

## بررسی میکروبیولوژیک و حساسیت ضد میکروبی در موارد کشت مثبت بیماران مبتلا به تب مالت با سرولوژی مثبت

احمد علیخانی<sup>۱</sup> حمیدرضا هنرمند<sup>۲</sup> نرگس دهگانی<sup>۳</sup> آبتین حیدرزاده<sup>۴</sup>

### چکیده

**سابقه و هدف:** تب مالت بیماری مشترک انسان و دام با انتشار جهانی است که در کشور ما آندمیک می‌باشد. این بیماری در تمام دنیا علت عمده ناتوانی در انسان و حیوانات اهلی است. تظاهرات بالینی بیماری متنوع است و ارگان‌های مختلف بدن را گرفتار می‌نماید. این مطالعه جهت بررسی حساسیت ضد میکروبی مبتلایان به تب مالت تشخیص داده شده به روش سرولوژی پس از کشت خون مثبت انجام شد.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه مقطعی ۳۰ بیمار که تست رایت بیشتر مساوی ۱/۱۶۰ و تست دو-مرکاپتواتانول بیشتر مساوی ۱/۴۰ همراه با علائم بالینی منطبق با تب مالت داشتند، در شهرستان رامسر در سال‌های ۸۷-۸۶ مورد بررسی قرار گرفتند. کشت خون به روش لیزسانتریفوژ و تست حساسیت ضد میکروبی علیه ۹ داروی ضد تب مالت به روش دیسک انجام شد.

**یافته‌ها:** در پایان مطالعه میزان کشت مثبت ۲۳/۳ درصد (۷ مورد) از کل ۳۰ مورد بود که در تمامی موارد بروسلا ملی تنسیس رشد نمود. حساسیت ضد میکروبی نسبت به افلوکساسین، سیپروفلوکساسین و داکسی‌سیکلین در حد مطلوب بود ولی نسبت به کوتریموکسازول و استرپتومایسین حساسیت مطلوبی وجود نداشت.

**استنتاج:** نتیجه اینکه تب مالت که بیماری شایعی در کشور ماست، عمدتاً در اثر نوع ملی تنسیس ایجاد می‌شود. بجز کوتریموکسازول و استرپتومایسین، حساسیت نسبت به بقیه داروهای ضد تب مالت به خصوص افلوکساسین، سیپروفلوکساسین و داکسی‌سیکلین در حد مطلوب بوده است.

**واژه‌های کلیدی:** تب مالت، کشت، لیز سانتریفوژ، آنتی بیوگرام

### مقدمه

می‌شود. بروسلا یک کوکوباسیل کوچک گرم منفی است. بیماری انسانی در بیشتر موارد در اثر بروسلا ملی تنسیس،

بروسلوزیس بیماری مشترک انسان و دام است. تظاهرات بیماری متنوع است و به راحتی با دیگر بیماری‌ها اشتباه

E-mail : ahmadalikhani@yahoo.co.in

**مؤلف مسئول:** دکتر احمد علیخانی - قائمشهر، بیمارستان رازی، بخش عفونی

- متخصص بیماری‌های عفونی و گرمسیری، استادیار دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مازندران
- دکترای میکروبیولوژی، استادیار مرکز مطالعات ملکولی و سلولی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی گیلان
- میکروبیولوژیست آزمایشگاه بیمارستان امام سجاد (ع) رامسر
- متخصص پزشکی اجتماعی، استادیار دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی گیلان

تاریخ دریافت: ۸۷/۹/۶ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۸۷/۱۰/۱۰ تاریخ تصویب: ۸۷/۱۲/۱۴

کشت استفاده شده است تا بتوان در کمترین زمان میزان حساسیت کشت‌های مثبت بروسلا را بررسی نمود.

## مواد و روش‌ها

این تحقیق یک مطالعه مقطعی و از نوع آینده‌نگر بود که روی ۳۰ بیمار مبتلا به بروسلوزیس که در بیمارستان امام سجاد(ع) رامسر از فروردین سال ۱۳۸۶ تا پایان اردیبهشت ۱۳۸۷ به مدت ۱۴ ماه مورد تشخیص قرار گرفته بودند، انجام شد. در این مطالعه، از بیمارانی که علائم بالینی منطبق با بروسلوز و تیتراست رایبیت بیشتر مساوی ۱:۱۶۰ و تیتراست 2ME بیشتر مساوی ۱:۴۰ داشتند، کشت خون بروش لیزسانتریفوژ جهت جدا کردن بروسلا و آنتی‌بیوگرام به روش ذیل انجام شد؛ ۵ میلی‌لیتر خون از بیمار گرفته و داخل ویال‌هایی که حاوی ۸ میلی‌لیتر آب مقطر دیونیزه همراه با ۳ میلی‌لیتر ماده ضد انعقاد تری‌سیترات سدیم بود ریخته شد و به خوبی مخلوط شد، سپس به مدت ۳۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰ سانتریفوژ انجام شد (روش لیز سانتریفوژ). سپس مایع سطحی با سر سمپل استریل خالی نموده و از رسوبات ته ویال برداشته شد. سپس در محیط کشت مغزی مایع بروسلا را پراس کرده و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷°C اینکوبه می‌شد و بعد از ۲۴ ساعت به حاوی urea منتقل شد. این انتقال پس از پاساژ و بروش Streak انجام شده است.

پس از ۲۴ ساعت چنانچه کلونی میکروبی رشد می‌نمود ابتدا رنگ آمیزی گرام نموده و اگر کوکسی‌گرام منفی در زیر میکروسکوپ مشاهده می‌شد توسط تست‌های بیوشیمیایی شناسایی قطعی انجام می‌شد.

بروسلاها اوره‌آزم مثبت بودند، لذا پس از ۲۴ ساعت روی محیط کشت جامد BHI urea رنگ محیط که ابتدا زرد کم رنگ بود به صورتی تبدیل خواهد می‌شد. در نهایت با آنتی‌سرم پلی‌والان و آنتی‌سرم اختصاصی مونوالان ملی تنسیس و اورتوس، مورد شناسایی و تعیین گونه قرار گرفتند. چنانچه توسط آنتی‌سرم‌های اختصاصی،

بروسلا سوئیس و بوویس ایجاد می‌شود. راه‌های انتقال بیماری به انسان شامل تماس مستقیم با حیوان یا ترشحات آنها از طریق خراش روی پوست، استنشاق ذرات عفونی، کاشته شدن در ساک ملتحمه‌ای و یا از طریق خوردن محصولات لبنی غیرپاستوریزه است.

علائم معمولاً ۴-۲ هفته پس از کاشته شدن عامل، به شکل تب، تعریق، کسالت، بی‌اشتهایی، سردرد و درد پشت شروع می‌شود. علائم ممکن است به صورت حاد یا آهسته شروع شود (۱). در صورت شروع علائم در کمتر از ۳ ماه بیماری حاد، ۱۲-۳ ماه تحت حاد و بیش از ۱۲ ماه مزمن تلقی می‌شود (۱،۲).

عوارض بیماری شامل ابتلاء دستگاه معدی روده‌ای، سیستم هپاتوبیلیری، اسکلتی، عصبی، گرفتاری قلبی (علت اصلی مرگ در این بیماران)، تنفسی، ادراری، تناسلی، خون، پوستی و چشمی می‌باشد (۱،۳). تشخیص بیماری زمانی قطعی می‌شود که عامل بروسلا از خون، مغز استخوان یا دیگر بافت‌ها جدا شود (۱،۲).

میزان جدا شدن بروسلا از خون، بسته به روش انجام کشت و مدت اینکوباسیون محیط از ۷۰-۱۵ درصد متفاوت است. در مورد بروسلوز حداقل نیاز به ۴ هفته اینکوباسیون است. احتمال مثبت شدن کشت مغز استخوان از بیشتر خون است. استفاده از محیط BACTEC احتمال جدا شدن بروسلا را بیشتر می‌کند.

استفاده از روش لیز سانتریفوژ سبب تسریع در جدا شدن عامل می‌شود. در صورت فقدان کشت، یک راه تشخیص فرضی، استفاده از تست‌های سرولوژیک است. تیتراست بسیار بالا یا تیتراست افزایش یافته تشخیصی می‌باشد. درمان بیماری با داروهای خانواده تتراسیکلین، ریفامپین، کوتریموکسازول، آمینوگلیکوزیدها و کینولون‌ها از مدت‌ها پیش انجام می‌شد (۱).

از آنجائی که مراقبت از درمان تب‌مالت همانند دیگر عفونت‌های باکتریال نیازمند انجام متناوب کشت و آنتی‌بیوگرام می‌باشد و نیز با توجه به حساسیت پایین کشت در این بیماری، از تکنیک لیز سانتریفوژ برای انجام

که جدا کردن بروسلا از خون به روش‌های سنتی دشوار است و حساسیت پائینی دارند لذا جهت حصول کشت مثبت و انجام تست حساسیت ضد میکروبی بهتر است از تکنیک‌هایی به منظور افزایش حساسیت کشت، مانند لیز سانتریفوژ بهره جست (۱۱،۱۲،۱۳،۱۴).

در مطالعه Baykam در سال ۲۰۰۴ از ۴۲ مورد کشت خون مثبت ۳۷ مورد بروسلا ملی تنسیس و ۵ مورد ابورتوس بودند و در بررسی آنتی بیوگرام یک مورد مقاومت به کوتریموکسازول گزارش شد (۴). در مطالعه Dimitrov در سال ۲۰۰۴ نشان داده شد که آزیترومایسین، ریفامپین و کوتریموکسازول فعالیت کمی علیه بروسلاها دارند (۵). در مطالعه حاضر مشابه آنچه که در بررسی بودور و همکاران در سال ۲۰۰۴ به دست آمد موثرترین دارو داکسی سیکلین، افلوکساسین، سیپروفلوکساسین بودند و حساسیت نسبت به استرپتومایسین و کوتریموکسازول کمتر بوده است (۶). براساس مطالعه‌ای که در ترکیه در سال ۲۰۰۵ انجام گرفت، با توجه به MIC بالا نسبت به استرپتومایسین، استفاده از این دارو را در صورت کنترل دقیق بیماران، را توصیه نمودند (۷).

در یک مطالعه از بیماران مشکوک به بروسلا کشت خون تهیه شد که ۱۱ مورد کشت مثبت بدست آمد و تمام موارد بروسلا ملی تنسیس بود. تست حساسیت ضد میکروبی نیز انجام گرفت که تمام موارد به داکسی سیکلین، ریفامپین، سیپروفلوکساسین و سفتریاکسون حساس بودند و فقط یک مورد نسبت به کوتریموکسازول حساسیت نسبی (متوسط) داشت و بقیه مقاوم بودند (۸). در مطالعه‌ای روی ۵۵ کودک (۶ ماه تا ۱۲ سال)

بروسلا جدا می‌شد، تست حساسیت ضد میکروبی با آنتی-بیوتیک‌های افلوکساسین، سیپروفلوکساسین، جنتامایسین، آمیکاسین، داکسی سیکلین، تتراسیکلین، کوتریموکسازول، سفتریاکسون و استرپتومایسین انجام می‌گرفت. اطلاعات پس از جمع‌آوری کدگذاری شد و داده‌های حاصله با استفاده از آمار توصیفی و نرم‌افزار آماری spss spata 8.0 مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

## یافته‌ها و بحث

این مطالعه در بیمارستان امام سجاد (ع) رامسر از فروردین سال ۱۳۸۶ تا پایان اردیبهشت ۱۳۸۷ به مدت ۱۴ ماه انجام شد. از مجموع ۳۰ بیمار مبتلا به بروسلوز که به روش سرولوژیک (تست رایت و ۲-مرکاپتواتانول) بیماری تشخیص داده شده بود، نمونه خون جهت انجام کشت ارسال شد. هفت مورد (۲۳/۳ درصد) کشت مثبت گزارش شد و همه موارد، بروسلا ملی تنسیس بود. تمامی هفت مورد نسبت به داکسی سیکلین، سیپروفلوکساسین و افلوکساسین حساس، و حساسیت در حد متوسط نسبت به تتراسیکلین درسه مورد، سفتریاکسون دو مورد، جنتامایسین و آمیکاسین یک مورد و استرپتومایسین در تمامی موارد وجود داشت. حساسیت نسبت به کوتریموکسازول بدین شرح بود: در چهار مورد کاملاً حساس، در دو مورد در حد متوسط و در یک مورد مقاوم گزارش شد.

هدف ما از این مطالعه، بررسی کشت خون مبتلایان به تب مالت که به روش سرولوژیکی تشخیص داده شده‌اند و تعیین پترن حساسیت ضد میکروبی آنها می‌باشد. از آنجائی

جدول شماره ۱: حساسیت و مقاومت آنتی بیوتیک‌های بررسی شده

SXT	AN	GM	S	CRO	Te	D	CP	OFX	آنتی بیوتیک	
									حساسیت	مقاومت
۵۷	۸۵	۸۵	۰	۷۱	۵۷	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	حساس	۰
۲۸	۱۴	۱۴	۱۰۰	۲۸	۴۲	۰	۰	۰	حساسیت متوسط	۰
۱۴	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	مقاوم	۰

OFX: ofloxacin, CP: ciprofloxacin, D: doxycycline, Te: tetracycline,  
CRO: ceftriaxone, S: streptomycin, GM: gentamicin, AN: amikacin, SXT: cotrimoxazole

مبتلا به بروسلوز حاد که بیشتر با آرتریت حاد مراجعه نموده بودند و همگی تیتراگلو تیناسیون (۱:۳۲۰) داشتند در ۳۵ مورد کشت خون از نظر بروسلا ملی تنسیس مثبت شد. درمان در این بیماران با تتراسیکلین، کوتریموکسازول با یا بدون استرپتومایسین در تمام موارد موفق بوده است (۹).

از آنجائیکه جدا کردن بروسلا از خون پرورش های سنتی دشوار است و حساسیت پائینی دارند لذا جهت حصول کشت مثبت و انجام تست حساسیت ضد میکروبی بهتر است از تکنیک هایی به منظور افزایش حساسیت کشت مثل لیز سانتیفریژ بهره جست (۱۰-۱۳).

در مطالعه دیگری روی ۴۶ بیمار کشت خون به روش سنتی انجام و حساسیت ضد میکروبی بررسی شد. تمامی موارد بروسلا ملی تنسیس بوده و به جز ۲ مورد حساسیت متوسط به ریفامپین بقیه موارد کاملا به ریفامپین، تتراسیکلین، استرپتومایسین، سیپروفلوکساسین و آزیترومایسین حساس بودند (۱۴).

نتیجه اینکه در مطالعه حاضر که در شهرستان رامسر انجام شد، مشابه بقیه مطالعات، اکثر موارد ابتلا به بروسلوز در اثر ملی تنسیس می باشد و پترن حساسیت ضد

میکروبی، نشانگر آن است که هنوز حساسیت مناسبی نسبت به ترکیبات تتراسایکلین از جمله داکسی سیکلین وجود دارد ولی حساسیت نسبت به استرپتومایسین و کوتریموکسازول در حال کاهش است. پاسخ این بیماران به ترکیبات کینولون بسیار عالی و بدون مقاومت می باشد با وجود آنکه این ترکیبات آنتی بیوتیکی در موارد سل مقاوم به درمان نیز کاربرد دارد، استفاده از آنها در درمان بروسلوز بایستی با دقت نظر بیشتری انجام گیرد. البته مصرف این داروها در مقایسه با ترکیبات تتراسیکلینی هم بهتر تحمل می شود. در انتها بایستی به محدودیت های مطالعه از جمله حجم کم نمونه، استفاده از روش های کشت جدیدتر و عدم دسترسی به دیسک ریفامپین اشاره نمود.

### سپاسگزاری

از پرسنل محترم آزمایشگاه بیمارستان امام سجاده (ع) رامسر که در انجام این مطالعه ما را یاری نمودند تشکر و قدردانی می شود

### References

1. Edward J. Young, Brucella Species. Mandel, Douglas and Bennett's Principles Pract Infec Dis 2005; 223: 2664-2674.
2. Corbel M J, Breeching N J, Brucellosis. In: Kasper, Braunwald, Fauci, Hauser, Longo, Jameson. Harrison's principles of internal medicine. 16<sup>th</sup> edition. Newyork: McGraw Hill; 2005. p 914-917.
3. Robert A. Slata, Brucellosis. Cecil Text Med 2008; 339: 1887-1890.
4. Baykam N, Esener H, Ergonul O. In vitro antimicrobial susceptibility of brucella species. Int J Antimicrob Agents 2004; 23(4): 405-407.
5. Ts. Dimitrov, D. Panigrahi, M. Emar. Seroepidemiological and microbiological study of brucellosis in Kuwait. Med Princ Pract 2004; 13: 215-219.
6. H. bodur, N balaban, S. Aksaray. Biotypes and antimicrobial susceptibility of brucella isolates. Scandinavian J Infect Dis 2004; 35(5): 337-338.
7. Tanyel E, Coban A Y, Koruk S T. Actual antibiotic resistance pattern of brucella melitensis in central Anatolia. An uptake from an endemic region Turkey 2005.

8. Ukran Kose, Selcuk Kilic, Yusuf Ozbel. Identification of brucella species from proven brucellosis patients in Izmir. *J Basic Microbiol* 2005; 45(4): 323-327.
9. Palanduz. A brucellar arthritis of child. *J Pediat Child Health* 1986; 41: 1-2.
10. Abbasi ME, Khosravi A, Alavi M. comparison of conventional culture method and PCR for isolation of brucella in brucellosis. Abstract book of Tehran brucellosis congress 2005; 118-119.
11. Hajia M, Rahbar M, Hosseindoust SR. Isolation of brucella in admitted brucellosis patients. Abstract book of Tehran brucellosis congress. 2005; p 165-166.
12. Aghouli M, Keshmiri Esphandabad R, Najafipour S, Alavi MJ. Isolation of brucella: comparison of conventional Castaneda method and blood culture with lysis centrifugation technique. Abstract book of Tehran brucellosis congress. 2005; p 181-182.
13. Mansouri F, Afshariyan M, Hatami H. Epidemiologic, clinical and diagnostic study in geriatric brucellosis patients in Kerman shah Hospital. *Behbood* 2000; 4: 44-51.
14. Ergin A, Selcuk K, Kemalettin A, et al. Antimicrobial susceptibility of *Brucella melitensis* isolates from blood samples. *Turk J Med Sci* 2008; 38(3): 257-262.