مقاله پژوهشی

تشخیص سریع حساسیت به اتامبوتول در سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس ایزوله شده از بیماران مسلول با روش مولکولی PCR-RFLP

معصومه طاهراحمدی[۱]، اعظم احمدی[۲]، مانا شجاع‌پور[۳]، راضیه نظری[۴]، رضا مودب[۵]، محمد ارجمندزادگان[۶]*

تاریخ دریافت 1392/04/11 تاریخ پذیرش 1392/06/18

چکیده

پیش زمینه و هدف: اتامبوتول یکی از داروهای کلیدی جهت درمان بیماری سل بوده و بروز مقاومت به آن به صورت فزاینده‌ای گزارش می‌شود. در مطالعه حاضر روش (Restriction Fragment Length PCR-RFLP Polymorphism) در شناسایی سریع مقاومت سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس نسبت به اتامبوتول مورد بررسی قرار گرفته است.

روش بررسی: در این مطالعه از127 سویه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در مرکز تحقیقات سل اراک، ۶۰ سویه انتخاب و مورد بررسی قرار گرفتند. جداسازی DNAبا استفاده از روشChelex100 انجام گردید. PCR با کمک پرایمرهای اختصاصی برای آمپلی فیکاسیون قطعه ۱۶۷bp ژن embB اجرا گردید. محصول PCR با کمک آنزیم‌های HaeIII و NlaII مورد RFLP قرار گرفت و الگوی باندها تعیین شد. قطعه مورد نظر در تعدادی از نمونه‌ها تعیین ترادف (سکوئنس) شده و به‌عنوان استاندارد طلایی با روش ارائه شده مقایسه گردید.

یافته‌ها: از ۶۰ سویه مورد مطالعه، ۴۳ سویه از نظر فنوتیپی مقاوم به اتامبوتول و ۱۷ سویه حساس به این دارو بودند. انجام PCR، باند ۱۶۷ را ارائه نمود که نشان‌دهنده انتخاب صحیح پرایمرها و تعیین برنامه مناسب آمپلی فیکاسیون بود. از ۴۳ سویه مقاوم، ۱۹ سویه با روش RFLP دارای موتاسیون در کدون ATG-Met ۳۰۶ و ۲۴ سویه غیر موتان تشخیص داده شدند. تمامی ۱۷ سویه حساس، غیر موتان بودند. این روش برای تعیین سویه حساس دارای حساسیت و ویژگی ۱۰۰درصد می‌باشد. نتایج تعیین توالی، انطباق کامل با نتایج PCR-RFLP را نشان داد.

نتیجه گیری: نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که روش PCR-RFLP می‌تواند به عنوان یک روش ساده و سریع برای تعیین حساسیت به اتامبوتول در سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مورد استفاده قرار گیرد.

کلید واژه‌ها: اتامبوتول، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، PCR-RFLP

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و چهارم، شماره هشتم، ص ۵۷۶-۵۶۶، آبان ۱۳۹۲

آدرس مکاتبه: مرکز تحقیقات سل و عفونی کودکان، گروه میکروب شناسی و ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، تلفن: ۹۸۸۶۱۴۱۷۳۵۰۲+

Email: mmatinam81@yahoo.com

مقدمه

با کشف میکروب سل در سال ۱۸۸۲ توسط رابرت کخ[۷]، بشر امیدوار شد که بیماری سل کنترل و در نهایت ریشه کن خواهد شد. اما امروزه با گذشت بیش از ۵۰ سال از کشف اولین داروی ضد سل و به‌کارگیری انواع تجهیزات تشخیصی پیشرفته و دسترسی به انواع داروهای ضد سل جدید، بیماری

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد، میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، گروه میکروبیولوژی

[۲] دانشجوی کارشناسی ارشد، زیست سلولی و مولکولی، مرکز تحقیقات سل و عفونی کودکان، دانشگاه علوم پزشکی اراک

[۳] دانشجوی دکتری تخصصی، پزشکی مولکولی، مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی اراک

[۴] استادیار،دکتری تخصصی میکروب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، گروه میکروبیولوژی

[۵] استادیار، مرکز تحقیقات سل و ریه، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

[۶] استادیار،دکتری تخصصی میکروب شناسی، مرکز تحقیقات سل و عفونی کودکان و گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک (نویسنده مسئول)

[۷] Robert Koch

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-03-28]

سل TB (Tuberculosis) همچنان یکی از علل اصلی مرگ و میر در دنیای امروز می‌باشد. به‌طوری‌که در هر ثانیه یک نفر به باسیل سل آلوده می‌شود (۱). تقریباً یک سوم جمعیت جهان به باکتری مایکوباکتریوم توبرکلوزیس آلوده بوده و حدود ۲ میلیون نفر سالیانه در اثر بیماری سل جان خود را از دست می‌دهند. طی سال‌های اخیر، بروز و گسترش مقاومت داروئی، این بیماری را در ردیف ایدز و هپاتیت در اولویت‌های سازمان بهداشت جهانی قرار داده است(۲).

امروزه سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به دارو (DR-TB) و یا مقاوم به چند دارو (MDR-TB) به علت ناکافی بودن برنامه‌های کنترل سل و استفاده نامنظم از داروهای ضد سلی در حال افزایش هستند. لذا تشخیص سریع مقاومت داروئی برای جلوگیری از انتشار باکتری‌های مقاوم به دارو یک راهکار مهم در کنترل بیماری می‌باشد (۳).

از نقطه نظر میکروب شناسی، مقاومت دارویی به دلیل موتاسیون/جهش ژنتیکی در ژنوم باسیل در حضور دارو اتفاق می‌افتد. درمان ناقص یا اشتباه اجازه می‌دهد که باسیل‌های جهش یافته‌ای که به داروها مقاوم شده‌اند به سوش غالب در بدن فرد مبتلا تبدیل شوند.به این ترتیب که باسیل‌های حساس به دارو در اثر داروهای ضدسل مصرفی از بین رفته، اما موتانت‌های مقاوم در حضور آنتی‌بیوتیک، زنده مانده، تکثیر یافته و به سوش غالب در بدن بیمار مبدل می‌شوند (۴).

از داروهای خط اول در درمان بیماری سل اتامبوتول است که در ترکیب با دیگر داروها به کار می‌رود. اتامبوتول با آنزیم‌های آرابینوزیل ترانسفرازهای دیواره سلولی مایکوباکتری‌ها واکنش می‌دهد و از سنتز آرابینوگالاکتان که برای ساختن دیواره سلولی لازم است جلوگیری می‌کنند. این ماده منجر به تجمع اسید مایکولیک می‌گردد و از ورود مایکولیک اسید به دیواره مایکوباکتریوم ممانعت می‌کند و موجب مرگ سلول می‌شود. مایکوباکتریوم مکانیسم‌های مختلفی را برای فرار از کشته شدن توسط دارو به کار می‌گیرد، یکی از این مکانیسم‌ها ایجاد موتاسیون در ژن‌هایی می‌باشد که پروتئین‌های هدف دارو را کد می‌کنند. اپرونembCAB مایکوباکتریوم، حاوی سه ژن پیوسته embA، embB، embC است که سه همولوگ آرابینوزیل ترانسفراز را کد می‌کنند. ژن embB، ژنی است که آرابینوزیل ترانسفراز را کد می‌کند که پروتئین هدف اتامبوتول می‌باشد (۵، ۶، ۷). ایجاد موتاسیون در embB موجب مقاومت به اتامبوتول می‌گردد و بیشتر موتاسیون‌ها در کدون ۳۰۶ embB رخ می‌دهد (۸، ۹).

این موتاسیون‌ها منجر به جایگزینی اسید آمینه متیونین با سه اسید آمینه والین، لوسین و ایزولوسین می‌شوند. پنج نوع جهش مختلف در این کدون‌ها یافت شده است که این موتاسیون‌ها در باز اول و سوم کدون ۳۰۶ ژن embB رخ می‌دهد که این جهش‌ها عبارتند از: ATG به GTG، CTG، ATA، ATC یا ATT (۱۰).

هدف از این تحقیق، استفاده از روش مولکولی سریع PCR-RFLP برای تعیین حساسیت به داروی اتامبوتول می‌باشد که موتاسیون در باز اول و سوم کدون embB۳۰۶ را مورد بررسی قرار دهد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق، تعداد ۶۰ سویه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس که به روش استاندارد طلائی کشت (proportion) مقاومت یا حساسیت به اتامبوتول در آن‌ها تعیین شده بود، مورد استفاده قرار گرفتند. علاوه بر این، سویه استاندارد H37Rv نیز به همین روش مورد بررسی قرار گرفت.

استخراج DNA

جهت استخراج DNA باکتری ازCHELEX 100 استفاده گردید. بدین منظور مقدار 0/07gr، از CHELEX 100در ۲۷۰µl بافر TAE1X قرار داده شده و به آن چند کلنی تازه باکتری اضافه می‌شود، سپس به شدت ورتکس شده و در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ دقیقه نگه‌داری می‌شود. طی این مدت، دیواره سلولی تخریب گشته و DNA آزاد می‌شود و پس از آن مجدداً ورتکس شدید انجام شده و طی ۳ مرحله ذرات CHELEX به طور کامل جدا می‌شود. باقی ماندن مقادیر اندک ذرات CHELEX می‌تواند برای PCR ممانعت کننده باشد. لذا پس از حرارت دهی و ورتکس به مدت ۱۰دقیقه در ۱۴۰۰۰دور، سانتریفوژ انجام شده و سپس محلول رویی جدا شده و مجدداً دوبار دیگر سانتریفوژ می‌شود. سوپرناتانت نهایی، به عنوان DNA در PCR مورد استفاده قرار می‌گیرد.

انجام PCR:

به منظور بررسی وجود موتاسیون در ژن embB، DNA استخراج شده به همراه پرایمرهای اختصاصی EMB306A، EMB306B (تهیه شده توسط شرکت سیناژن، ایران) در واکنش PCR وارد گردیده و تکثیر بخش مورد نظر از ژن مذکور در دستگاه ترمال سایکلر(به صورت Touch Down) انجام شد (۱۰).

PCR-RFLP:

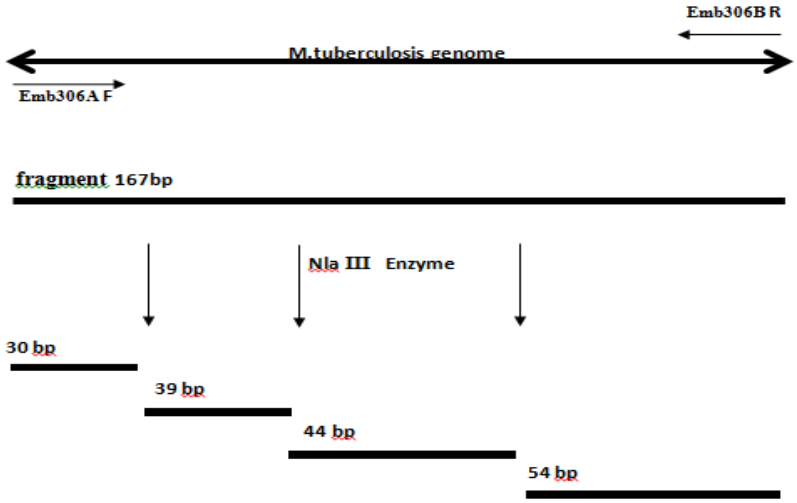
جهت شناسائی موتاسیون‌های موجود در ژن embB، و به منظور تشخیص سویه‌های حساس از سویه‌های مقاوم به اتامبوتول، محصول PCR جهت انجام برش آنزیمی(تعیین محل موتاسیون) به دو روش مورد استفاده قرار گرفت:

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-03-28]

(الف): استفاده از آنزیم HaeIII: این آنزیم می‌تواند به صورت نشان داده شده در شکل(۱)، در فراگمنت مورد مطالعه برش ایجاد نماید لذا از این آنزیم برای تعیین موتاسیون در کدون ۳۰۶ استفاده به عمل آمد.

شکل شماره 1: محل اثر آنزیم برش دهنده HaeIII در صورت وجود موتاسیون در کدون 306

(ب): استفاده از آنزیم NlaIII: برش ایجاد شده توسط این آنزیم در شکل (۲) قابل مشاهده است. رخداد موتاسیون در کدون ۳۰۶ باعث عدم شناسایی محل توسط آنزیم و عدم ایجاد برش می‌شود.



شکل شماره (۲): محل اثر آنزیم NlaIII در صورت عدم وجود موتاسیون در کدون ۳۰۶

محصولات RFLP را جهت تعیین اندازه‌های قطعات هضم شده حاصله، به طور همزمان در ژل آگارز ۱/۸درصد با ولتاژ پایین (۷۰ ولت) به مدت یک ساعت و همچنین با ژل پلی آکریلامید ۸درصد الکتروفورز شدند. پس از انجام الکتروفورز باندهای مربوطه مشاهده و عکس‌برداری شد. برای اطمینان از یافته‌ها، برخی نتایج دو تا سه بار تکرار شدند.

تعیین توالی (سکوئنس):

برای ارزیابی روش تعیین موتاسیون با کمک PCR-RFLP، از روش تعیین توالی (از طریق شرکت سیناکلون تحویل شرکت انگلستان داده شد که توسط دستگاهApplied Biosystem) تعیین توالی شد، به‌عنوان استاندارد طلایی استفاده به عمل آمد.

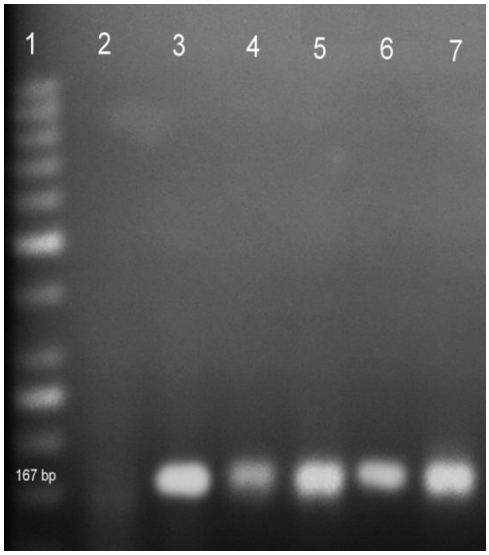
یافته‌ها

سویه‌ها و نتایج PCR:

از بین ۶۰ سویه مورد بررسی، ۴۳ سویه که از نظر فنوتیپی مقاوم و ۱۷ سویه که حساس به اتامبوتول بودند، انتخاب شدند. در مجموع از میان ۴۳ نمونه مقاوم به اتامبوتول تعداد ۳۰ نمونه XDR و ۱۳ نمونه MDR بودند.

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-03-28]

انجام PCR ژن embB روی تمامی ۶۰ نمونه مورد مطالعه و سویه استاندارد H37Rv، باند ۱۶۷bp را ارائه نمود. تصویر شماره۳ الگوی الکتروفورز ژن embB را نشان می‌دهد.



شکل شماره (۳): ژل آگارز- الکتروفورز محصول PCR ژن embB(167bp) در ۷ ایزوله‌ی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به همراه سویه استاندارد H37Rv

ستون (۱): سایز مارکر (۵۰ bp)

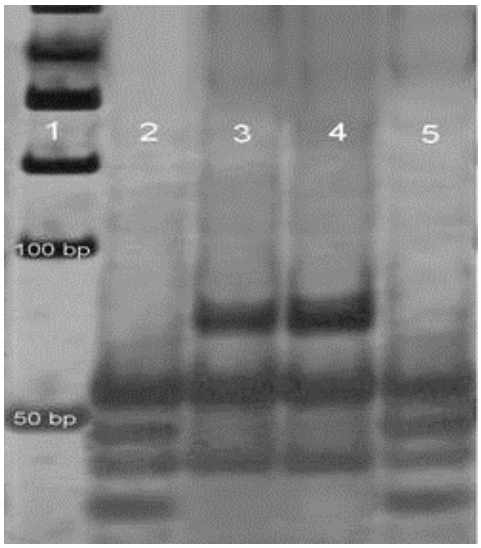
ستون (۲): کنترل منفی (فاقدDNA)

ستون‌های (۳، ۴، ۵، ۶، ۷): محصول PCR با باند (167bp)

نتایج PCR-RFLP:

(الف) برش با کمک آنزیم NlaIII

در این روش محصول برش آنزیمی به کمک RFLP همان‌گونه که با نرم‌افزار Genetyx پیش‌بینی شده بود، برای سویه‌های مقاوم ایجاد باندهای ۳۹، ۷۴، ۵۴ و برای سویه‌های حساس ایجاد باندهای ۳۰، ۳۹، ۴۴، ۵۴ را نمود. این روش برای ۲۳ سویه انجام ولی با توجه به سبک بودن باندها و احتمال رخداد خطا در روش روتین، کنار گذاشته شد. به شکل زیر مربوط به آنزیم (NlaIII) توجه شود.



شکل شماره (۴): ژل پلی آکریل آمید ۸درصد- الگوهای RFLP ژن embB پس از هضم آنزیمی توسط NlaIII

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-03-28]

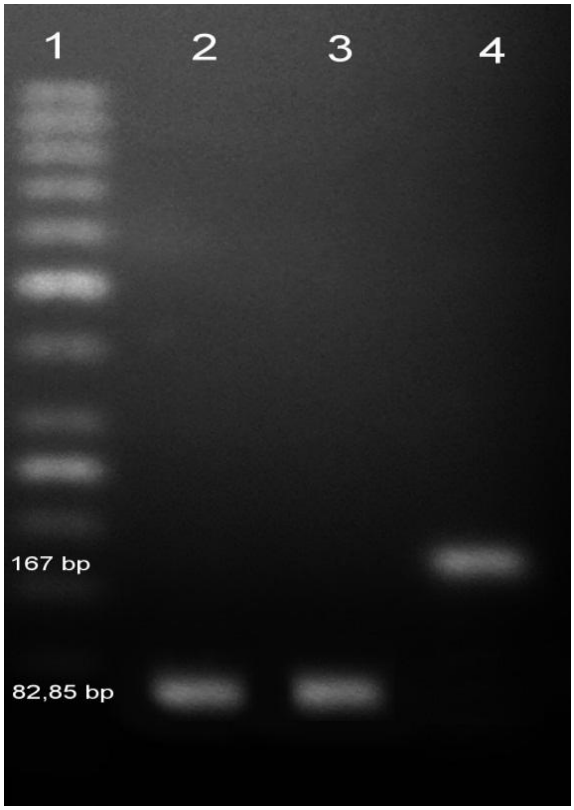
ستون (۱): سایز مارکر (۵۰bp)

ستون (۳، ۴): سویه‌های مقاوم به EMB با باند (۳۹، ۷۴، ۵۴)

ستون (۲، ۵): سویه‌های حساس به EMB با باند (۳۰، ۳۹، ۴۴، ۵۴)

(ب) برش با کمک آنزیم HaeIII

در این روش، نتایج بدست آمده بیانگر امکان پذیری تمایز خوب الگوی سویه‌های حساس و مقاوم با کمک این آنزیم در کار روتین بود. بدین ترتیب که سویه‌های حساس باند (bp ۸۲ و ۸۵) و سویه‌های مقاوم باند 167bp را تشکیل می‌دهند. در این روش دو باند ۸۲bp و۸۵ عملاً یک باند محسوب می‌شوند، بدین ترتیب به جای استفاده از روش آکریل آمید که زمان بر و پرزحمت می‌باشد، می‌توان به سادگی از روش آگارز برای بررسی نتایج استفاده نمود.



شکل شماره (۵): ژل آگاروز- الگوهای RFLP ژن embB پس از هضم آنزیمی HaeIII.

ستون (۱): سایز مارکر (۵۰bp)

ستون (۲، ۳): سویه‌های حساس با دو باند (85 و82bp)

ستون (۴): سویه مقاوم

۶۰ سویه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با روش PCR-RFLP مورد بررسی قرار گرفتند. از ۴۳ سویه مقاوم، ۱۹ سویه با این روش دارای موتاسیون در کدون ATG-Met ۳۰۶ و ۲۴ سویه غیر موتان تشخیص داده شدند. تمامی ۱۷ سویه حساس، غیر موتان بودند. این روش برای تعیین سویه مقاوم حساسیت ۴۴درصد و ویژگی ۱۰۰درصد محاسبه گردید.

با کمک این روش مشخص گردید که تمامی ۱۷ سویه حساس، غیر موتان بودند. ضمن اینکه سویه H37Rv نیز با این روش غیر موتان تشخیص داده شد. لذا این روش برای تعیین سویه حساس دارای حساسیت و ویژگی ۱۰۰درصد می‌باشد.

بدین معنی که تست قادر است با صحت ۱۰۰درصد، سویه حساس را تعیین نماید که این مسئله از دیدگاه بالینی بسیار ارزشمند است.

نتایج سکوئنس:

برای ارزیابی صحت نتایج PCR-RFLP، از روش تعیین توالی به‌عنوان استاندارد طلایی بخش مولکولی استفاده شد. انطباق کامل (۱۰۰درصد) نتایج سکوئنس با PCR-RFLP نشانگر دقت روش مورد استفاده از دیدگاه مولکولی بود.

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-03-28]

بحث

در این تحقیق، روشی عملیاتی برای اجرا به صورت روتین جهت تعیین مولکولی حساسیت و مقاومت به اتامبوتول ارائه گردید.

به علت گسترش روز افزون سل مقاوم به دارو، و با توجه به متد درمانی سل، فراهم نمودن روش‌هایی برای تشخیص سریع حساسیت یا مقاومت سویه‌های کلینیکی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به دارو امری ضروری به نظر می‌رسد.

بر اساس پروتکل درمانی سل، پس از ۴ ماه تجویز داروهای خط اول، در صورت احتمال رخداد مقاومت (مثبت ماندن تست ماهیانه خلط)، آزمایش تعیین مقاومت دارویی انجام می‌شود. انجام این تست نیاز به کشت باکتری (یک ماه) و بررسی مقاومت (یک ماه دیگر) دارد بنابراین روشی که بتواند در چند ساعت مقاومت یا حساسیت به این آنتی‌بیوتیک را تعیین کند بسیار ارزشمند خواهد بود.

با توجه به تعداد نسبتاً زیاد نمونه‌های بیماران مسلول در کار روتین آزمایشگاه‌های مرکزی و ضرورت تعیین مقاومت دارویی به ویژه در روزهای اول، ساده سازی هر چه بیشتر تست و کاهش رخداد احتمال خطا در راه اندازی هر روش بسیار اهمیت داشته و از نظر جلوگیری از گسترش سویه‌های مقاوم در جامعه، تعیین کننده است. بدین ترتیب ارائه روش مناسب و سریع برای شناسائی چنین مقاومت‌هایی، باعث کاهش انتشار سویه‌های مقاوم به دارو می‌شود.

روش اصلی برای بررسی موتاسیون در ژن‌های مرتبط با مقاومت، تعیین موتاسیون‌های احتمالی با کمک تعیین توالی[1] است. این روش هزینه بر و پر زحمت بوده و با توجه به عدم امکان خرید دستگاه و تأمین پرسنل متخصص در تمام مراکز، لازم است به مراکز خاص ارسال شود که اغلب زمان بر نیز می‌باشد. از این روش نمی‌توان در اجرای روتین استفاده نمود.

استفاده از کیت‌ها، اغلب نیاز به تأمین دستگاه‌های پرهزینه همراه داشته و وابستگی همیشگی آزمایشگاه را به کیت مصرفی به دنبال دارند. ضمن اینکه هزینه اجرای تست را نیز بسیار افزایش می‌دهند. روش‌های مبتنی بر کشت مایع (مثل MGIT) نیز پرهزینه بوده و امکان استفاده از آن‌ها به صورت روتین وجود ندارد لذا روش‌های ساده‌تر در استفاده روتین ترجیح داده می‌شوند.

در اجرای روتین، روش‌های مولکولی موسوم به In-house، که شامل انواع روش‌های PCR می‌باشند، مناسب‌تر به نظر می‌رسند. این روش‌ها هیچ‌گونه وابستگی ایجاد نکرده و بر اساس تغییر شرایط به سادگی قابل اصلاح و تغییر هستند.

با توجه به نتایج این تحقیق، روش PCR-RFLP ارائه شده می‌تواند به عنوان یک روش ساده و سریع برای تعیین حساسیت به اتامبوتول در سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مورد استفاده قرار گیرد.

بر اساس تحقیقات احمد، کدون embB497پوشش دهنده درصد پایینی از سویه‌های مقاوم می‌باشد(۱). آنجل[2]، خین شن[3]،کلودیا پلینک[4]، مانزور[5] (۸-۵) و تعداد زیادی از دیگر محققین، بررسی موتاسیون این ژن در سویه‌های کلینیکی را منحصراً با بررسی کدون embB306 انجام داده‌اند. لذا با هدف کاهش ساده سازی هر چه بیشتر روش و امکان پذیر نمودن آن در اجرای روتین، از بررسی کدون فوق (embB497) صرف نظر شده و در این تحقیق روی کدون ۳۰۶ تمرکز شد.

برای اجرای روش، از دو آنزیم اندونوکلئاز بدین منظور می‌توان استفاده کرد: NlaIII و HaeIII. که در این تحقیق هر دو روش مورد استفاده قرار گرفت.

در ادامه کار روش NlaIII به دو دلیل کنار گذاشته شد. ۱) ایجاد باندهای بسیار سبک و به تعداد زیاد (bp ۳۰، ۳۹، ۴۴، ۵۴) و ۲) ضرورت استفاده از ژل پلی آکریل آمید جهت الکتروفورز.

روش استفاده از HaeIII مبتنی بر بررسی دو باند ۸۲bp و ۸۵ در سویه‌های حساس (و تشخیص تنها یک باند ۱۶۷bp برای سویه مقاوم) می‌باشد. در این روش استفاده از ژل پلی آکریل آمید، با توجه به کاهش توان پرسنل در اجرای روتین و ضمناً پرخطر بودن آکریل آمید، مطلوب نبوده و در این تحقیق روی حذف آن تاکید شد.

لذا در ادامه کار، روش HaeIII با توجه به سهولت تفکیک سویه‌های مقاوم و حساس و امکان استفاده از ژل آگارز ترجیح داده شد و به‌عنوان روش روتین پیشنهاد می‌شود.

طی بررسی منابع علمی، مطالعه‌ای در داخل کشور روی این ژن در سویه‌های کلینیکی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با کمک روشPCR-RFLP یافت نشد. در سال ۱۳۸۶ در تبریز مطالعه‌ای روی چهار سویه مقاوم به اتامبوتول با کمک MAS-PCR انجام و کارایی آن مشخص گردید (۱۱).

دکتر احمد در سال ۲۰۰۴، روش PCR-RFLP را برای تشخیص موتاسیون ارائه نمود که در آن از ۷ سویه مقاوم به اتامبوتول مورد بررسی، ۴ سویه دارای موتاسیون در این ژن

[1] Sequencing

[2] Angela
[3] Xin Shen,
[4] Claudia Plinke
[5] Manzour

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-03-28]

تشخیص داده شدند (۱). در پژوهش حاضر این روش روی ۴۳ سویه مقاوم با موفقیت مورد استفاده قرار گرفت.

عدم انطباق دقیق نتایج کشت (یعنی فنوتیپی) با نتایج مولکولی (ژنوتیپی - تعیین رخداد موتاسیون در کدون‌های مختلف ژن embB) در تعیین مقاومت به داروی اتامبوتول توسط سایر محققین (جدول ۱) اثبات شده است. ولی با توجه به اهمیت این دارو و ضرورت سرعت عمل در تشخیص مقاومت، در منابع مختلف، ارائه نتایج با هر میزان دقت، به عدم وجود نتیجه در ماه‌های اول درمان ترجیح داده شده است.

در مطالعه Huang در سال ۲۰۱۱، تعداد ۱۶۲ سویه مقاوم به اتامبوتول و ۷۲ سویه حساس با کمک کیت مورد بررسی قرار گرفت. که ۹/۳درصد سویه‌های مقاوم، فاقد موتاسیون در ژنembB بودند. از بین ۷۲ سویه حساسی که فاقد موتاسیون در کدون ۳۰۶ بودند سه ایزوله دارای موتاسیون در کدون ۲۹۷ و ۳۲۸ بودند (جدول ۱). میزان انطباق بین سنجش فنوتیپی کشت و دو سنجش ژنوتیپی برای مقاومت به اتامبوتول ۶۸/۴درصد با کمک کیت GenoType MTBDRsl و ۹۲/۳درصد در سکوئنس بود. در این رابطه از ۱۶۲ سویه مقاوم ۵۶/۲درصد موتاسیون مرتبط با مقاومت به اتامبوتول توسط کیت و با روش سکوئنس ۹۰/۸درصد تشخیص داده شد. نتایج بررسی ما نیز تایید کننده تحقیقات Huang می‌باشد بدین مفهوم که بررسی موردی با روش کیت و نیز روش in-hous این تحقیق تنها تعدادی از کدون‌ها را پوشش می‌دهد، در صورتی که روش سکوئنس کل موتاسیون در کل ژن را بررسی می‌کند. لذا دقت بیشتری دارد. مسئله اصلی در تست‌های سریع تشخیص مقاومت دارویی سل، سرعت عملکرد و هزینه بری کم می‌باشد. با توجه به تاکید تحقیقات مختلف می‌توان گفت که روش‌های in-hous و نیز کیت‌ها پاسخگوی نیاز پزشک در تعیین مقاومت سویه‌های جدا شده از بیمار می‌باشد. لذا تاکید این تحقیق بر استفاده از روش PCR-RFLP قرار گرفت.

بر اساس نظر همین محقق، محدودیت‌های متعددی در مورد استفاده از آزمون GenoType در تشخیص بالینی وجود دارد. از جمله هزینه‌های بالا و حساسیت پایین در تشخیص مقاومت، علاوه بر این کیت GenoType نیاز به تکثیر DNA و مراحل رنگ آمیزی دارند که به دلیل دستگاه‌های مختلف تکثیر و زمان رنگ آمیزی متنوع، ممکن است تفاسیر مختلفی از نتایج حاصل شود. ضمن اینکه الگوی باندهای حاصل از آزمون GenoType همیشه آشکار نیست و بنابراین به تکنسین آموزش دیده برای تفسیر نتایج آزمون نیاز است (۱۲).

Florence در سال ۲۰۱۰، ۵۲ سویه کلینیکی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس را با روش MTBDRsl و تعیین توالی DNA بررسی کرد. حساسیت و ویژگی آزمون MTBDRsl برای اتامبوتول به ترتیب ۵۷درصد و ۹۲درصد بود. آنالیز، نتایج متناقضی را نشان داد، در میان ۲۸ سویه مقاوم به ETB، ۱۶ سویه، جهش در ژن embB را گزارش کردند. در مقابل، ۱۲ سویه مقاوم به ETB باقی مانده (۴۳درصد) هیچ جهشی در embB به وسیله تعیین توالی DNA و الگوی تیپ وحشی به دست آمده از سنجش MTBDRsl نشان ندادند. در مجموع، آزمون MTBDRsl (۵۷درصد) سویه‌های مقاوم به ETB را شناسایی می‌کند. همچنین در میان ۲۴ سویه حساس به ETB، 22 مورد هیچ جهشی در کدون ۳۰۶ ژن embB نداشتند و ۲ سویه حساس به ETB با جهش همراه بودند (۱۳).

در مطالعه حاضر از میان ۴۳ سویه مقاوم به اتامبوتول، ۱۹ سویه با این روش دارای موتاسیون و ۲۴ سویه غیر موتان تشخیص داده شده و تمامی ۱۷ سویه حساس، غیر موتان بودند. در نتیجه مشخص شد که این روش برای تعیین سویه حساس دارای حساسیت و ویژگی ۱۰۰درصد می‌باشد.

بدین ترتیب، نتایج کشت با نتایج مولکولی (تعیین رخداد موتاسیون دارای حساسیت پایین، در عین ویژگی بالا) انطباق کامل ندارند. رخداد همیشگی درصدی از خطا در تعیین سویه‌های مقاوم به روش مولکولی در تحقیقات گذشته همواره اثبات شده است (۵، ۶، ۷، ۸، ۱۳). در اغلب تحقیقات انجام شده توسط سایر محققین نیز در سویه‌های حساس موتاسیون یافت نشده است (۱۲). احمد در هر دو مطالعه ۲۰۰۴ ونیز ۲۰۰۷ خود، سویه‌های حساس را مورد بررسی مولکولی قرار داده و آن‌ها را بدون موتاسیون گزارش کرده است(۱۰، ۱۴). همین نتیجه در تحقیقات سایرین که در جدول ۱ ارائه شده‌اند، قابل مشاهده است (۱۵-۱۸).

در بررسی نتایج این تحقیق مشخص شد که از ۱۷ سویه حساس به اتامبوتول مورد مطالعه، هیچ‌کدام دارای موتاسیون در ژن embB نیستند. نتایج تعیین توالی نیز عدم رخداد موتاسیون در کل ژن را اثبات نمود که موید نتایج سایر محققین می‌باشد.

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-03-28]

جدول شماره (۱): بررسی نتایج سایر محققین در استفاده از روش‌های مولکولی. عدم انطباق فنوتیپی و ژنوتیپی و متغیر بودن ویژگی (Specificity) در تمام روش‌های مولکولی و نیز وضعیت موتاسیون در سویه‌های حساس قابل مشاهده است.

ویژگی	حساسیت	درصد انطباق	روش	تعداد کل نمونه	تعداد سویه‌های حساس	موتاسیون در کدون ۳۰۶ در سویه‌های حساس	محقق
%۱۰۰	%۶۴/۲	%۶۹/۴	MTBDRsl Test	۵۳	_	_	Kiet,2010
%۹۳/۱	%۷۸/۶	_	DNA sequencing	۳۱۴	۱۶۰	۱۴	Patricia,2011
%۹۷/۵	%۶۹/۲	_	Direct DNA Sequencing	۱۱۳	_	_	Jeong,2010
%۸۹/۰	%۹۰	_	DNA Microarray	۴۸	_	_	Yasuo Shimizu,2008
%۵۶/۲	%۹۵/۸	%۶۸/۴	GenoType MTBDRsl Test	۲۴۳	۷۲	صفر در ۳۰۶ و ۳ در سایر کدون‌ها	Huang,2011
%۹۰/۷	-	%۹۲/۳	Sequencing DNA	۲۴۳	۷۲		
%۱۰۰	%۹۶/۱	_	کشت MGIT	۱۰۱	۷۵	_	Palomino,1999
%۱۰۰	%۴۲	_	GenoType® MTBDRsl	۲۶۰	_	_	Belay,2012
%۹۹	%۹۴/۲	%۹۶/۶	Nitrate Reductase	۲۸۶	_	_	Anamika,2011
%۱۰۰	%۷۵	_	Nitrate Reductase	۹۰	_	_	Agatha,2008
%۹۲	%۵۷	_	MTBDRsl Sequencing and DNA	۵۲	۲۴	۲	Florence,2010
%۱۰۰	%۵۹	_	MTBDRsl Sequencing and DNA	۱۰۶	۴۳	_	Hillemann,2009

با توجه به بررسی منابع علمی مندرج در جدول شماره (۱) در اکثریت قریب به اتفاق مطالعات که با تعداد زیاد نمونه انجام شده‌اند به عنوان مثال: Belay در سال ۲۰۱۲ به ترتیب در۲۶۰ سویه، Pappu در ۱۲۱ سویه و Jeong در ۱۱۳ سویه هیچ سویه فنوتیپی حساسی که دارای موتاسیون در کدون ۳۰۶ باشد را یافت نکرده‌اند، که با نتایج این تحقیق کاملاً هم‌خوانی دارد. محققینی مثل Patricia و Florence در کمتر از ۱۰ سویه حساس موتاسیون در کدون ۳۰۶ را پیدا کردند.

بر اساس تحقیقات انجام شده (۲۰۰۷ و۲۰۰۴ احمد)، ارتباط مقاومت به اتامبوتول با مقاومت چندگانه به دارو و نیز ایزونیازید در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس اثبات شده است (۱۰، ۱۴).

در مطالعه احمد، آنالیز ۱۵۷ سویه انتخاب شده از مجموعه بیش از ۲۰۰۰ ایزوله بالینی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس نشان داد که در تمام سویه‌های مقاوم به اتامبوتول، مقاومت به ایزونیازید هم دیده می‌شود همچنین در سویه‌های دارای مقاومت بالا به اتامبوتول، مقاومت بالا به ایزونیازید هم دیده می‌شود. بر اساس نظر احمد، با وجود درصد پایین انطباق فنوتیپی و ژنوتیپی در مقاومت به اتامبوتول، سرعت تعیین مقاومت و مشخص کردن سویه‌های مقاوم (با احتمال وجود مقاومت چندگانه) بسیار مهم بوده و کاملاً اجرای روش تشخیص سریع مولکولی را (با وجود حساسیت حدود ۵۰درصد) توجیه می‌نماید (۱۴).

نویسنده پیشنهاد کرد که ایزوله‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس دارای جهش در katG315 بسیار شبیه سویه‌های

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-03-28]

دارای مقاومت بالای به اتامبوتول جهش یافته در embB306 هستند (۱۴). نتایج پژوهش حاضر، نظر احمد را تایید می‌نماید. به عبارت بهتر، سویه‌ای که دارای موتاسیون در ژن embB باشد، مقاوم به اتامبوتول بوده و احتمال وجود مقاومت به سایر داروها نیز در این سویه وجود دارد. لذا سویه‌های موتان embB از نظر اپیدمیولوژی باید بیشتر مورد توجه قرار گیرند.

نتیجه گیری

تحقیق حاضر ارائه کننده روش تعیین سریع سویه‌های حساس به روش مولکولی می‌باشد. در این تحقیق با ساده سازی روش و استفاده از یک کدون برای مشخص کردن سویه‌های حساس گام مهمی به سمت تعیین حساسیت اتامبوتول به روش سریع برداشته شد. نتایج این تحقیق عبارتند از:

۱- استفاده از روش سریع PCR-RFLP بجای روش‌های تعیین توالی و استفاده از کیت

۲- ساده سازی تشخیص باندها و افزایش سرعت دستیابی به پاسخ با استفاده از آنزیم HaeIII (بجای NlaIII) و نیز ژل آگارز بجای پلی آکریل آمید جهت کاهش عملیات

۳- تعیین حساس بودن سویه به اتامبوتول با حساسیت ۱۰۰درصد (اثبات عدم مقاومت بیمار به اتامبوتول در چند ساعت) و نیز تشخیص مقاومت به اتامبوتول با حساسیت ۴۴درصد (منطبق با نتایج سکوئنس)

۴- در صورت اثبات مقاوم بودن سویه به داروی اتامبوتول، باید احتمال مقاومت چندگانه دارو در نظر گرفته شود. لذا هر میزان دقت (حساسیت) در این روش می‌تواند بسیار ارزشمند باشد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش بخشی از طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی اراک و همچنین قسمتی از پایان نامه دانشجویی خانم معصومه طاهراحمدی دانشجوی دوره کارشناسی ارشد می‌باشد؛ لذا بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.همچنین از مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی اراک به دلیل پشتیبانی تجهیزات و امکانات و از کلیه همکارانی که ما را در این پژوهش یاری نموده‌اند صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نماییم.

References:

1. Dye C, Scheele S, Dolin P, Pathania V, Raviglione MC. Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project. JAMA 1999;282(7):677–86.
2. Dolin PJ, Raviglione MC, Kochi A. Global tuberculosis incidence and mortality during 1990–2000. Bull WHO 1994; 72: 213–20.
3. Zhang Y, Yew WW. Mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. Int J Tuberc Lung Dis 2009;13(11): 1320-30.
4. Velayati AA, Farnia P, Masjedi MR, Ibrahim TA, Tabarsi P, Haroun RZ et al. Totally drug-resistant tuberculosis strains: evidence of adaptation at the cellular level. Eur Respir J 2009; 34(5): 1202-3.
5. Plinke C, Rüsch-Gerdes S, Niemann S. Significance of mutations in embB codon 306 for prediction of ethambutol resistance in clinical Mycobacterium tuberculosis isolates. Antimicrob Agents Chemother 2006;50(5): 1900-2.
6. Starks AM, Gumusboga A, Plikaytis BB, Shinnick TM, Posey JE. Mutations at embB codon 306 are an important molecular indicator of ethambutol resistance in Mycobacterium tuberculosis. Antimicrob Agents Chemother 2009;53(3): 1061-6
7. Hazbón MH, Bobadilla del Valle M, Guerrero MI, Varma-Basil M, Filliol I, Cavatore M, et al. Role of embB codon 306 mutations in Mycobacterium tuberculosis revisited: a novel association with broad drug resistance and IS6110 clustering rather than ethambutol resistance. Antimicrob Agents Chemother 2005;49(9): 3794-802
8. Shen X, Shen GM, Wu J, Gui XH, Li X, Mei J, et al. Association between embB codon 306 mutations and drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. Antimicrob Agents Chemother 2007;51(7): 2618-20.

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-03-28]

9. Mokrousov I, Narvskaya O, Limeschenko E, Otten T, Vyshnevskiy B. Detection of ethambutol-resistant Mycobacterium tuberculosis strains by multiplex allele-specific PCR assay targeting embB306 mutations. J Clin Microbiol 2002;40(5): 1617-20.
10. Ahmad S, Mokaddas E, Jaber AA. Rapid detection of ethambutol-resistant Mycobacterium tuberculosis strains by PCR-RFLP targeting embB codons 306 and 497 and iniA codon 501 mutations. Mol Cell Probes 2004;18(5): 299-306.
11. M. Asgharzadeh ،A.R. Jahantabi ،K. Shahbabian، M.R. Nahaei ،A. Rafi. Detection of Ethambutol - resistant Mycobacterium tuberculosis strains by MAS-PCR method and comparison with Proportion. J mazandaran Univ Med Sci 2007; 57: 50-6.(persian)
12. Huang WL, Chi TL, Wu MH, Jou R. Performance assessment of the GenoType MTBDRsl test and DNA sequencing for detection of second-line and ethambutol drug resistance among patients infected with multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis. J Clin Microbiol 2011;49(7): 2502-8.
13. Brossier F, Veziris N, Aubry A, Jarlier V, Sougakoff W. Detection by GenoType MTBDRsl test of complex mechanisms of resistance to second-line drugs and ethambutol in multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis complex isolates. J Clin Microbiol 2010;48(5): 1683-9.
14. Ahmad S, Jaber AA, Mokaddas E. Frequency of embB codon 306 mutations in ethambutol-susceptible and -resistant clinical Mycobacterium tuberculosis isolates in Kuwait. Tuberculosis (Edinb) 2007;87(2): 123-9.
15. Palomino JC, Traore H, Fissette K, Portaels F. Evaluation of Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) for drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis. Int J Tuberc Lung Dis. 1999;3(4): 344-8.
16. Gupta A, Sen MR, Mohapatra TM, Anupurba S. Evaluation of the performance of nitrate reductase assay for rapid drug-susceptibility testing of mycobacterium tuberculosis in north India. J Health Popul Nutr 2011;29(1): 20-5.
17. Ani AE, Daylop YB, Agbaji O, Idoko J. Drug susceptibility test of Mycobacterium tuberculosis by nitrate reductase assay. J Infect Dev Ctries 2009 ; 28;3(1): 16-9.
18. Mandal P K, Basnyat S, Khadka D K, Bhatta D R. Evaluation Of Nitrate Reductase Assay (Nra) For Rapid Detection Of Drug Resistant Tuberculosis At National Tuberculosis Centre, Nepal. SAARC J. TUBER. LUNG DIS. HIV/AIDS 2010; 7 (1): 26-30.

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-03-28]

Original Article

RAPID DETECTION OF SUSCEPTIBILITY TO ETHAMBUTOL IN CLINICAL MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS ISOLATED FROM TUBERCULOSIS PATIENTS BY PCR- RFLP

Masumeh Taherahmadi[1], Azam Ahmadi[2], Mana Shojapour[3], Raziye Nazari[4], Seyed Reza Moadab[5], Mohammad Arjomanzadegan[6*]

Received: 2 Jul , 2013; Accepted: 9 Sep , 2013

Abstract

Background & Aims: Eethambutol is a key drug to treatment of tuberculosis; and resistance against it has been increasingly reported. In this study, Polymerase Chain Reaction -Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) method in rapid detection of tuberculoses mycobacterium strains against the ethambutol has been investigated.

Materials & Methods: This study was conducted on 60 strains that were selected from 127 strains in Tuberculosis and Pediatric Infections Research Center. DNA was extracted by Chelex 100 method. PCR test was performed using specific primers for embB gene. Digestions of PCR products with HaeIII and NlaII restriction enzymes, then the pattern of restriction fragments generated were analyzed. The section was sequenced in a few samples, and it was compared to the presented method as golden standard.

Results: Out of 60 studied stains, 43 were phenotypically resistant to ethambutol, and 17 were sensitive. PCR revealed that the band 167 showed the correct selection of primers and the appropriate plan of amplification. Out of 43 resistant strains, 19 stains were diagnosed to have mutation in ATG-Met codon 360 using RFLP method, and 24 were found to be non-mutant.

Conclusion: According to the findings, that PCR-RFLP can be a simple and rapid method to diagnose the ethambutol -sensitivity in tuberculosis mycobacterium strains.

Keywords: Ethambutol, *Mycobacterium Ttuberculosis*, PCR- RFLP

Address: Arak University of Medical Sciences, Tuberculosis and Pediatric Infections Research Center, Faculty of Medicine Arak, Arak, Iran ***Tel***: +98 861 4173502
E.mail: mmatinam81@yahoo.com

SOURCE: URMIA MED J 2013: 24(8): 576 ISSN: 1027-3727

[1] *Master Student, Department of Microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran*
[2] *Master Student, Molecular and Medicine Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran*
[3] *PhD Student, Molecular and Medicine Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran*
[4] *Assistant Professor, Department of Microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran*
[5] *Tuberculosis and Lung Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran*
[6] *Tuberculosis and Pediatric Infections Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran (Corresponding Author)*

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-03-28]