

## تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی سویه های بروسلا ملی تنسیس جدا شده از خون بیماران با روش MIC

دکتر هادی پیری دوگاهه<sup>۱</sup>، مرضیه علی قلی<sup>۲</sup>، دکتر محمد حسین دهقان<sup>۳</sup>، دکتر پرویز مالک نژاد<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup>استادیار میکروب شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل E-mail: h.peeridogaheh@arums.ac.ir

<sup>۲</sup>مربی میکروب شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران <sup>۳</sup> دانشیار بیوشیمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل <sup>۴</sup> استاد

میکروب شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران

### چکیده

**زمینه و هدف:** بروسلا یکی از شایعترین بیماری های مشترک بین انسان و دام است و بروسلاز انسانی در تمام نقاط ایران آندمیک می باشد. تعداد بیماران ثبت شده در سال ۱۹۸۸، هفتاد یک هزار و ۵۱ نفر (۱۳۲/۴ در هر صد هزار نفر) بود. بدلیل اینکه گونه های بروسلاباکتری های درون سلولی اختیاری می باشند تعداد محدودی آنتی بیوتیک بر این ارگانیزم ها موثر می باشند. مطالعه حاضر با هدف بررسی حساسیت آنتی بیوتیکی ۴۷ سویه بروسلا ملی تنسیس جدا شده از نمونه های بالینی انجام شده است.

**روش کار:** حساسیت آنتی بیوتیکی ۴۷ سویه بروسلا ملی تنسیس جدا شده از نمونه های بالینی در آزمایشگاه مورد بررسی قرار گرفت. حداقل غلظت مهاري MIC (Minimal Inhibitory Concentration) مواد ضد میکروبی مورد آزمایش توسط روش ترقیق آگار دایلوژن (Agar Dilution) اندازه گیری شد. مقادیر MIC<sub>50</sub> و MIC<sub>90</sub> حداقل غلظت، آنتی بیوتیک در نظر گرفته شد که در آن غلظت به ترتیب رشد ۹۰٪ و ۵۰٪ سویه ها مهار گردید. جهت تفسیر نتایج از معیارهای (NCCLS) National Committee for Clinical Laboratory Standards) برای باکتری های کند رشد استفاده شد.

**یافته ها:** تتراسیکلین (MIC<sub>50</sub>: 0.13، میکروگرم/ میلی لیتر ۰/۲۵ MIC<sub>90</sub>) و استرپتومایسین (MIC<sub>50</sub>: ۰/۰۰۳، میکروگرم/ میلی لیتر ۰/۲۵ MIC<sub>90</sub>) حداقل غلظت مهاري را در آزمایشگاه بر علیه سویه های بروسلا ملی تنسیس داشتند. نور فلوکسازین بیشترین مقدار MIC<sub>90</sub> را نشان داد (۸ میکروگرم/ میلی لیتر). حساسیت بیش از نیمی از سویه های بروسلا نسبت به ریفامپین کاهش یافته بود. (مقدار حداقل غلظت مهاري ۲ میکروگرم/ میلی لیتر)

**نتیجه گیری:** سویه های بروسلا در آزمایشگاه نسبت به اکثر آنتی بیوتیکهای که در درمان بروسلاز به کار میروند حساس می باشند. در ایران برای آنتی بیوتیک هایی که بر علیه گونه های بروسلا به کار می روند مقاومت قابل ملاحظه ای مشاهده نگردید، با وجود این، از آنجائیکه ریفامپین برای درمان بیماریهای شایعی چون سل بطور وسیع مورد استفاده قرار میگیرد، باید الگوی حساسیت منطقه ای ریفامپین بصورت دوره ای مورد بررسی قرار گیرد

**واژه های کلیدی:** روش آگار دایلوژن، حساسیت آنتی بیوتیکی، بروسلا ملی تنسیس، حداقل غلظت مهاري

پذیرش: ۸۶/۱۰/۳۰

دریافت: ۸۵/۱۱/۱۱

شده اند در حالی که طی سال های اخیر شیوع بیماری در سراسر جهان رو به افزایش می باشد [۱]. بروسلاز در بسیاری از نقاط جهان آندمیک بوده و در کشورهای در حال توسعه از شیوع بالایی برخوردار است. در ایران بروسلاز انسانی در تمام نقاط کشور آندمیک است و

### مقدمه

بروسلاز یکی از شایعترین بیماری های مشترک بین انسان و دام با انتشار جهانی است و بروسلا ملی تنسیس شایعترین عامل ایجاد بیماری می باشد. تنها ۱۷ کشور در دنیا به عنوان کشورهای عاری از بروسلا شناخته

هر یک از این رژیم‌های دارویی مضراتی را به همراه دارد. استرپتومایسین باید به صورت تزریق عضلانی به مدت ۲ تا ۳ هفته تجویز شود. اما تزریق‌های مکرر برای بیمار آزار دهنده است تجویز استرپتومایسین و تتراسیکلین در خانم‌های حامله و تتراسیکلین در کودکان کمتر از ۸ سال به دلیل تأثیر بر دندان‌ها، مجاز نیست. این ترکیب‌های دارویی نتایج خوبی دارند [۷-۱۱] و نسبت عود در ترکیب درمان ۳۰ روزه استرپتومایسین و تتراسیکلین بین ۸/۴-۰ درصد بوده و در ترکیب تتراسیکلین و ریفامپین با دوره درمان بر ۳۸/۸٪ و دوره درمانی ۶ هفته‌ای تتراسیکلین و استرپتومایسین برابر ۱۳/۴-۰ درصد است [۱۲].

علاوه بر معایب رژیم‌های دارویی که در بالا ذکر شد، در زنان حامله‌ای که ریفامپین به تنهایی تجویز می‌شود عود بیماری نسبتاً بالاست، که خود ممکن است باعث بروز سویه‌های مقاوم گردد [۱۳، ۱۴].

در ایران نیز هیچ آمار و ارقام دقیق و قابل استفاده در مورد الگوی مقاومت و حساسیت بروسلا نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج در دسترس نمی‌باشد. این فقدان اطلاعات موجب درمان نامناسب همراه با صرف هزینه‌های نابجا برای بیماران است. وجود گزارش‌های منتشر شده از بعضی نقاط دنیا مبنی بر مقاومت بروسلا نسبت به برخی داروها مانند ریفامپین و تری‌متوپریم / سولفامتوکسازول و یافتن ژن مقاومت نسبت به ریفامپین [۱۵-۱۸] و نبودن آمار درست، نیاز به مطالعه‌ای دقیق احساس می‌شود. آگاهی از الگوی مقاومت این باکتری موجب استفاده از داروهای مناسب در بیماران مبتلا می‌گردد که از میزان هزینه‌های اقتصادی درمان نیز خواهد کاست. ضمن این که نتایج و یافته‌های این طرح در پروتکل درمانی بروسلاز مورد استفاده قرار خواهد گرفت. مطالعه حاضر با هدف بررسی کارآیی تاثیر مواد ضد میکروبی مختلف بر علیه سویه‌های بروسلا ملی تنسیس جدا شده از کشت خون انجام شده است.

تعداد بیماران با تشخیص قطعی در سال ۱۹۸۸، هفتاد و یک هزار و پنجاه و یک نفر بودند، که یکی از بالاترین مقادیر شیوع در جهان می‌باشد [۲]. بر اساس اطلاعاتی که مرکز مدیریت بیماری‌های عفونی منتشر کرده است، وضعیت ایران در مورد بیماری بروسلاز در حال بهتر شدن است. در سال ۱۹۸۹ موارد بروز سالیانه بروسلاز بیش از ۱۰۰۰ مورد در هر یک میلیون نفر بود. در حالیکه در سال ۲۰۰۳، موارد بروز سالیانه به ۲۳۸/۶ کاهش یافت. با وجود این هنوز بروسلاز انسانی بار سنگینی را بر جامعه تحمیل می‌کند [۳].

سازمان بهداشت جهانی (WHO)<sup>۱</sup> تعداد موارد جدید بیماری بروسلاز را در هر سال ۵۰۰ هزار مورد گزارش نموده است و این مقدار بسیار کمتر از میزان واقعی محاسبه شده بروز بروسلاز انسانی می‌باشد [۴]. بروسلاز بیماری است با تظاهرات گوناگون که تمام بافت‌ها و اندام‌های مختلف انسان را تحت تأثیر قرار می‌دهد [۵، ۶].

علائم بالینی فوق‌العاده غیراختصاصی است و تظاهرات بسیار متغیری را نشان می‌دهد. تظاهرات بیماری به صورت یک سندرم تب‌دار همراه با علائم سیستمیک شامل لرز، تعریق، سردرد، کمردرد، بی‌اشتهایی و کاهش وزن بوده و یا به صورت گرفتاری‌هایی مانند آرتریت، اسپوندیلیت، آندوکاردیت، مننژیت، اپیدیدیمواریت و غیره بروز می‌کند [۵]. درمان بروسلاز با آنتی‌بیوتیک باعث کاهش علائم، کاهش درد و همچنین کاهش عود بیماری و سایر عوارض ثانویه بروسلاز می‌شود. به دلیل تمرکز بروسلاها در داخل سلول‌های میزبان استفاده از داروهایی که قدرت نفوذ به داخل سلول‌ها را دارند ضروری به نظر می‌رسد. در درمان بروسلاز برای جلوگیری از بروز مقاومت از ترکیب دو دارو استفاده می‌شود. درمان معمول بروسلاز ترکیبی از تتراسیکلین خوراکی به همراه استرپتومایسین تزریقی و یا ترکیب ریفامپین خوراکی و تتراسیکلین خوراکی است. به جای استرپتومایسین از جنتامایسین هم استفاده می‌شود [۶].

<sup>1</sup> World Health Organization

## روش کار

در این مطالعه که برای تعیین MIC<sup>۱</sup> آنتی‌بیوتیک‌های رایج در درمان بروسلوز انجام شد، از ۵۰ سویه بروسلا که از بیماران مبتلا به بروسلوز توسط گروه میکروبی‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران جدا شده بود، استفاده گردید. مطالعه حاضر از نوع توصیفی-تحلیلی می‌باشد. روش نمونه‌گیری از نوع آسان و زمان انجام مطالعه در یک دوره یکساله (دی ماه ۸۴ تا دی ماه ۸۵) می‌باشد و برای آنالیز نتایج از روش‌های آمار توصیفی استفاده شد. باکتری‌ها در محیط تریپتیکیس سوی‌برات (TSB)<sup>۲</sup> کشت داده شده بودند که پس از انکوباسیون ۲۴ ساعته در ۳۷-۳۵ درجه سانتی‌گراد به آن گلیسرول اضافه و در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شده بودند.

## تعیین MIC:

جهت تعیین MIC از روش رقت در آگار (agar dilution) و بر اساس استاندارد (NCCLS)<sup>۳</sup> استفاده شد.

## آماده‌سازی باکتری‌ها:

قبل از انجام آزمایش MIC، باکتری‌ها را از فریزر خارج کرده و دو بار بر روی محیط آگار خون کشت داده و در مجاورت ۱۰-۵ درصد CO<sub>2</sub> گرمخانه‌گذاری شد. پس از حصول اطمینان از خالص بودن کشت باکتری‌ها از آنها جهت تعیین MIC استفاده شد. از ۵۰ سویه‌ای که کشت مجدد داده شده بود ۳ سویه از دست رفته و آزمایش‌ها بر روی ۴۷ سویه انجام شد.

## مراحل انجام تعیین MIC نسبت به استریپتومایسین

## تهیه محلول ذخیره آنتی‌بیوتیک:

پودر استریپتومایسین از کارخانه زیگماتپیه گردید و چون طبق برگه آنالیز حلال و رقیق کننده این آنتی‌بیوتیک آب مقطر است پس از محاسبه و توزین پودر آب مقطر استریل به آن اضافه و پس از استریل

کردن به روش فیلتراسیون در شیشه‌های درپچ‌دار اضافه و در فریزر ۲۰- نگهداری شد. توزین پودر استریپتومایسین جهت تهیه محلول ذخیره براساس روش NCCLS و طبق فرمول زیر انجام می‌شود.

$$\text{Weight(mg)} = \frac{\text{Volume(ml)} \times \text{concentration} (\mu\text{g/ml})}{\text{Assay potency} (\mu\text{g/ml})}$$

در این مطالعه محلول ذخیره آنتی‌بیوتیک با غلظت ۱۰۲۴ تهیه گردید. این محلول تا ۶ ماه پایدار است.

## تهیه محیط‌های کشت:

در این مطالعه از محیط کشت مولر هینتون آگار (Mast England) استفاده شد که پس از استریل کردن در دمای ۵۵-۵۰ درجه سانتی‌گراد، هموگلوبین به میزان ۱٪ و polyvitex (bio Merieux France) به مقدار ۱٪ اضافه شد سپس از استوک آنتی‌بیوتیک در محیط مولر هینتون برات (سپالمنت شده با polyvitex به میزان ۱٪) رقت‌های مختلف تهیه و به محیط‌های کشت اضافه گردید به طوری که محیط‌های حاصل حاوی آنتی‌بیوتیک در غلظت‌های ۰/۰۰۲۵ تا ۳۲ میکروگرم در میلی‌لیتر شدند. کلیه محیط‌ها پس از حصول اطمینان از نظر آلوده نبودن مورد استفاده قرار گرفتند.

## آماده‌سازی سوسپانسیون میکروبی جهت تلقیح:

از کشت ۴۸ ساعته باکتری در محیط آگار خون ۴ تا ۵ کلنی برداشته و در لوله حاوی ۳ میلی‌لیتر محیط بروسلا برات تلقیح و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند به طوری که پس از انکوباسیون کدورتی معادل ۰/۵ مک‌فارلند (10<sup>8</sup> CFU/ml) داشته باشد.

از سوسپانسیون حاصل در محیط بروسلا آبگوشت رقت 10<sup>-2</sup> تهیه گردید به طوری که سوسپانسیون حاصل حاوی 10<sup>6</sup> CFU/ml باکتری بود. از سوسپانسیون حاصل به میزان ۱۰ میکرولیتر به محیط‌های کشت اضافه شد به طوری که در هر قطره 10<sup>4</sup> CFU/ml باکتری وجود داشت. پلیت‌ها در ۳۷-۳۵ درجه سانتی‌گراد در مجاورت ۱۰٪ CO<sub>2</sub> به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. به محیط‌های مولر هینتون آگار تکمیل شده بدون آنتی‌بیوتیک نیز باکتری تلقیح

<sup>1</sup> Minimal Inhibitory Concentration

<sup>2</sup> Trypticase Soy Broth

<sup>3</sup> National Committee for Clinical Laboratory Standards

انگلستان استفاده شد. براساس دستورالعمل کارخانه سازنده با حل کردن یک قرص در ۱۰۰ سی سی آب مقطر غلظتی برابر با  $16 \mu\text{g/ml}$  برای آنتی بیوتیک های تتراسیکلین و نورفلوکساسین و غلظت  $8 \mu\text{g/ml}$  برای آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین به دست می آید. از محلول آنتی بیوتیک های حاصله به محیط های کشت که دستور ساخت آن در بخش های قبل آمده است اضافه گردید تا محیط هایی با غلظت های مختلف آنتی بیوتیک ( $0.0025-32 \mu\text{g/ml}$ ) به دست آید.

سویه های کنترل که در این تحقیق به همراه سویه های بروسلا مورد استفاده قرار گرفت عبارت بودند از: *E.Coli* ATCC 25922، *E.Coli* ATCC 29212، *Staph. aureus* ATCC 9213، *Entero. faecalis* ATCC 49619، *Pneumococcus* در مورد انجام آنتی بیوگرام و تعیین MIC برای باکتری بروسلا باید بخاطر داشت که دوز عفونت زای این باکتری بسیار کم و همچنین ذرات آئروسول این باکتری می تواند از راه دستگاه تنفس و مخاط چشم باعث آلودگی و بیماری انسان شود. لذا تمام مراحل انجام کار در زیر هود بیولوژیک و در هنگام کار از دستکش و ماسک استفاده شد.

### نتایج

۴۷ سویه بروسلا که در این تحقیق بررسی شدند از بیماران مبتلا به بروسلوز جدا شده و همه بروسلا ملی تنسیس بودند. میزان MIC عوامل ضد میکروبی مطالعه شده با روش رقت در آگار در جدول یک آمده است.

جدول ۱. مقادیر MIC 50 و MIC 90 سویه های بروسلا مورد مطالعه

آنتی بیوتیک	دامنه MIC (mg/l)	MIC 50 (mg/l)	MIC 90 (mg/l)
تتراسیکلین	۰/۰۵ - ۰/۰۱	۰/۱۳	۰/۲۵
استرپتومایسین	۰/۰۰۲۵ - ۲	۰/۰۰۳	۰/۲۵
جنتامایسین	۰/۰۰۵ - ۴	۱	۲
ریفامپین	۱ - ۲	۱	۲
سیپروفلوکساسین	۰/۵ - ۴	۰/۷۵	۲
نورفلوکساسین	۲ - ۸	۲	۸

شد تا هم از رشد و زنده بودن باکتری آگاهی یافته و ضمناً از نظر آلودگی احتمالی نیز کنترل شود. پس از اتمام زمان انکوباسیون پلیت ها را از نظر رشد باکتری ها بررسی کرده و کمترین غلظتی از آنتی بیوتیک که به طور کامل رشد را مهار کرده بود به عنوان MIC در نظر گرفته شد.

### تعیین MIC سویه های بروسلا نسبت به جنتامایسین:

در این تحقیق از محصول جنتامایسین کارخانه Mast انگلستان استفاده شد. براساس دستورالعمل کارخانه سازنده با حل کردن یک قرص در ۱۰۰ سی سی آب مقطر غلظتی برابر  $4 \mu\text{g/ml}$  به دست می آید. محیط های کشت همانند دستورالعملی که در مورد استرپتومایسین گفته شد تهیه گردید و آنتی بیوتیک با غلظت های مورد نظر به محیط های کشت اضافه شد به طوری که محیط های کشت حاوی آنتی بیوتیک به میزان  $0.0025$  تا  $32$  میکروگرم در میلی لیتر گردیدند.

### تعیین MIC بروسلا نسبت به ریفامپین:

در این تحقیق از پودر ریفامپین (Merck Germany) استفاده شد. مطابق استاندارد NCCLS آنتی بیوتیک را وزن کرده و با توجه به این که حلال این آنتی بیوتیک متانول و رقیق کننده آب است، استوک  $1024$  تهیه و در فریزر  $-20$  درجه سانتی گراد نگهداری شد. پس از ساختن محیط کشت و اضافه کردن تکمیل کننده ها، از غلظت های آنتی بیوتیک که در محیط مولر هینتون برات ساپلمنته تهیه شده بود، به محیط های کشت اضافه شدند تا محیط های کشت حاوی غلظت های آنتی بیوتیکی از  $0.0025$  تا  $32$  میکروگرم در میلی لیتر شوند. مطابق آنچه قبلاً گفته شد سوسپانسیون باکتری ها اضافه و کمترین غلظتی که موجب مهار رشد باکتری شده بود به عنوان MIC در نظر گرفته شد.

### تعیین MIC بروسلا نسبت به تتراسیکلین،

### نورفلوکساسین و سیپروفلوکساسین:

در این مطالعه از محصول تتراسیکلین، نورفلوکساسین و سیپروفلوکساسین کارخانه Mast

سویه‌های بروسلا نسبت به ریفامپین در نمودار یک آمده است.

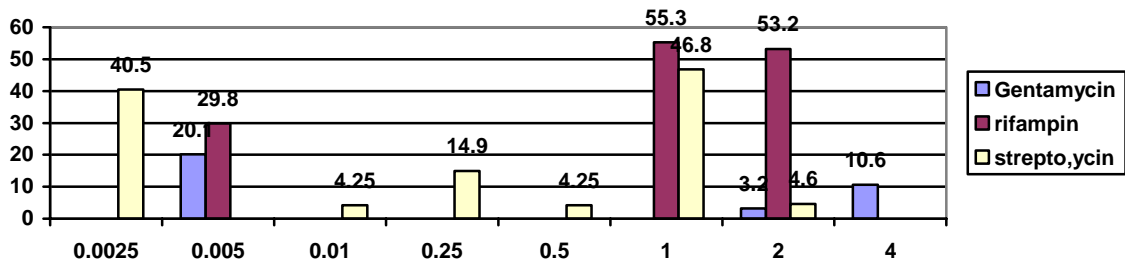
در بین کینولون‌های آزمایش شده، سیپروفلوکساسین دارای طیف MIC ۴-۵ μg/ml بوده که بیش از نیمی (۶۶٪) دارای MIC برابر ۱ بودند. فراوانی نسبی MIC سویه‌های بروسلا نسبت به سیپروفلوکساسین نمودار دو آمده است.

نورفلوکساسین دارای MIC بالاتری بین ۲-۸ μg/ml بود که ۶۳/۸۸٪ دارای MIC برابر ۴ μg/ml بود. فراوانی نسبی MIC سویه‌های بروسلا نسبت به این آنتی‌بیوتیک در نمودار ۲ آمده است.

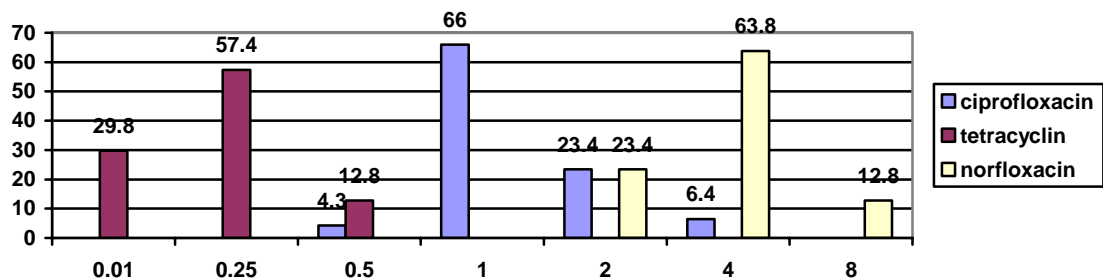
### بحث

افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی، عودهای مکرر در بیماری بروسلا، شکست‌های درمانی با روش‌های متداول و فقدان اطلاعات در مورد حساسیت بروسلاها نسبت به داروهای رایج در درمان، ایجاب می‌کند که به بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بروسلاها پرداخته

تتراسیکلین کمترین میزان MIC را در *in vitro* بر علیه بروسلا ملی‌تنسیس داشته است و دامنه آن بین ۰.۱ تا ۰.۵ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. MIC بیش از نیمی از این باکتری ها ۰.۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر بود، ۲۹/۸٪ دارای MIC ۱ و تنها ۱۲/۸٪ MIC برابر ۰.۵ میکروگرم در میلی‌لیتر داشتند. فراوانی MIC سویه‌های بروسلا نسبت به تتراسیکلین در نمودار دو آمده است. در بین آمینوگلیکوزیدها، طیف MIC استرپتومایسین ۲-۲۵ μg/ml بود. فراوانی نسبی MIC سویه‌های بروسلا نسبت به استرپتومایسین در نمودار یک آمده است. طیف MIC جنتامایسین ۴-۵ μg/ml بوده و فراوانی نسبی سویه‌های بروسلا نسبت به جنتامایسین در نمودار ۱ آمده است. MIC<sub>90</sub> آن به ترتیب ۱ و ۲ میکروگرم در میلی‌لیتر بوده است. MIC سویه‌های بروسلا نسبت به ریفامپین فقط در غلظت‌های ۱ و ۲ میکروگرم در میلی‌لیتر بوده که ۴۶/۸٪ برابر ۱ و ۵۳/۲٪ دارای MIC برابر ۲ میکروگرم در میلی‌لیتر بودند. فراوانی نسبی MIC



نمودار ۱. فراوانی نسبی سویه‌های بروسلا نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین، ریفامپین و استرپتومایسین



نمودار ۲. فراوانی نسبی سویه‌های بروسلا نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین، تتراسیکلین و نورفلوکساسین

عربستان سعودی در سال ۲۰۰۰ میزان مقاومت نسبت به استرپتومایسین را ۰/۶٪ اعلام کرده است [۲۳]. سویه‌های مطالعه حاضر نسبت به این آنتی‌بیوتیک حساس بودند.

میزان MIC نسبت به جنتامایسین در مطالعه حاضر بین ۰/۰۰۵ تا ۴ میکروگرم در میلی‌لیتر بوده است. میزان MIC<sub>50</sub> برابر ۱ و MIC<sub>90</sub> برابر ۲ میکروگرم در میلی‌لیتر بوده است که در مقایسه با نتیجه مطالعه سال ۲۰۰۶ ترکمنی یعنی ۰/۰۳۲ الی ۱/۵ و MIC<sub>90</sub> برابر ۲ میکروگرم در میلی‌لیتر همخوانی دارد. ولی در مقایسه با نتیجه ۰/۵ μg/ml مطالعه داهوک<sup>۷</sup> برابر بالاتر بوده است [۲۴]. این اختلاف احتمالاً به دلیل استفاده بیشتر از جنتامایسین در کشور ما بوده و یا ناشی از اختلاف در تعداد سویه‌های مورد مطالعه است. ریغامپین، یکی از داروهای است که در رژیم درمانی بروسوز توسط WHO توصیه می‌شود. میزان MIC سویه‌های بروسلا در مطالعه حاضر بین ۲-۱ میکروگرم در میلی‌لیتر بود.

در مطالعه بوش میزان MIC ریغامپین، ۴ μg/ml بوده است [۲۰]. در سال ۱۹۸۹ در مطالعه ای که از عربستان سعودی یوسف خان منتشر کرد، طیف میزان MIC، ۰/۲-۲/۵ μg/ml بوده است و میزان MIC<sub>90</sub> آن ۰/۲۵ و MIC<sub>50</sub> برابر ۰/۱۵ بوده است که این‌ها از مقادیر به دست آمده از مطالعه حاضر کمتر می‌باشد [۲۱]. ولی در مطالعه رایبشتاین<sup>۸</sup> که از اسرائیل در سال ۱۹۹۱ گزارش شده است MIC<sub>50</sub> ۲/۵ و MIC<sub>90</sub> برابر ۴ میکروگرم در میلی‌لیتر بود که از مقادیر مطالعه حاضر بالاتر بوده است [۲۵].

در سال ۲۰۰۴ مطالعه‌ای در مکزیک توسط لوپز<sup>۹</sup> انجام شده که حداکثر میزان MIC، ۴ میکروگرم در میلی‌لیتر بوده [۱۷] که ۲ برابر حداکثر میزان MIC مطالعه حاضر بوده است ولی میزان MIC<sub>90</sub> آن برابر ۲ میکروگرم در میلی‌لیتر که با مطالعه حاضر همخوانی داشته است. در مطالعه ترکمنی از ترکیه در سال ۲۰۰۶

شود. در این مطالعه طیف میزان MIC سویه‌های بروسلا نسبت به تتراسیکلین ۰/۵-۰/۱ μg/ml بوده که کمترین MIC را دارد (جدول ۱).

در مطالعه فارل<sup>۱</sup> در سال ۱۹۷۶ میزان MIC همه تتراسیکلین‌ها کمتر از ۱ mg/L گزارش شده است [۱۹]. در مطالعه بوش<sup>۲</sup> و همکاران در سال ۱۹۸۶ نیز میزان MIC، ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر بوده که مشابه مطالعه حاضر است [۲۰]. در سال ۱۹۸۹ در عربستان سعودی توسط یوسف خان<sup>۳</sup> و همکاران بر روی ۴۹ سویه بروسلا ملی‌تنسیس مطالعه‌ای انجام دادند و میزان MIC را بین ۰/۰۰۱-۰/۰۶ گزارش کردند [۲۱]. در مطالعه رودریگز<sup>۴</sup> در اسپانیا در سال ۱۹۹۳ میزان MIC ۰/۰۱-۲ میکروگرم در میلی‌لیتر ذکر شده است [۱۲].

در سال ۲۰۰۶ مطالعه‌ای توسط ترکمنی<sup>۵</sup> در ترکیه انجام شده است که میزان MIC نسبت به تتراسیکلین را ۰/۰۳۲-۱/۵ با MIC<sub>90</sub> برابر ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر گزارش نموده است [۲۲]. طیف میزان MIC سویه‌های بروسلا نسبت به تتراسیکلین در مطالعه حاضر مشابه مطالعه رودریگز از اسپانیا در سال ۱۹۹۳ می‌باشد [۱۲] و نسبت به گزارش سال ۲۰۰۶ ترکمنی از کشور ترکیه پایین‌تر می‌باشد. در حالی که از کشور عربستان سعودی مقاومت ۰/۶٪ توسط ممیش<sup>۶</sup> و همکاران در سال ۲۰۰۰ گزارش شده است [۲۳]. تمام سویه‌های مطالعه حاضر نسبت به تتراسیکلین حساس بودند.

استرپتومایسین نیز در رژیم‌های درمانی یکی از ترکیبات مورد استفاده است. طیف میزان MIC در مطالعه حاضر ۰/۰۲۵-۲ میکروگرم در میلی‌لیتر بوده است که نسبت به اکثر مطالعات انجام شده کمتر می‌باشد. میزان MIC<sub>90</sub> در مقایسه با کشورهای همسایه مانند عربستان سعودی (۱۹۸۹) و ترکیه ۲۰۰۶ نیز پایین‌تر بوده است [۲۲، ۲۱]. در حالی که ممیش از

<sup>1</sup> Farrel

<sup>2</sup> Bosch

<sup>3</sup> Yousef Khan

<sup>4</sup> Rodriguez

<sup>5</sup> Turkmani

<sup>6</sup> Memish

<sup>7</sup> Dahouk

<sup>8</sup> Rubinstein

<sup>9</sup> Lopez

سیپروفلوکساسین در مطالعه حاضر ۰/۵-۴ میکروگرم در میلی‌لیتر بوده است.

طیف میزان MIC سویه‌های بروسلا در مطالعه حاضر نسبت به سیپروفلوکساسین نسبت به همه مطالعات بالاتر بوده و تنها در مطالعه یامازهام<sup>۲</sup> از ترکیه در سال ۲۰۰۵ حداکثر میزان MIC ۴ برابر حداکثر میزان MIC در مطالعه حاضر بوده است. در حالی که MIC<sub>90</sub> گزارش از کشور ترکیه از MIC<sub>90</sub> مطالعه حاضر کمتر بوده است [۲۲،۱۹]. این اختلاف در میزان MIC نسبت به کشورهای دیگر احتمالاً به علت استفاده بی‌رویه این آنتی‌بیوتیک در کشور ایران است. در مورد نورفلوکساسین مطالعات کمی صورت گرفته است. میزان MIC سویه‌های بروسلا مطالعه حاضر نسبت به نورفلوکساسین ۲-۸ میکروگرم در میلی‌لیتر بوده است. در مطالعه داهوک در سال ۲۰۰۴ میزان MIC ۳ میکروگرم در میلی‌لیتر بوده است. در سال ۲۰۰۶ از کشور ترکیه گزارشی از ترکیبی و همکاران منتشر شده است و میزان MIC را بین ۰/۲۵ تا ۴ میکروگرم در میلی‌لیتر گزارش کرده‌اند. حداکثر میزان MIC در این مطالعه دو برابر حداکثر میزان MIC در دو مطالعه فوق‌الذکر است [۲۴،۲۲].

### نتیجه‌گیری

افزایش مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی می‌تواند یکی از دلایل شکست‌های درمانی در ایران باشد.

### پیشنهادات

با وجود اینکه مقاومت آنتی‌بیوتیکی قابل توجهی در سویه‌های بروسلا ملی‌تنسیس در مطالعه حاضر مشاهده نشد موارد زیر توصیه می‌شود:

۱- انجام آزمایش تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی (آنتی‌بیوگرام) برای تمام سویه‌های بروسلا جدا شده از بیماران توصیه نمی‌شود. ولی در زمان مشاهده عود بیماری انجام تعیین MIC توصیه می‌گردد.

طیف میزان MIC، ۰/۰۹۴-۱/۵ و میزان MIC<sub>90</sub> برابر ۱/۰ بوده که از نتایج مطالعه حاضر پایین‌تر بوده است. حداقل میزان کشندگی (MBC)<sup>۱</sup> ریفامپین برای سویه‌های بروسلا بین ۰/۰۶-۱ mg/l می‌باشد [۲۶] و میزان MIC ۲۵ سویه از ۴۷ سویه بررسی شده در این مطالعه برابر ۲ mg/l (نمودار ۱) بوده است. این سویه‌ها به عنوان غیرحساس در نظر گرفته شدند.

از طرف دیگر براساس NCCLS، باکتری‌های کند رشد با میزان MIC ۲ میلی‌گرم در لیتر حساس نسبی در نظر گرفته می‌شوند [۲۶].

یافته‌های مطالعه حاضر هشدار برای وقوع مقاومت نسبت به ریفامپین در سویه‌های بروسلا در کشور به شمار می‌رود. در نتیجه استفاده از ریفامپین در عفونت‌های غیرتوبرکولوزیس در مناطقی که انسیدانس بالایی از توبرکولوز وجود دارد باید با احتیاط بیشتری انجام شود و با وجود این محدودیت و رژیم‌های درمانی متداول بروسلوز می‌بایستی به دنبال عوامل آنتی‌میکروبیال جدید بود.

لزوم درمان ترکیبی، طول مدت درمان و نسبت شکست‌های درمانی با برخی رژیم‌های دارویی، بررسی و تحقیق در مورد داروهای جدید برای درمان بروسلوز را می‌طلبد. فلوروکینولون‌ها طیف فعالیت آنتی‌باکتریال گسترده‌ای دارند این داروها به صورت خوراکی بوده و به خوبی در سلول‌های فاگوسیتی نفوذ کرده و غلظت بافتی بالایی را ایجاد می‌نمایند و فعالیت خوبی بر علیه سویه‌های بروسلا در *in vitro* دارند [۲۶].

لذا توجه به استفاده از این داروها در درمان عفونت‌های ایجاد شده توسط باکتری‌های داخل سلولی جلب می‌شود. در این مطالعه بنابر نظر مشاور عفونی از بین فلوروکینولون‌ها از سیپروفلوکساسین و نورفلوکساسین که فعالیت متوسطی دارند ولی در ایران موجود می‌باشند، استفاده شده است. طیف میزان MIC سویه‌های بروسلا نسبت به

<sup>2</sup> Yamazham

<sup>1</sup> Minimum Bactericidal Concentration

۴- با توجه به نتایج مطالعه حاضر به دلیل MIC پایین تتراسیکلین، استفاده از این دارو در درمان بروسلوز در اولویت قرار می گیرد. همچنین بعلت MIC پائین سیپروفلوکساسین در موارد لزوم به عنوان داروی جایگزین استفاده از این آنتی بیوتیک توصیه می شود.

۲- با وجود انسیدانس بالای توبرکولوز در کشور ایران لازم است که ریفامپین را برای درمان توبرکولوز حفظ نمود و در درمان بیماری های دیگر از قبیل بروسلوز به دنبال داروهای جایگزین بود.

۳- ارزیابی دوره های جهت تعیین حساسیت سویه ها نسبت به داروهای متداول به خصوص ریفامپین توصیه می گردد.

## منابع

- ۱- دست گلی کامران، منیری رضوان. ترجمه بروسلوز مادکورهم منیر، چاپ اول تهران، چاپ و نشر بنیاد ۱۳۷۱، صفحات ۶-۱۴.
- 2- Rafai M. Incidence and control of brucellosis in the Near East region. *Vet Microbiol*. 2002; 90: 81-110.
- 3- Pappas G, Papadimitriov P, Akritidis N, Christou L and Tsianos E. The new global map of human brucellosis. *Lancet Infect Dis*. 2006; 6: 91-9.
- 4- World Health Organization. Fact sheet N 173, July 1997. World Health Organization, Geneva Switzerland
- 5- Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. *Medical microbiology*, 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Mosby, 2002, 78-81.
- 6- Doganay M, Aygen B. Human brucellosis an overview. *Int Infect Dis*. 2003; 7: 173-82.
- 7- Solera J, Espinoza A, Martinez- Alfao E. Treatment of Human Brucellosis with Doxycyclosis and Gentamycin. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997; 41: 80-4.
- 8- Cisneros J, Viciano M P, Colmenero J, Pachon J, Martinez C and Alarcon A. Multicenter prospective study of treatment of *Brucella melitensis* brucellosis with doxycycline plus streptomycin for 2 weeks. *Antimicrob Agents Chemother*. 1990; 34: 881-3.
- 9- Colmenero J, Hernandez DS, Reguera J M, Cabrera F, Rius F and Alonso A. Comparative trial of doxycycline plus streptomycin versus doxycycline plus rifampin for the therapy of human brucellosis. *Chemotherapy*. 1989; 35: 146-52.
- 10- Kosmidis J, Karagounis A, Tselentis J and Daikos G K. The combination rifampin-doxycycline in brucellosis is better than the WHO regimen. *Chemioterapia* 1982;1(Suppl. 4):107.
- 11- Navarro A, Pachon J, Cuello J A, Viciano P, Lopez L and Carneado J. Brucellosis: estudio prospectivo del tratamiento con tetraciclinas, estreptomycin y sulfadiazina en dos ciclos de tres semanas. *Enf. Infect. Microbiol. Clin*. 1984; 2:274-275.
- 12- Rodriguez M, Gamo A, Moreno J. Evaluacion de dos regimen en el tratamiento de la brucellosis: rifampicin- doxiciclina vs estreptomycin-doxiciclina. *Resultados preliminares*. *N Arch Fac Med*. 1985; 43:171-175.
- 13- Garcia-Rodriguez A J, Munoz Bellido L J, Fresnadillo M J and Trujillano I. In Vitro Activities of New Macrolides and Rifampentine against *Brucella* spp. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1993; Apr, 911-913
- 14- Llorens-Terol J, Busquets RM. Brucellosis treated with rifampin. *Arch Dis Child*. 1980; 55: 486-8.
- 15- Rodriguez, M., L. Buz6n, M. Meseguer, J. Martinez, and E. Bouza. 1980. Rifampin as a single agent in the treatment of acute brucellosis in humans, p. 1064-66. In J. D. Nelson and C. Grassi (ed.), *Current chemotherapy and infectious diseases*, vol.2. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- 16- Dimitrove TS., Panigrahi D, Emara M, Awni F, Passadilla R. Seroepidemiological and microbiological study of brucellosis in kuwait. *Med Prince Pract*. 2004; Jul-Aug: 13(4): 215-9.
- 17- Lopez-Merino A., Contreras-Rodriguez A, Migranas-Ortiz R, Orrantia-Gradin R, Hernández-Oliva G M, Gutiérrez-Rubio YT et al. Susceptibility of México in brucella isolates to moxifloxacin,



- ciprofloxacin and other antimicrobials used in the treatment of human brucellosis. *Scand J infect Dis*. 2004; 36(9):636-8.
- 18- Marianelli C, Ciuchini F, Tarantino M, Pasquali P, Adone R. Genetic bases of the rifampin resistance phenotype in *Brucella* Spp. *J Clin microbiol*. 2004; 42: 5439-43.
- 19- Farrel ID, Hinchliffe PM, Robertson L. Sensitivity of *brucella* spp. to tetracycline and its analogues. *J clin Pathol* 1976; 29: 1097-100.
- 20- Bosch J., J Linaros, MJ Lopez de Goicoechea, J Ariza, Cisnal and R. Martin. In vitro activity of ciprofloxacin, ceftriaxone and five other antimicrobial agents against 95 strains of *brucella melitensis*. *J Antimicrobial chemotherapy* 1986; 17: 459-461.
- 21- Yousef Khan M, Dizon M and Kiel WF. comparative in vitro activities of Ofloxacin, Difloxacin, Ciprofloxacin and other selected antimicrobial agents against *Brucella melitensis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1989; Aug, p 1409-10.
- 22- Turkmani A, Ioannidis A, Christidou A, Psaroulaki A, Loukaidis F and Tselentis Y. In vitro susceptibilities of *Brucella melitensis* isolates to eleven antibiotics. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2006; 5: 24.
- 23- Memish Z, Mah WM, Al Mahmoud S, Al Shaalan M and Yousuf Khan M. *Brucella* Bacteraemia: Clinical and Laboratory Observations in 160 Patients. *J infect* 2000; 40; 59-63
- 24- Al Dahouk S, Hagen RM, Nockler K, Tomaso H, Witting M, Scholz HC, et al. Failure of a short-term antibiotic therapy for human brucellosis using ciprofloxacin. *Chemotherapy* 2005; 51(6): 352-6.
- 25- Rubinstein E, Lang R, Shasha B, Hagar B, Diamanstein L, Joseph G, et al. In vitro susceptibility of *Brucella melitensis* to antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother*. 1991; 35: 1925-7.
- 26- Garcia-Rodriguez TA, Garcia Sanchez JE and Trujillano I. Lack of effective bactericidal activity of new quinolones against *Brucella* Sp. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1991; Apr, P: 756-9.