویه های مورد بررسی از تعداد ۱۰۰ سویه قابل آنتی بیوگرام که به مقدار کافی کلنی داشتند، تعداد حداقل ۱۰-۸ کلنی برداشت کرده به لوله حاوی محیط کشت 7H9 انتقال داده شد و با استفاده از پرل

۲۱ سویه MDR تعداد ۱۲ سویه به PZA مقاوم بودند که از این تعداد ۹ مورد از بیماران خارجی جدا شده بود. از بیماران استان آذربایجان شرقی سویه مقاوم به PZA جدا نشد. از ۳ سویه مقاوم به یک داروی اصلی مقاوم به PZA، یک مورد از بیماران ایرانی در خارج از استان آذربایجان شرقی و ۲ سویه از بیماران خارجی جدا شده بود. از تعداد ۲ سویه مقاوم به دو داروی اصلی غیر MDR که به PZA هم مقاوم بود، یک مورد از بیماران خارجی و یک مورد از بیماران ایرانی جدا شده بود. یک سویه مقاوم به ۳ داروی اصلی غیر MDR از بیماران خارجی در استان آذربایجان شرقی جدا شده بود (جدول ۳) با توجه به جدول ۳ میزان مقاومت به PZA در بیماران خارجی بطور معنی داری (۰/۰۰۵ < P) بیشتر از بیماران ایرانی بوده است. از ۱۸ مورد مقاوم به PZA تعداد ۱۳ سویه از بیماران خارجی جدا شده بود (۰/۷۲).

به ایزونیازید، ریفامپین و استرپتومايسين، ۹ سویه به PZA مقاوم بودند. یک سویه مقاوم به سه دارو یعنی ریفامپین، اتامبوتول و استرپتومايسين، حساس به پیرازینامید بود. از تعداد ۸ سویه مقاوم به چهار دارو، دو سویه به PZA مقاوم بودند. از تعداد ۴۰ سویه حساس به تمامی داروهای رده اول اصلی صرفاً یک مورد (۲/۵٪) مقاوم به PZA بود. با توجه به جدول ۲، از تعداد ۱۰۰ سویه مورد آزمایش تعداد ۲۱ مورد MDR بودند و از این تعداد ۱۲ مورد یعنی (۵۷٪) به PZA مقاوم تشخیص داده شدند. تعداد سویه هایی که به یک دارو مقاوم بودند، ۳۱ سویه بود که از این تعداد ۳ مورد یعنی (۹٪) به PZA مقاوم بودند. از تعداد ۷ سویه مقاوم به دو داروی غیر MDR تعداد ۳ سویه به PZA مقاوم بودند (۳٪). از سویه های مقاوم غیر MDR به سه دارو، سویه ای که به PZA مقاوم باشد مشاهده نشد. با توجه به جدول های ۲ و ۳ از تعداد

جدول ۱: انواع مقاومت تعداد ۱۰۰ سویه MTB به داروهای اصلی و تعداد سویه های مقاوم نسبت به PZA

تعداد سویه های مقاوم به PZA	تعداد (%)	نوع مقاومت دارویی به داروهای اصلی
۱	۴ (۰/۴)	ایزونیازید
۱	۵ (۰/۵)	ریفامپین
-	۱ (۰/۱)	اتامبوتول
۱	۲۱ (۰/۲۱)	استرپتومايسين
۱	۱ (۰/۱)	ایزونیازید و ریفامپین (MDR)
-	۱ (۰/۱)	ایزونیازید و اتامبوتول
۱	۵ (۰/۵)	ایزونیازید و استرپتومايسين
۱	۱ (۰/۱)	اتامبوتول و استرپتومايسين
۹	۱۲ (۰/۱۲)	ایزونیازید+ریفامپین + استرپتومايسين (MDR)
-	۱ (۰/۱)	ریفامپین + اتامبوتول + استرپتومايسين
۲	۸ (۰/۸)	ایزونیازید+ریفامپین+اتامبوتول + استرپتومايسين (MDR)
۱	۴۰ (۰/۴۰)	حساس به تمامی داروهای اصلی ضد سل

MDR: سویه هایی هستند که حداقل به ایزونیازید+ریفامپین مقاوم می باشند. PZA: Pyrazinamide

جدول ۲: تعداد و درصد مقاومت به PZA در سویه های MDR و غیر MDR و مقاوم به یک دارو اصلی.

تعداد سویه های مقاوم به PZA (% مقاومت)	تعداد	نوع مقاومت به داروهای اصلی
۱۱ (۵۲٪)	۲۱	سویه های MDR
۳ (۹٪)	۳۱	سویه های مقاوم به یک داروی اصلی
۳ (۴۳٪)	۷	سویه های مقاوم به دو داروی اصلی (غیر MDR)
- (-٪)	۱	سویه های مقاوم به سه داروی اصلی (غیر MDR)
۱ (۲۵٪)	۴۰	حساس به تمامی داروهای رده اول

MDR: سویه های هستند که حداقل به ایزونیازید+ریفامپین مقاوم می باشند. PZA: Pyrazinamide

جدول ۳: تعداد سویه های مقاوم به PZA با توجه به نوع مقاومت آنها نسبت به داروهای اصلی، ملیت و استان بیمار مبتلا

تعداد سویه های مقاوم به PZA با توجه به ملیت و منطقه جدا شده سویه بیمار				تعداد	نوع مقاومت به داروهای اصلی در سویه های مقاوم به PZA
بیمار ایرانی در:		بیمار خارجی در:			
۱ - شرقی	خارج از ۱ - شرقی	۱ - شرقی	خارج از ۱ - شرقی		
-	-	۳	۵	۱۲	سویه های MDR
-	-	۱	۲	۳	سویه های مقاوم به یک داروی اصلی
-	-	۱	۱	۲	سویه های مقاوم به ۲ دارو اصلی (غیر MDR)
-	۱	-	-	۱	سویه های مقاوم به ۳ دارو اصلی (غیر MDR)

MDR: سویه های هستند که حداقل به ایزونیازید+ریفامپین مقاوم می باشند. PZA: Pyrazinamide

آش = استان آذربایجان شرقی /خارج از آ.ش = خارج از استان آذربایجان شرقی.

Myco**ba**cterium tuberculo**si**s= MTB

بحث

سل مقاوم به دارو، از نوع مقاومت چند دارویی MDR به یک معضل جهانی اعم از کشورهای عقب مانده، در حال توسعه و پیشرفته تبدیل شده است (۱). سویه های MDR به سویه هایی از MTB گفته می شود که حداقل به دو داروی اصلی ضد سل یعنی ایزونیاژید و ریفامپین مقاوم هستند. درمان اصلی بیماری سل توسط داروهای ایزونیاژید، ریفامپین، PZA همراه با اتاموتل و یا استروپوماکسین انجام می شود. از آنجائیکه PZA یکی از داروی اصلی در کاهش مدت درمان استاندارد به ۶ نقش دارد لذا تشخیص مقاومت به این دارو از اهمیت زیادی برخوردار است.

اثر ضد مایکوباکتریایی PZA در محیط اسیدی ۶ و پایین تر افزایش یافته و به حداکثر می رسد و این شرایط در داخل ماکروفاژها و سلولهای ایمنی بدن دیده می شود. نقش آن در کشته شدن باسیل سل در داخل سلول توسط این آنتی بیوتیک بسیار حائز اهمیت است. در حالیکه کاهش pH محیط کشت برای انجام آنتی بیوگرام این آنتی بیوتیک در مواردی باعث رشد کمتر و آهسته تر باکتری می شود و لذا در طول تاریخ آنتی بیوگرام، در سویه های MTB، روش های بسیار متعددی برای انجام تعیین مقاومت دارویی PZA پیشنهاد شده و انجام گرفته است (۵-۱). از اولین محیط های کشت مورد استفاده می توان به لونشتاین جانسون اشاره نمود در حال حاضر نیز در کشورهای مختلف از جمله هندوستان که بیش از ۳۰٪ موارد سل جهانی در آن کشور دیده می شود، مورد استفاده قرار می گیرد (۸). از جمله محیط های کشت که در سنوات اخیر مورد استفاده قرار گرفته است محیط کشت آگار 7H10 می باشد که مورد تأکید آزمایشگاه رفرانس کشوری نیز می باشد که در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفته است. البته از روشهای متعدد دیگر، می توان به روش BACTC رادیومتریکی و غیررادیومتریکی و سیستم های توسعه یافته آن اشاره نمود (۱،۳،۵،۸). PZA توسط آنزیم پیرازینامیداز به فرم فعال تبدیل می شود. بنابراین تشخیص وجود یا فقدان این آنزیم در تشخیص حساسیت و یا مقاومت، اساس توسعه روش های بیوشیمیایی تشخیص آزمایش پیرازینامیداز را تشکیل می دهد که در کنار روشهای کشت مولکولی مورد ارزیابی قرار گرفته است (۲و۱). روش های دیگر تعیین حساسیت دارویی متکی به روشهای مولکولی با استفاده از تعیین توالی با SSCP-PCR یا Dot Blotting که روی تشخیص موتاسیون ژن کد کننده آنزیم پیرازینامیداز pncA می باشد، انجام می گیرد. ولی این روش ها به علت داشتن هزینه بالا، نبود کادر مجرب جهت استفاده، امکان در دسترس بودن آن ها را محدود می سازد. مضاف بر اینکه مطالعات مولکولی نشان دهنده وجود ژن های مرتبط دیگر در بروز مقاومت به PZA می باشد (۵و۲و۱).

در این تحقیق تعداد ۱۰۰ سویه MTB ایزوله شده از بیماران سل ریوی که نمونه آنها توسط آزمایشگاه مرکز تحقیقات سل و بیماریهای ریوی تبریز طی سال های ۹۱-۱۳۸۸ نسبت به داروهای اصلی غیر از PZA آنتی بیوگرام شده بودند با روش نسبی در محیط کشت H10V به PZA تعیین مقاومت دارویی شدند. از

مجموع ۱۰۰ سویه جدا شده تعداد ۱۸٪ بطور کلی نسبت PZA مقاوم بودند و از این تعداد، تعداد سویه های مقاوم اغلب از بیماران خارجی ارسال شده بودند به میزان (۷۲٪) مقاوم به PZA بودند که نشان دهنده بیشترین مقاومت در بیماران خارجی است از طرفی میزان مقاومت در بیماران بومی آذربایجان شرقی صفر درصد بوده است که نشان دهنده عدم وجود مقاومت به این دارو در بیماران آذربایجان شرقی است. در مقایسه با نمونه سایر استانها نیز این میزان کمتر است. البته همجواری ایران با نخجوان، جمهوری آذربایجان و سایر کشورهای شمالی ایران که در آنها میزان مقاومت بسیار بالا است موضوع را نگران کننده تر می نماید کما اینکه از ۱۸ سویه مقاوم به PZA تعداد ۱۳ سویه از بیماران خارجی جدا شده بودند (۷۲٪). مطالعات گزارش شده جهانی در مقاومت دارویی MTB، اغلب فاقد میزان مقاومت به PZA می باشد که این موضوع امکان مقایسه و ارزیابی را محدود تر می کند. در کشورمان نیز نتایج محدودی از میزان مقاومت به PZA ارائه شده است (۱۱-۸،۱،۹). میزان مقاومت های گزارش شده نیز با توجه به سویه های مورد بررسی، متفاوت می باشد بطوریکه خرازی (۹) میزان مقاومت به PZA را ۲۵٪ گزارش کرده است در حالیکه در مطالعات نجفی مصلح درصد مقاومت به این دارو در ۶۳ سویه ۳٪ بوده است که میزان مقاومت تکی به PZA، ۱/۵٪ می باشد (۱۰) همانگونه مشاهده می شود میزان مقاومت مطالعه انجام شده در تهران توسط خرازی (۹) کمتر از میزان درصد مقاومت مطالعه ما می باشد. در مطالعه نجفی مصلح اگر چه بطور کلی میزان مقاومت کمتر از میزان مطالعه حاضر است ولی از نظر مقاومت تکی در بین بیماران ایران در آذربایجان شرقی با نتایج مطالعه ما یکسان بوده در هر دو مطالعه یک مورد سویه مقاوم به PZA دیده شده است (۹). در تحقیق دیگری که روی سویه های مقاوم به PZA انجام داده است اشاره ای به تعداد سویه های اصلی اولیه که سویه های مقاوم به PZA را برای تحقیقاتی مولکولی خود جدا کرده است، نمی کند ولی میزان شیوع موتاسیون در ژن pncA در ۴۱٪ از سویه های MDR تشخیص داده است (۱۱). در ایالات متحده آمریکا از میان سویه های ایزوله شده بین سال های ۲۰۰۹-۱۹۹۹ در مدت ۱۰ سال از میان هزاران سویه MTB سالانه ۲ تا ۳/۳ درصد مورد به PZA مقاوم بوده اند و این میزان مقاومت سال به سال رو به افزایش بوده است و اغلب موارد را نیز مقاومت تکی به PZA شامل می شده است (۱۲). از طرفی در این تحقیق اشاره می شود که مقاومت به PZA در سویه های MDR بسیار شایع و میزان آن تا ۳۸٪ نیز تشخیص داده شده است. در مطالعه حاضر نیز شیوع مقاومت به PZA و سویه های MDR به میزان ۵۷٪ بوده است که نشان دهنده جدی بودن مسئله در سویه های MDR است. در مطالعه دیگری که در هندوستان انجام گرفته است از میان ۲۸۶ سویه ۹٪ به PZA مقاوم بوده اند و این میزان مقاومت در سویه-های MDR به ۴۲٪ می رسد که بطور کلی از نظر شیوع بیشتر مقاومت PZA در این نوع از سویه ها، با مطالعه حاضر همخوانی دارد (جدول ۲) (۱۳). از ژاپن نیز در سال ۲۰۱۰ گزارش شده

۵-۲٪ گزارش شده است (۱۹،۲۰ و ۸). میزان مقاومت به PZA در یکی از کشورهایی که بیشترین موارد MDR را در بر دارد یعنی (لیتوانی) ۵٪ گزارش گردیده است (۲۱).

نتیجه گیری

مطالعات حاضر نشان دهنده بالا نبودن میزان مقاومت به PZA در بین بیماران آذربایجان شرقی است. بخصوص در بیمارانی که مقاومتی به داروهایی رده اول سل ندارند؛ ولی دیده شدن سویه های مقاوم در ۴ بیمار ایرانی نشان دهنده امکان وجود این سویه ها حتی در بیماران با سویه حساس به دارو در کشورمان می باشد. بعلت عدم وجود مطالعات و بررسی های کشوری امکان مقایسه در مناطق دیگر کشور برایمان مقدور نیست. در حال حاضر حداقل در تبریز بخصوص در میان بیماران بومی حساس به داروهای رده اول وارد کردن تعیین حساسیت دارویی به توجه مشکلات و هزینه بر بودن آن منطقی به نظر نمی رسد. ولی در میان سویه های مقاوم به داروهای رده اول و با توجه به شیوع مقاومت در این سویه ها با توجه به مطالعه حاضر و مطالعات انجام شده دیگر که شیوع مقاومت به PZA را نشان می دهند، منطقی خواهد بود ابتدا یک طرح ملی در مورد بررسی مقاومت دارویی به PZA بین سویه های حساس و سویه های مقاوم به داروی اصلی انجام گیرد و با توجه به نتایج حاصل در مورد وارد کردن آنتی بیوگرام PZA در کنار داروهای دیگر تصمیمات مقتضی اتخاذ گردد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله از مرکز تحقیقات سل و بیماری های ریوی تبریز و کمیته تحقیقات دانشجویی دانشگاه که ما را در انجام این پژوهش در قالب طرح تحقیقاتی یاری کرده اند، تشکر می نمایم.

References

1. Chang KC, Yew WW, Zhang Y. Pyrazinamide Susceptibility Testing in Mycobacterium tuberculosis: a Systematic Review with Meta-Analyses. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 2011; **55**(10): 4499-4505.
2. Singh P, Wesley C, Jadaun GP, Malonia SK, Das R, Upadhyay P, et.al. Comparative Evaluation of Lowenstein-Jensen Proportion Method, BacT/ALERT 3D System, and Enzymatic Pyrazinamidase Assay for Pyrazinamide Susceptibility Testing of Mycobacterium tuberculosis. *J Clin Microbiol* 2007; **45**(1): 76-80.
3. Merza MA, Farnia P, Tabarsi P, Khazampour M, Masjedi MR, Velayati AA. Anti-tuberculosis drug resistance and associated risk factors in a tertiary level TB centre in Iran: a retrospective analysis. *J Infect Dev Ctries* 2011; **5**(7): 511-519.
4. Heifets L, Sanchez T. New Agar Medium for Testing Susceptibility of Mycobacterium tuberculosis to Pyrazinamide. *J Clin Microbiol* 2000; **38**(4): 1498-1501.
5. Jonmalung J, Prammananan T, Leechawengwongs M, Chaiprasert A. Surveillance of pyrazinamide susceptibility among multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates from Siriraj Hospital, Thailand. *BMC Microbiol* 2010; **10**: 223.
6. Nazir T, Hameed A, Akhtar M S, Shabbir E, Qureshi JA. Pyrazinamide resistance of Mycobacterium tuberculosis strains, isolated from human patients. *Pharmacology online* 2008; **3**: 948-957.
7. Hannan MM, Desmond EP, Morlock GP, Mazurek GH, Crawford JT. Pyrazinamide-Monoresistant Mycobacterium tuberculosis in the United States. *J Clin Microbiol* 2001; **39**(2): 647-650.
8. Nair D, Capoor MR, Rawat D, Srivastava L, Aggarwal P. Standardization of first and second-line ant tubercular susceptibility testing using BacT Alert 3D system: a report from a tertiary care centre in India. *Braz J Infect Dis* 2009; **13**(6): 422-426.
9. Najafimosleh N, Ghazisaiedi K, Farnia P, Mohammadi F, Velayati AA. Results of developing a special agar medium method for pyrazinamide susceptibility testing of the testing of the Mycobacterium tuberculosis strains in National Research Institute of Tuberculosis & Lung Diseases, Tehran, Iran. *Hakim Research Journal* 2008; **11**(1): 14- 21.

است که میزان مقاومت به PZA در تعداد ۳۶ سویه به MDR میزان ۵۳٪ بوده است که مطابق نتایج این تحقیق می باشد (۱۴). در ترکیه در سال ۲۰۰۸ تعداد ۳٪ سویه های حساس به داروهای رده اول و ۲۵٪ سویه های MDR به PZA مقاوم تشخیص داده شده اند که از جهاتی با مطالعه نتایج این تحقیق مشابهت دارد (۱۵). همچنین در پژوهشی دیگری میزان مقاومت به PZA در میان ۵۰ سویه یک مورد بوده است که نشان می دهد محل تحقیق و سویه های مورد بررسی ارتباط مستقیم با محل انجام آزمایش و سویه های انتخابی دارد (۱۶). مقاومت در مراکزی مانند مرکز تحقیقات سل بیمار های ریوی تبریز که سویه ها از استان های مختلف و از بیماران خارجی جدا می شوند و یا مورد بررسی قرار می گیرند بالاتر می باشد.

در مطالعه دیگری Ozturk میزان مقاومت تکی به PZA را در بین ۱۰۹ سویه MTB در سویه های حساس به داروهای اصلی، صرفاً دو مورد گزارش کرده است (۱۶). Low از افریقای جنوبی در مطالعه ای که روی ۱۲۷ سویه مقاوم به یک و یا دو دارو و همچنین ۴۷ سویه حساس به تمامی داروهای اصلی انجام داده است، نشان داد که از ۱۲۷ سویه تعداد ۶۸ سویه مقاوم به PZA بوده اند و از ۴۷ سویه حساس صرفاً یک سویه مقاوم به PZA بوده است و نتیجه گیری می کند که شیوع مقاومت به PZA در سویه های MDR بسیار بالاتر است (۱۷). و senol در تحقیق خود، میزان بروز مقاومت به PZA را در ۶۵ سویه حساس (۳٪) در ۶۳ سویه MDR به میزان (۲۵٪) گزارش کرده است که با مطالعه حاضر همخوانی دارد (۱۵). Yolseil در مطالعه متاآنالیز خود میزان مقاومت به PZA در ترکیه را بین سال های ۱۹۹۹ الی ۱۹۸۹ به میزان ۱/۶٪ ولی در بین سال های ۱۹۹۵-۱۹۹۰ به میزان ۶/۵٪ گزارش کرده است (۱۸). در مطالعات خارجی دیگر میزان مقاومت به PZA در بین سویه های حساس به داروهای رده اول به میزان

10. Farazi A, Jabbariasl M, Sofian M. Assessment of drug resistance in tuberculosis patients and the factors affecting it (2005- 2010). *Aarak Medical University Journal (AMUJ)* 2012; **15**(60): 77-85.
11. Masjedi MR, Farnia P, Sorooch S, Pooramiri MV, Mansoori SD, Zarifi AZ, et.al. Mycobacterium tuberculosis genotypic diversity in pyrazinamide-resistant isolates of Iran. *Microb Drug Resist* 2009; **15**(4): 251-256.
12. Kurbatova EV, Cavanaugh JS, Dalton T, Click E, Cegielski JP. Epidemiology of pyrazinamide-resistant tuberculosis in the United States, 1999-2009. *Clin Infect Dis* 2013; **13**(6): 422-426.
13. Khoharo HK, Shaikh IA. Drug resistance patterns in pulmonary tuberculosis. *J Pak Med Assoc* 2011; **61**(3): 229-232.
14. Ando H, Mitarai S, Kondo Y, Suetake T, Sekiguchi JI, Kato S, et.al. Pyrazinamide resistance in multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates in Japan. *Clin Microbiol Infect* 2010; **16**(8): 1164-1168.
15. Senol G, Coşkun M, Gündüz AT, Biçmen C, Gayaf M, Ozsöz A. Investigation of pyrazinamide resistance in multidrug-resistant tuberculosis cases in Hospital of Pulmonary Diseases, Izmir, Turkey]. *Microbiol Bul* 2008; **42**(4): 591-597.
16. Ozkütük N, Ecemiş T, Sürücüoğlu S. Pyrazinamide monoresistant Mycobacterium tuberculosis in Manisa region, Turkey, *Microbiol Bul* 2008; **42**: 585-590.
17. Louw GE, Warren RM, Donald PR, Murray MB, Bosman M, Van Helden PD, et.al. Frequency and implications of pyrazinamide resistance in managing previously treated tuberculosis patients. *Int J Tuberc Lung Dis* 2006; **10**(7): 802-807.
18. Yolsal N, Malat G, Rian D, Orkun M, Kilicaslan Z. The comparison of 1984-1989 and 1990-1995 years of drug-resistant tuberculosis in Turkey: a meta-analysis. *Klimik Derg* 1998; **1**: 6-9.
19. Cheng SJ, Thibert L, Sanchez T, Heifets L, Zhang Y. pncA mutations as a major mechanism of pyrazinamide-de resistance in Mycobacterium tuberculosis: spread of a monoresistant strain in Quebec, Canada. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; **44**(3): 528-532.
20. Heffernan H. Ant tuberculosis drug resistance in New Zealand. Antibiotic Reference Laboratory Communi-cable Disease Group ESR, 2006, Porirua. https://surv.esr.cri.nz/PDF_surveillance/Antimicrobial/TB/TB_2006.pdf
21. Dewan P, Sosnovskaja A, Thomsen V, Cicenaitė J, Laserson K, Johansen I, et.al. High prevalence of drug-resistant tuberculosis, Republic of Lithuania, 2002. *Int J Tuberc Lung Dis* 2005; **9**(2): 170-174.