جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

تحقیقی

شناسایی جهش‌های شایع منجر به مقاومت دارویی ایزوله‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با روش Line Probe Assay در استان مازندران (۱۳۹۱)

دکتر فرهنگ بابامحمودی[۱]، دکتر محمدرضا مهدوی[۲]، بیتا طالبی[۳]، حسین جلالی[٤]، پیام روشن[٥]، دکتر مهراد مهدوی*[٦]

۱- دانشیار، گروه بیماری‌های عفونی، مرکز تحقیقات مقاومت‌های میکروبی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران. ۲- استادیار، گروه علوم آزمایشگاهی، مرکز تحقیقات تالاسمی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران. ۳- کارشناس ارشد زیست‌شناسی سلولی و مولکولی ، گروه پژوهشی سینا مهر، ساری. ٤- کارشناس آزمایشگاه، مرکز تحقیقات تالاسمی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران. ٥- کارشناس ارشد ایمنی‌شناسی، گروه پژوهشی سینا مهر، ساری. ٦- دکتری دامپزشکی، گروه پژوهشی سینا مهر، ساری.

چکیده

زمینه و هدف : *پیدایش مقاومت دارویی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، به‌خصوص سویه‌های مقاوم به چند دارو، درمان و کنترل شیوع بیماری سل را با مشکل مواجه کرده است. این مطالعه به منظور شناسایی جهش های شایع منجر به مقاومت دارویی ایزوله های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با استفاده از روش LPA (Line Probe Assay) در استان مازندران انجام شد.*

روش بررسی : *این مطالعه توصیفی روی نمونه‌های خلط مثبت ٥٤ مسلول ریوی مراجعه کننده به مراکز بهداشتی درمانی استان مازندران انجام شد. نمونه خلط بیماران روی محیط لوین اشتاین – جانسون کشت داده شد. نمونه‌ها از نظر وجود ژن‌های مقاوم و حساس به داروهای خط اول و دوم درمان بیماری سل (ایزونیازید، ریفامپین، استرپتومایسین، آمیکاسین / کانامایسین و کینولون) با روش LPA ارزیابی شدند.*

یافته ها : *از ٥٤ نمونه خلط، ۳ نمونه مقاوم به کینولون (٥/٥ درصد)، ۳ نمونه مقاوم به کانامایسین / آمیکاسین (٥/٥ درصد) و ٤ نمونه مقاوم به استرپتومایسین (٧/٤ درصد) بودند. در ۲ نمونه (۳/٧ درصد) جهش در کدون katG مشاهده شد که مربوط به مقاومت به ایزونیازید بود. ۳ مورد (٥/٥ درصد) مقاومت به ریفامپین با جهش ژنی rpoB 516 مشاهده شد. در مجموع ٤ نمونه (٧/٤ درصد) به دو دارو مقاوم بودند. به‌طوری که ۳ نمونه به دو داروی استرپتومایسین و کینولون و یک نمونه به دو داروی ریفامپین و کانامایسین مقاوم بودند.*

نتیجه‌گیری : *٧/٤ درصد از نمونه‌ها به دو داروی درمان کننده بیماری سل مقاوم بودند. همچنین روش Line Probe Assay در شناسایی مقاومت به چندین داروی ضدسل، روشی سریع و مناسب ارزیابی شد.*

کلید واژه‌ها : *سل ، مقاومت دارویی ، Line Probe Assay*

* نویسنده مسؤول : دکتر مهراد مهدوی ، پست الکترونیکی mahdavi899@gmail.com

نشانی : ساری، ابتدای بلوار کشاورز، ساختمان دکتر دادخواه، آزمایشگاه تشخیص پزشکی فجر، تلفن ۰۱۱-۳۳٤۱۱۱۰۳، نمابر ۳۳۲۹۲۹۲۹

وصول مقاله : ۹۲/۱۲/٤ ، اصلاح نهایی : ۹۳/۲/۷ ، پذیرش مقاله : ۹۳/۲/۲۲

مقدمه

حدود یک سوم از جمعیت جهان به مایکوباکتریوم توبرکولوزیس عامل بیماری سل آلوده هستند و در ۱۰-۵ درصد این موارد، بیماری سل بروز پیدا می کند (۱). قدمت بیماری سل زیاد است (۲) و با وجود همه تلاش‌هایی که تاکنون برای از بین بردن این بیماری صورت گرفته؛ همچنان سبب مرگ انسان‌ها می گردد. در سال ۲۰۱۲ ، ۱/۱ میلیون نفر در اثر سل جان خود را از دست داده‌اند که معادل ۳۰۰۰ نفر در روز است (۳). دلیل این امر شکل‌گیری مقاومت‌های متعدد دارویی در باکتری مایکوباکتریوم توبرکولوزیس است که درمان آن را با اشکال مواجه می‌سازد. سویه‌های مقاوم به عنوان سویه‌های غالب در اثر انتخاب طبیعی در جمعیت گسترش می‌یابند. مقاومت به بیش از یک دارو در یک سویه در اثر جهش‌های پی‌درپی به‌وجود می‌آید. هنگامی که باکتری سل دست کم نسبت به دو داروی اصلی ایزونیازید و ریفامپین (داروهای خط اول درمان سل) مقاوم شود؛ سویه مورد نظر، مقاوم به چند دارو (multi drug resistant: MDR) محسوب می‌شود. دیگر داروهای خط اول در درمان سل پیرازینامید و اتامبوتول هستند. گسترش مایکوباکتریوم توبرکولوزیس مقاوم به چنددارو در کشورهای در حال توسعه و کشورهای جهان سوم بیشتر است (۴). سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکولوزیس مقاوم به چنددارو برای اولین بار در سال ۱۹۹۰ در جهان مشاهده شد و سریعاً تبدیل به معضل جهانی گردید (۵). در سال ۲۰۱۰ حدود ۶۵۰ هزار مورد

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

بیماری سل با مایکوباکتریوم توبرکولوزیس مقاوم به چنددارو در سرتاسر جهان مشاهده شد. سپس سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکولوزیس با مقاومت دارویی فراگیر (extensively drug resistant: XDR) و مواردی از سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکولوزیس مقاوم به کلیه داروها (total drug resistant: TDR) در بیماران گزارش گردید (۵).

تغییراتی که در ژن‌های inhA و katG رخ می‌دهند باعث بروز مقاومت به ایزونیازید می‌شوند. جهش در ژن rpoB منجر به بروز مقاومت به ریفامپین و جهش در ژن‌های rpsL، gydB و rrs منجر به مقاومت به استرپتومایسین می‌شوند. مقاومت به آمیکاسین/کانامایسین بر اثر جهش در ژن‌های rrs و eis، مقاومت به کاپرومایسین بر اثر جهش در rrs و tylA و مقاومت به پیرازینامید در اثر تغییر در ژن pncA به‌وجود می‌آیند. همچنین تغییر در ژن gyrA باعث مقاومت به کینولون می‌شود (۶).

امروزه مقاومت دارویی و به خصوص مقاومت چنددارویی چالشی جدی برای برنامه‌های کنترل بیماری سل است. استفاده بی‌رویه از داروهای ضدسل منجر به ایجاد جهش‌هایی در ژن‌های هدف این داروها و مقاومت نسبت به داروهای موردنظر می‌شوند. عوامل ژنتیکی و ابتلا به HIV نیز در این امر دخیل هستند. با شیوع بیشتر HIV به‌خاطر مساعد بودن شرایط برای وقوع جهش، بروز سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به چنددارو نیز بیش از پیش جدی می‌شود. آلودگی به ویروس HIV باعث کاهش سلول‌های T-helper I (CD4) و به تبع آن کاهش سایتوکاین‌های ترشحی این سلول (TNF a – INF – IL2 – IL12) می‌شود. این سایتوکاین‌ها در فعال‌کردن ماکروفاژها در مقابله با بیماری سل حائز اهمیت هستند. در افراد مبتلا به ایدز، سل خارج ریوی در مقایسه با افراد سالم شایع‌تر است. ابتلا به HIV بروز بیماری سل و همچنین سویه‌های مقاوم به دارو را تسهیل می‌کند. آفریقا دارای بیشترین شیوع بیماری سل در جهان است و نسبت به دیگر نقاط جهان دارای آمار بالای HIV است. ۸۲درصد از آلودگی همزمان TB/HIV نیز در این منطقه وجود دارد و در سال ۲۰۱۰ میلادی ۱۴ درصد از مقاومت چنددارویی به بیماری سل در این منطقه گزارش شد. برطبق آمارهای به‌دست آمده از صحرای آفریقا، ایدز از عوامل بسیار مهم افزایش بیماری سل حداقل دو دهه گذشته بوده است (۵و۹-۷).

به منظور تشخیص سریع نوع مقاومت آنتی‌باکتریال عامل بیماری سل می‌توان از روش‌های مبتنی بر PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی اقدام نمود و جهش‌های دخیل در بروز مقاومت را تعیین نمود. در روش‌های معمول PCR برای تشخیص هریک از جهش‌ها بایستی از پرایمرهای جداگانه استفاده نمود (۱۰).

روش LPA (Line Probe Assay) روشی مبتنی بر DNA Strip Test است که در آن ابتدا قطعات DNA با استفاده از روش PCR تکثیر شده؛ سپس به الیگونوکلئوتیدهای مکمل خود که بر روی کاغذهای strip قرار دارند؛ متصل می‌شوند. این الیگونوکلئوتیدها حساسیت بالایی دارند و در صورت وجود حتی یک نوکلئوتید متفاوت به DNA مکمل متصل نمی‌شوند. در این روش در صورتی که قطعه DNA به مکمل خود متصل گردد؛ بعد از پایان رنگ‌آمیزی به صورت نوار خاص مشاهده می‌گردد. روش LPA این امکان را پدید می‌آورد تا به‌طور همزمان بتوان وجود چندین موتاسیون را تنها با استفاده از یک واکنش LPA شناسایی کرد (۱۱). این مطالعه به منظور شناسایی جهش‌های شایع منجر به مقاومت دارویی ایزوله‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با استفاده از روش Line Probe Assay در استان مازندران انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه توصیفی روی ۵۴ مسلول ریوی مراجعه کننده به مراکز بهداشتی درمانی استان مازندران (ساری، بابل، آمل و قائمشهر) در آزمایشگاه فجر ساری طی سال ۱۳۹۱ انجام شد.

نمونه خلط بیماران جمع‌آوری و با هیدروکسید سدیم ۴ درصد انکوبه شدند و پس از سانتریفیوژ با دور g ۳۰۰۰ و خنثی کردن با HCL روی محیط لوین اشتاین – جانسون کشت داده شدند. از میان نمونه‌های خلط مثبت، به طور تصادفی ۵۴ نمونه انتخاب گردید.

از نمونه های مثبت دو کلنی با ابعاد ۰/۵ میلی‌مترانتخاب شدند و به میکروتیوب‌های حاوی ۰/۵ میلی‌لیتر TE 1X اضافه شدند. پس از غیرفعال کردن باکتری‌ها با قرار دادن آنها در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه، DNA ژنومی باکتری به روش سیتریدیم بروماید (CTAB) استخراج گردید. در این روش به مخلوط حاصل ۷۰ میکرولیتر لیزوزیم با غلظت ۱۰ mg/ml اضافه گردید و نمونه‌ها حداقل یک ساعت در بن ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس ۷۵ میکرولیتر محلول SDS / Proteinase K ۱۰درصد به نمونه‌ها اضافه گردید و در بن‌ماری با دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد و تکان‌های متناوب (shaking) انکوبه شدند. در مرحله بعد ۱۰۰ میکرولیتر NaCl 5M و ۱۰۰ میکرولیتر محلول CTAB/NaCl که قبلا در ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داشتند؛ نیز به آنها اضافه گردید و به مدت ۱۰ دقیقه در ۶۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از آن ۷۵۰ میکرولیتر محلول کلروفرم/ایزوآمیل الکل با نسبت ۱:۲۵ به محیط اضافه شد و خوب مخلوط گردید. سپس نمونه‌ها ۸ دقیقه در دور g ۱۱۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. در این مرحله سه فاز ایجاد شد که مایع رویی به تیوب جدید منتقل گردید و ۴۵۰ میکرولیتر ایزوپروپانول سرد به آن اضافه شد. این تیوب به مدت ۳۰ دقیقه در دمای منفی ۲۰ درجه

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

سانتی گراد قرار گرفت و سپس در دور g ۱۱۰۰۰ و به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. پس از خارج کردن مایع رویی، رسوب باقیمانده دو بار با اتانل ۷۰درصد شستشو شد و به آن آب مقطر اضافه گردید.

به منظور تکثیر ژن‌های مقاومت به داروهای ایزونیازید، ریفامپین، استرپتومایسین، آمیکاسین / کانامایسین و کینولون، واکنش Multiplex PCR توسط کیت GenID (GmbH) (ساخت آلمان) انجام گرفت و پس از تایید صحت کار با الکتروفورز محصول واکنش روی ژل ۳درصد، در نهایت محصولات PCR در مجاورت نوارهایی که الیگونوکلوتیدهای مکمل نواحی سالم و جهش‌یافته به صورت تک رشته به آنها متصل بود؛ قرار گرفتند. پس از انجام مراحل هیبریدیزاسیون، شستشو و رنگ‌آمیزی، الگوهای ایجاد شده در هر استریپ برای تک‌تک نمونه‌ها بررسی گردید. به صورتی که ۴۰ میکرولیتر از محلول denaturing (باز کننده دو رشته DNA) را در گوشه چاهک ریختیم و سپس ۲۰ میکرولیتر از محصولات PCR مربوط به نمونه موردنظر را نیز به آن افزودیم و توسط پیپت خوب هم زدیم و به‌مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق باقی ماند. سپس یک میلی‌لیتر محلول hybridization buffer که گرم شده بود را با دقت توسط پیپت روی ترکیب قبلی اضافه نمودیم. در این مرحله نوار مخصوص و نامگذاری شده که درون کیت فراهم آوردیم را در داخل مواد قرار دادیم و برای مدت ۳۰ دقیقه به بن ماری ۴۷ درجه سانتی گراد منتقل و shake کردیم. سپس بافر Hybridization را خارج و دوبار و هر بار یک دقیقه با محلول wash شستشو دادیم. سپس یک میلی‌لیتر محلول wash ریخته و در بن ماری ۴۷ درجه سانتی گراد به همان ترتیب قبل به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه نمودیم. در پایان این زمان محلول wash را خارج کردیم و ۲ بار و هر بار با یک میلی‌لیتر محلول رقیق شده rinse شستشو دادیم. در مرحله بعد پس از خارج کردن محلول rinse ، یک میلی‌لیتر محلول کنجوگه رقیق شده اضافه کردیم و نیم ساعت در دمای اتاق بر روی شیکر افقی انکوبه نمودیم. سپس ۳ مرتبه با یک میلی‌لیتر محلول rinse شستشو دادیم و در مرحله بعد یک میلی‌لیتر سوبسترا ریخته و به‌مدت ۱۰-۱۲ دقیقه (بسته به شدت رنگ گرفتن نوار) در دمای اتاق و روی شیکر انکوبه کردیم. این مرحله در تاریکی انجام گردید. در نهایت سوبسترا از چاهک خارج و برای متوقف کردن واکنش دو بار با یک میلی‌لیتر آب مقطر شسته شد. نوار را از چاهک خارج کرده و خشک کردیم. لازم به ذکر است تمامی مواد و بافرها به همراه کیت خریداری شده موجود بودند. باندهای ایجاد شده با کمک دفترچه درون کیت بررسی گردید.

با استفاده از این روش در طی سه روز (استخراج DNA دو روز و LPA یک روز) انواع جهش‌های شایع در ایجاد مقاومت دارویی در باکتری مایکوباکتریوم توبرکلوزیس شناسایی گردید.

یافته‌ها

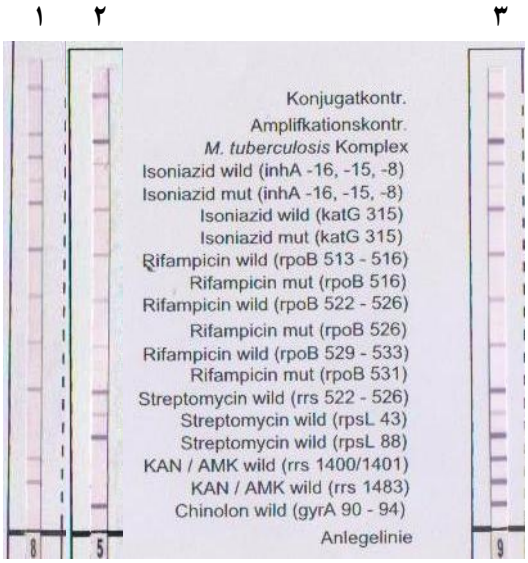
از ۵۴ نمونه خلط مثبت بررسی شده، ۳۳ نمونه (۶۱/۱۱ درصد) مربوط به مردان و ۲۱ نمونه (۳۸/۸ درصد) به زنان تعلق داشت.

الگوی باندهای ایجاد شده بر روی نوارهای استریپ در شکل یک نشان داده شده است.

۱۱ نمونه (۲۰/۳۷ درصد) از ۹ مرد و ۲ زن، دارای مقاومت به حداقل یک دارو بودند.

از مجموع جهش‌های مقاومت دارویی، مقاومت به استرپتومایسین دارای بیشترین فراوانی (۷/۴درصد) بود. فراوانی مقاومت به داروهای کینولون، کانامایسین / آمیکاسین، ریفامپین هرکدام ۵/۵ درصد و این میزان برای داروی ایزونیازید ۳/۷درصد تعیین گردید (جدول یک).

۲۰/۳ درصد از نمونه‌ها دست کم به یکی از داروهای مورد بررسی مقاوم بودند و در ۷/۴درصد از نمونه‌ها نیز بیش از یک جهش مشاهده شد (جدول ۲).



شکل ۱ : الگوی نوارهای استریپ
۱) نمونه طبیعی؛ ۲) نمونه مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین و آمیکاسین؛ ۳) نمونه مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین و کینولون

همه نمونه‌های مقاوم به ایزونیازید در ژن katG جهش داشتند. همچنین نمونه مقاوم به ایزونیازید با جهش ژن inhA مشاهده نگردید. در نمونه‌های مقاوم به ریفامپین جهش تنها در جایگاه ۵۱۶ ژن rpoB وجود داشت. در حالی که در مقاومت به آمیکاسین/کانامایسین، نیمی از نمونه‌ها در جایگاه ۱۴۰۰-۱۴۰۱ و نیمی دیگر در جایگاه ۱۴۸۳ از ژن rrs دارای جهش بودند. در مواردی که نمونه‌ها به استرپتومایسین مقاوم بودند؛ تمامی جهش‌ها در ژن rpsL مشاهده شد و سویه‌های مقاوم به استرپتومایسین فاقد

جهش در ژن rrs بودند. لازم به ذکر است یک مسلول به HIV نیز مبتلا بود. در ۱۸ نمونه (۳۲/۷درصد) از خلط افراد مبتلا، اسمیر منفی دیده شد.

جدول ۱ : فراوانی جهش‌های ایجادکننده مقاومت دارویی در مسلولین استان مازندران طی سال ۱۳۹۱

داروها	تعداد جهش (درصد)	جهش ژن	مردان (n=۳۳)	زنان (n=۲۱)
ایزونیازید	۲ (۳/۷)	inhA -16-8-15	۰	۰
		katG 315	۲	۰
ریفامپین	۳ (۵/۵)	rpoB 516	۳	۰
		rpoB 531	۰	۰
		rpoB 526	۰	۰
استرپتومایسین	٤ (۷/٤)	rrs 522-526	۰	۰
		rpsL 43	۲	۲
		rpsL 88	۱	۱
آمیکاسین و کانامایسین	۳ (۵/۵)	rrs1483	۳	۰
		rrs 1400-1401	۳	۰
کینولون	۳ (۵/۵)	gyrA 90-94	۲	۱

جدول ۲ : فراوانی مقاومت دارویی برحسب تعداد آنتی‌بیوتیک‌ها در مسلولین استان مازندران طی سال ۱۳۹۱

مقاومت دارویی	ژن جهش یافته	تعداد نمونه واجد جهش	جمع کل تعداد (درصد)
یک دارو	ریفامپین (rpoB 516)	۲	۷ (۱۲/۹)
	کانامایسین/آمیکاسین	۲	
	استرپتومایسین (rpsL)	۱	
	ایزونیازید(katG)	۲	
دو دارو	استرپتومایسین + کینولون	۳	٤ (۷/٤)
	ریفامپین + کانامایسین	۱	

multi drug resistant مشاهده نشد.

بحث

با توجه به نتایج مطالعه حاضر ۷/۴ درصد از نمونه‌ها به دو داروی درمان کننده بیماری سل مقاوم بودند. همچنین روش LPA در شناسایی مقاومت به چندین داروی ضدسل، روشی سریع و مناسب ارزیابی شد.

حساسیت و اختصاصیت جایگاه‌های وقوع جهش مربوط به هر دارو، در بررسی‌های انجام شده در ایران و دیگر کشورها، به‌عنوان جایگاه‌های رایج، مورد تایید قرار گرفته است و نتایج تقریباً مشابهی به‌دست آمده است. در مطالعاتی که در کره و برزیل انجام شد؛ جهش‌های katG-315، inhA-15 ، rps-l43، rrs-1401 ، rpoB-531 به عنوان جهش‌های معمول شناسایی شدند (۱۲و۱۳). در مطالعه Isakova و همکاران جهش‌های شایع در جایگاه‌های ۵۳۱ و ۵۱۶ و ۵۳۶ در ژن rpoB رخ داده و جهش جایگاه ۵۳۱ از همه رایج‌تر بود (۱۴). در مطالعه Jnawali و همکاران در کره جنوبی علاوه بر این جایگاه‌ها، جایگاه‌های gyrA-94 ، embB-306 و pncA-159 نیز به عنوان جایگاه‌های مستعد برای وقوع جهش معرفی شدند (۱۲). در مطالعه Romey و همکاران در ونزوئلا در خصوص مقاومت به ایزونیازید، جهش در ژن katG دارای حساسیت ۸۸/۲درصد و اختصاصیت ۱۰۰ درصد تعیین شد (۱۵). در مطالعه خسروی و همکاران در زنجان بررسی مقاومت به داروی ایزونیازید در مسلولین نشان داد که جهش در جایگاه‌های rpoB-531, katG-315 inhA-15 دارای بیشترین فراوانی است و حساسیت این جایگاه‌ها تایید شد (۱۶). در مطالعه طهماسبی و همکاران در تهران نیز جهش‌های gyrA و rrs شناسایی گردید (۱۷). در مطالعه دوستدار و همکاران در سال ۱۳۸۶ وجود جهش در ژن rpoB بررسی شد. نتایج نشان داد که بررسی مولکولی جایگاه‌های ۵۳۱ و ۵۱۶ و ۵۲۶ در تشخیص مقاومت به ریفامپین کمک کننده است و بروز تغییر در این جایگاه‌ها در ایران به نسبت شایع است و در جایگاه‌های دیگر جهش به‌ندرت اتفاق می‌افتد. همچنین جهش در جایگاه‌های rpoB-516 و rpoB-526 با فراوانی متفاوت نسبت به دیگر نقاط جهان وجود دارد (۱۸). در مطالعه حاضر روشی انتخاب شد که جایگاه‌های جهش‌های شایع نامبرده در مطالعه دوستدار و همکاران (۱۸) بررسی شوند. در مطالعه جاوید و همکاران در استان گلستان، با استفاده از روش‌های مولکولی، ژن‌های inhA و katG برای شناسایی مقاومت به ایزونیازید و ژن rpoB به منظور شناسایی مقاومت به ریفامپین تکثیر شد. از ۷۵ نمونه بررسی شده ۵/۷درصد در ژن katG و ۳/۴درصد در ژن inhA دچار جهش شدند و دو مورد از آنها همزمان هر دو جهش را نشان دادند. مقاومت به ایزونیازید در ۶/۹درصد از نمونه‌ها وجود داشت و ۴/۶درصد از موارد جهش در ژن rpoB رخ داده بود (۱۹). در مطالعه پورحاجی باقر و همکاران در مازندران ۱۳۴۵ بیمار به روش PCR از نظر مقاومت به ایزونیازید و ریفامپین بررسی شدند. بیشترین مقاومت نسبت به ایزونیازید و بیشترین نقص در ژن katG مشاهده شد (۲۰). با این وجود مطالعات ذکر شده به بررسی سایر جهش‌های ایجاد کننده مقاوت دارویی در باکتری مایکوباکتریوم توبرکلوزیس نپرداخته‌اند. در مطالعه حاضر با استفاده از روش LPA علاوه بر بررسی مولکولی مقاومت دارویی به ایزونیازید و ریفامپین، وجود سایر مقاومت‌های دارویی به‌همراه فراوانی انواع جهش‌ها بررسی شده است.

درمطالعه حاضر، هیچ یک از مسلولین به چند دارو مقاوم نبودند. در استان گلستان (۱۹) و شهرستان تبریز (۱۰) نیز نتایج مشابهی حاصل شده است. در مطالعه ما موردی از موتاسیون در ژن inhA یافت نشد. همچنین ۳/۷ درصد از نمونه‌ها به ایزونیازید مقاوم بودند و همگی در ژن katG دارای نقص بودند. این یافته با این نتیجه که درصد بیشتری از جهش‌های منجر به مقاومت نسبت به ایزونیازید، مربوط به katG است (۱۹)؛ مطابقت دارد.

در مطالعه حاضر همه موارد مقاوم به ریفامپین در جایگاه ۵۱۶ ژن rpo-B نقص داشتند و در جایگاه‌های ۵۳۱ rpoB– و ۵۲۶– rpoB جهشی مشاهده نشد. در حالی که در مطالعه ذاکر و همکاران (۲۱) بر خلاف مطالعه حاضر جهش در جایگاه ۵۲۶ در ژن rpoB دارای بیشترین فراوانی بود و مانند مطالعه ما تغییری در جایگاه rpoB–۵۳۱ در نمونه های ایرانی وجود نداشت (۲۱). قابل ذکر است که جهش در جایگاه rpoB-۵۲۶ در معدودی از کشورها دیده شده است (۲۲و۲۳). در مطالعه ما مقاومت به ریفامپین بیشتر از مقاومت به ایزونیازید بود. این یافته مطالعه خلیل‌زاده و همکاران مطابقت دارد (۲۴).

در مطالعه حاضر مقاومت به استرپتومایسین بیش از سایر داروها مشاهده شد. در مطالعه نمایی و همکاران در مشهد نیز استرپتومایسین دارای بیشترین مقاومت در آن منطقه بود و مقاومت نسبت به دیگر داروهای مورد بررسی در سطح پایینی قرار داشت (۲۵).

در مطالعه ما مقاومت به داروهایی که به عنوان داروهای خط دوم مورد استفاده قرار می‌گیرند؛ در مواردی مشاهده شد. این موضوع نگران کننده است. زیرا عامل خطری در درمان مبتلایان به مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به چنددارو محسوب می‌شود و در صورت شیوع باکتری‌های مقاوم به چنددارو درمان آن دشوار خواهد بود. به دلیل آن که در صورت مقاوم بودن به داروهای خط اول، از داروهای خط دوم برای درمان استفاده می‌شود؛ مقاوم بودن به این داروها، منجر به عدم موفقیت در درمان بیماری سل می شود و در نتیجه سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به چنددارو گسترش بیشتری پیدا خواهد کرد.

در مطالعه حاضر در ۳۲/۷درصد (۱۸ نمونه) از نمونه‌های خلط افراد مبتلا، اسمیر منفی دیده شده است. این امر بر لزوم استفاده از روش‌های ملکولی نظیر LPA در تشخیص بیماری سل تاکید دارد. زیرا پس از منفی شدن اسمیر و تا زمان مشخص شدن جواب کشت مدت زمان زیادی طول می‌کشد و در درمان فرد مبتلا وقفه ایجاد می‌گردد.

روش‌های مبتنی بر PCR روش‌هایی سریع برای تشخیص جهش‌های منجر به ایجاد مقاومت دارویی، هستند؛ ولی از آن جایی که ممکن است جهش‌های متعددی در ژن‌های مختلف رخ داده باشد؛ شناسایی تمام آنها مستلزم انجام واکنش‌های PCR متعدد است. روش LPA مورد استفاده در مطالعه حاضر، با استفاده از انجام دو واکنش PCR و به تبع آن آشکارسازی بر روی نوارهای مربوطه قادر است به‌طور همزمان وجود یازده جهش مختلف را که باعث بروز مقاومت به ۵ نوع داروی متفاوت می‌شوند را بررسی کند. این روش در مقایسه با شیوه‌های متداول فعلی، روشی سریع‌تر در بررسی مقاومت‌های دارویی است. لذا انجام این تست برای همه مسلولین توصیه می‌شود. با این وجود از آنجایی که روش LPA قادر به شناسایی سایر جهش‌های دخیل در مقاومت دارویی نیست؛ مطالعه حاضر وجود تمامی جهش‌های مرتبط با مقاومت دارویی در مایکوباکتریوم توبر کلوزیس را بررسی نکرده است. همچنین در این مطالعه فقط ۵۴ بیمار بررسی شد. لذا نتایج این مطالعه بیانگر فراوانی جهش‌ها در مسلولین کل استان مازندران نیست.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد ۷/۴ درصد از نمونه‌ها به دو داروی درمان کننده بیماری سل مقاوم بودند. همچنین روش Line Probe Assay در شناسایی مقاومت به چندین داروی ضدسل، روشی سریع و مناسب ارزیابی شد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی مصوب مرکز تحقیقات تالاسمی دانشگاه علوم پزشکی مازندران بود. بدین‌وسیله از همکاران محترم مرکز تحقیقات تالاسمی دانشگاه علوم پزشکی مازندران و کارکنان گروه آزمایشگاهی فجر ساری که در اجرای این مطالعه ما را یاری نمودند؛ تقدیر و تشکر به‌عمل می‌آید.

References

1. Conaty SJ, Hayward AC, Story A, Glynn JR, Drobniewski FA, Watson JM. Explaining risk factors for drug-resistant tuberculosis in England and Wales: contribution of primary and secondary drug resistance. Epidemiol Infect. 2004 Dec;132(6):1099-108.

2. Donoghue HD, Lee OYC, Minnikin DE, Besra GS, Taylor JH, Spigelman M. Tuberculosis in Dr Granville's mummy: a molecular re-examination of the earliest known Egyptian mummy to be scientifically examined and given a medical diagnosis. Proc Biol Sci. 2010 Jan; 277(1678): 51-6.

3. Jayachandran R, Scherr N, Pieters J. Elimination of intracellularly residing Mycobacterium tuberculosis through targeting of host and bacterial signaling mechanisms. Expert Rev Anti Infect Ther. 2012 Sep;10(9):1007-22.

4. Ahmad S, Mokaddas E. Recent advances in the diagnosis and treatment of multidrug-resistant tuberculosis. Respir Med. 2009 Dec; 103(12):1777-90.

5. Chiang CY, Centis R, Migliori GB. Drug-resistant tuberculosis: past, present, future. Respirology. 2010 Apr;15(3):413-32.

6. Almeida Da Silva PE, Palomino JC. Molecular basis and mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis: classical and new drugs. J Antimicrob Chemother. 2011 Jul; 66(7):1417-30.

7. Cobelens F, van Kampen S, Ochodo E, Atun R, Lienhardt C. Research on implementation of interventions in tuberculosis control in low- and middle-income countries: a systematic review. PLoS ONE. 2012;9(12):e1001358.

8. Gray JM, Cohn DL. Tuberculosis and HIV coinfection. Semin Respir Crit Care Med. 2013 Feb;34(1):32-43.

9. Migliori GB, Dheda K, Centis R, Mwaba P, Bates M, O'Grady J, et al. Review of multidrug-resistant and extensively drug-resistant TB: global perspectives with a focus on sub-Saharan Africa. Trop

Med Int Health. 2010 Sep;15(9):1052-66.

10. Asgharzadeh M, Jahantabi A, Shahbabian K, Nahaei M, Rafi A. [Detection of Ethambutol - resistant Mycobacterium tuberculosis strains by MAS-PCR method and comparison with Proportion]. J Mazandaran Univ Med Sci. 2007; 17 (1): 50-6. [Article in Persian]

11. Raizada N, Sachdeva KS, Chauhan DS, Malhotra B, Reddy K, Dave PV, et al. A multi-site validation in India of the line probe assay for the rapid diagnosis of multi-drug resistant tuberculosis directly from sputum specimens. PLoS ONE. 2014;9(2): e88626.

12. Jnawali HN, Hwang SC, Park YK, Kim H, Lee YS, Chung GT, et al. Characterization of mutations in multi- and extensive drug resistance among strains of Mycobacterium tuberculosis clinical isolates in Republic of Korea. Diagn Microbiol Infect Dis. 2013 Jun; 76(2):187-96.

13. Spies FS, von Groll A, Ribeiro AW, Ramos DF, Ribeiro MO, Dalla Costa ER, et al. Biological cost in Mycobacterium tuberculosis with mutations in the rpsL, rrs, rpoB, and katG genes. Tuberculosis (Edinb). 2013 Mar; 93(2):150-4.

14. Isakova ZhT, Pak OA, Iusupova EIu, Myrzaliev BB, Chubakov TCh, Goncharova ZA, et al. [Use of biological microchips in the determination of drug-resistance of Mycobacterium tuberculosis to rifampicin]. Probl Tuberk Bolezn Legk. 2005;(8):50-3. [Article in Russian]

15. Romay Z, Arráiz N, Fuenmayor A, Ramírez C, Rojas L, París R. [Detection of S315T mutation in the katg gene as a strategy for identification of isoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosis in a reference laboratory]. Rev Chilena Infectol. 2012 Dec;29(6):607-13. [Article in Spanish]

16. Khosravi AD, Goodarzi H, Alavi SM. Detection of genomic mutations in katG, inhA and rpoB genes of Mycobacterium tuberculosis isolates using polymerase chain reaction and multiplex allele-specific polymerase chain reaction. Braz J Infect Dis. 2012 Jan-Feb;16(1):57-62.

17. Tahmasebi P, Farnia P, Sheikholslami F, Velayati A. Rapid identification of extensively and extremely drug resistant tuberculosis from multidrug resistant strains; using PCR-RFLP and PCR-SSCP. Iran J Microbiol. 2012 Dec;4(4):165-70.

18. Doustdar F, Khosravi A, Farnia P, Bahremand A. [Characterization of rpoB mutations in rifampin-resistant isolates of Mycobacterium tuberculosis cultured from the Iranian patients]. Iran J Med Microbiol. 2007; 1(1):17-22. [Article in Persian]

19. Javid SN, Ghaemi E, Amirmozaffari N, Rafiee S, Moradi A, Dadgar T. [Detection of Isoniazid and Rifampin Resistant Strain of Mycobacterium Tuberculosis Isolated from patients in Golestan province (North of Iran)]. Med Lab J. 2009;3(1):1-8. [Article in Persian]

20. Pourhajibagher M, Nasrollahi M, Musavi S, Rahimi-Esboei B, Ghorbani Pashakolaei A. [Drug Resistance in Mycobacterium Tuberculosis Isolates to Isoniazid and Rifampin]. J Babol Univ Med Sci. 2012; 14(3):66-72. [Article in Persian]

21. Zaker Bostanabad S, Shekarabei M, Nojoumi SA, Jabbarzadeh E, Ghalami M, Molla Kazemi V, et al. Study of genetic evolution in Mycobacterium tuberculosis isolates from patients with active pulmonary tuberculosis in the Iran and Belarus. Open Microbiol J. 2011;5:32-42.

22. Pozzi G, Meloni M, Iona E, Orrù G, Thoresen OF, Ricci ML, et al. rpoB mutations in multidrug-resistant strains of Mycobacterium tuberculosis isolated in Italy. J Clin Microbiol. 1999 Apr; 37(4):1197-9.

23. Qian L, Abe C, Lin TP, Yu MC, Cho SN, Wang S, Douglas JT. rpoB Genotypes of Mycobacterium tuberculosis Beijing Family Isolates from East Asian Countries. J Clin Microbiol. 2002 Mar; 40(3): 1091-4.

24. Khalilzadeh S, Boloorsaz MR, Safavi A, Farnia P, Velayati AA. Primary and acquired drug resistance in childhood tuberculosis. East Mediterr Health J. 2006 Nov; 12(6):909-14.

25. Namaei MH, Sadeghian A, Naderinasab M, Ziaee M. Prevalence of primary drug resistant Mycobacterium tuberculosis in Mashhad, Iran. Indian J Med Res. 2006 Jul; 124:77-80.

Original Paper

Detection of common mutations causing drug resistance to mycobacterium tuberculosis strains among patients with tuberculosis using line probe assay method

Babamahmoodi F (M.D)[1], Mahdavi MR (Ph.D)[2], Talebi B (M.Sc)[3], Jalali H (B.Sc)[4] Roshan P (M.Sc)[5], Mahdavi M (M.D)*[6]

[1]Associate Professor, Department of Infectious Diseases and Tropical Medicine, Antimicrobial Resistance Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran. [2]Assistant Professor, Department of Laboratory Medicine, Thalassemia Research Center, Hemoglobinopathy Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran. [3]Msc in Cell and Molecular Biology, Sina Mehr Research Center, Sari, Iran. [4]B.Sc in Laboratory Medicine, Thalassemia Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran. [5]Msc in Immunology, Sina Mehr Research Center, Sari, Iran. [6]Veterinary Medicine, Sina Mehr Research Center, Sari, Iran.

Abstract

Background and Objective: Drug resistance to tuberculosis and especially multiple drug resistance tuberculosis (MDR-TB) variants are a serious problem in tuberculosis patients and make difficulties in controlling the disease. This study was coducted for detection of common mutations causing drug resistance of mycobacterium tuberculosis strains among tuberculosis patients using line probe assay method.

Method: In this descriptive study, fifty four sputum samples of tuberculosis patients were randomly selected in health centers of Mazandaran, northern Iran during 2012. After culturing of sputum samples on Lowenstein–Jensen medium, genomic DNA was extracted from colonies using CTAB method. Molecular analysis of mutations causing resistance to five different antibiotics including Isiniazide, Rifampin, Sterptomycine, Amicasin / Canamycine, Kinolon were performed using long probe assay (LPA) method.

Results: Out of 54 sputum samples, three (5.5%), three (5.5%), four (7.4%) were resistance to Kinolon, Amicasin / Canamycine and Sterptomycine, respectively. Mutation in KATG was seen in 2 samples resistant to Isiniazide. Mutation in rpoB 516 was seen in 3 samples resistant to Rifampin. Four samples (7.4%) were resistant to the two anti-tuberculosis antibiotics, while three samples were resistant to Sterptomycine and Kinolon and one sample was resistant to Rifampin and Canamycine.

Conclusion: 7.4% of sputum samples were resistant to the two anti- tuberculosis antibiotics. Line probe assay is a rapid and suitable method for detecting tuberculosis drug resistance.

Keywords: Tuberculosis, Multiple drug resistance, Long probe assay, Mutation

*** Corresponding Author: Mahdavi M (M.D), E-mail: mahdavi899@gmail.com**

Received 23 Feb 2014 **Revised** 27 Apr 2014 **Accepted** 12 May 2014

This paper should be cited as: Babamahmoodi F, Mahdavi MR, Talebi B, Jalali H, Roshan P, Mahdavi M. [Detection of common mutations causing drug resistance to mycobacterium tuberculosis strains among patients with tuberculosis using line probe assay method]. J Gorgan Uni Med Sci. 2015; 16(4): 99-105. [Article in Persian]