

شناسایی سویه‌های مقاوم به اتامبوتول مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به روش MAS-PCR و مقایسه آن با روش proportion

محمد اصغرزاده (Ph.D.)⁺ * علی رضا جهانتابی (M.Sc.)^{**} کارن شهباییان (M.Sc.)^{**}
محمد رضا نهایی (Ph.D.)^{***} عبدالناصر رفیع (Ph.D.)^{****}

چکیده

سابقه و هدف: اتامبوتول (EMB) از داروهای خط اول در درمان بیماری سل می‌باشد که سویه‌های مقاوم به آن در بسیاری از نقاط جهان رو به افزایش است سویه‌های مقاوم به اتامبوتول معمولاً موتاسیون در ژن embB دارند. هدف از این تحقیق تعیین مقاومت به اتامبوتول در سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس جدا شده از بیماران به روش MAS-PCR و مقایسه آن با روش proportion است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه ۱۲۰ سویه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس جدا شده از بیماران مبتلا به سل در مرکز تحقیقات سل تبریز مورد بررسی قرار گرفتند. تست تعیین حساسیت به داروی اتامبوتول با استفاده از روش proportion انجام گردید و DNA با استفاده از روش تغییر یافته پروتیناز SDS-K از سلول‌های کشت یافته، جدا شد و به مخلوط PCR اضافه گردید و واکنش طبق برنامه در ترمال سایکلر انجام شد.

یافته‌ها: ۱۱۶ سویه حساس به اتامبوتول و ۴ سویه مقاوم به اتامبوتول (۳/۳۳ درصد) بودند و همه سویه‌های مقاوم به اتامبوتول از نوع مقاوم به چند دارو بودند. روش PCR برای بررسی موتاسیون در کدون embB306 به کار برده شد در هر چهار سویه مقاوم به اتامبوتول موتاسیون در کدون embB306 مشاهده گردید.

استنتاج: نتایج حاصل نشان داد که MAS-PCR می‌تواند به عنوان یک روش ساده و سریع برای تعیین مقاومت به اتامبوتول در سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مورد استفاده قرار گیرد.

واژه های کلیدی: مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، MAS-PCR، اتامبوتول

مقدمه

بیماری سل یا توبرکلوزیس (TB) یک مشکل جهانی بوده و علیرغم اقدامات وسیع و مبارزه همه جانبه بر علیه آن در چند دهه اخیر، هنوز تعداد مبتلایان به این بیماری فراوان بوده و شیوع آن در کشورهای در حال توسعه و

* متخصص فرآورده های بیولوژیک، عضو هیأت علمی (دانشیار) دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات سل و بیماریهای ریوی دانشگاه علوم پزشکی تبریز

E-mail : asgharzadehmo@yahoo.com

⁺ مؤلف مسئول : تبریز- خیابان دانشگاه، دانشکده پزشکی، گروه بیهوشی و علوم آزمایشگاهی

** کارشناسی ارشد میکروبی شناسی، مرکز تحقیقات سل و بیماریهای ریوی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

*** متخصص میکروبی شناسی، عضو هیأت علمی (استاد) دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز

**** متخصص میکروبی شناسی، عضو هیأت علمی (استاد) دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز

☞ تاریخ دریافت : ۸۴/۹/۱۶ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۸۴/۱۱/۱۴ تاریخ تصویب : ۸۵/۷/۲۶

به اتامبوتول را شناسایی نمود و انتقال سویه های مقاوم را به حداقل ممکن رسانید.

مواد و روش ها

محیط لونشتاین جانسون، نیاسین، فوشین، بلودومیتیلن، اتامبوتول، ایزونیازید، استرپتومايسين، ريفامپين، تريس، NaCl، SDS، EDTA، اسید کلریدریک، CTAB، کلر فرم، ایزوآمیل الکل، ایزوپروپانل، اتانول، ایتدیوم بروماید، پارافین و اسید بوریک از شرکت مرک آلمان، پرایمرها از شرکت TIB آلمان، پروتیناز k و لیزوزیم از شرکت Roche آلمان، dNTP، سایز مارکر و آگاروز از شرکت Fermentas لیتوانی و Taq DNA پلی مراز، بافر آن و MgCl₂ از شرکت سیناژن ایران تهیه شد.

سویه های باکتریایی و تست حساسیت

صد و بیست سویه جدا شده از بیماران مبتلا به سل (۱۲ تا ۹۰ ساله) در مرکز تحقیقات سل و بیماری های ریوی تبریز مورد بررسی قرار گرفت. باکتری های جدا شده بر اساس رنگ آمیزی اسیدفست، شکل کلنی و تست نیاسین مایکوباکتریوم توبرکلوزیس تعیین هويت شدند و تست تعیین حساسیت به داروی اتامبوتول، ایزونیازید، ریفامپین و استرپتومايسين با استفاده از روش proportion انجام گردید. بعد از رشد باکتری ها در محیط لونشتاین جانسون، کشت آنها در مقابل ۲ میکروگرم اتامبوتول، ۰/۲ میکروگرم ایزونیازید، ۴۰ میکروگرم ریفامپین و ۴ میکروگرم استرپتومايسين در هر میلی لیتر از محیط لونشتاین جانسون صورت گرفت و جهت کنترل، کشت در محیط فاقد دارو انجام شد. محیط های کشت در ۳۷ °C انکوبه شدند و به صورت هفتگی مورد بررسی قرار گرفتند و در ۴ هفته (۲۸ روز) و ۶ هفته (۴۲ روز) بعد از کشت، نتیجه بررسی شد. معیار

صنعتی افزایش یافته است (۱) و سالانه منجر به مرگ و میر بیش از دو میلیون نفر می شود (۲). باسیل اسید فست مایکوباکتریوم توبرکلوزیس عامل ایجاد کننده TB می باشد (۳) که انواع مقاوم آن به یک یا چند داروی خط اول در درمان بیماری، در بسیاری از کشورهای جهان افزایش یافته است (۴) لذا تشخیص سریع مقاومت دارویی جهت جلوگیری از انتقال باکتری های مقاوم به چند دارو (MDR) کمک کننده می باشد (۵) در مایکوباکتری ها، مقاومت به دارو معمولاً ناشی از موتاسیون در مواد ژنتیکی می باشد (۶). از داروهای خط اول در درمان بیماری سل اتامبوتول می باشد که در ترکیب با دیگر داروها به کار می رود (۸،۷) اتامبوتول با آنزیم های آرایبوزیل ترانسفرازهای دیواره سلولی مایکوباکتری ها واکنش کرده و از سنتز آرایبوزی گلاکتان که برای ساختن دیواره سلولی لازم است جلوگیری می کند و منجر به تجمع اسید مایکولیک می گردد که موجب مرگ سلول می شود (۸) اپرون embCAB، مایکوباکتری های آرایبوزیل ترانسفرازها را کد می کند (۹) موتاسیون در embB می تواند منجر به ایجاد مقاومت به اتامبوتول در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس گردد. ۹۰ درصد از موتاسیون ها در کدون ATG-Met ۳۰۶ رخ می دهد. موتاسیون منجر به جایگزینی اسید آمینه دیگر به جای میتونین می شود (۸). اتامبوتول داروی با ارزش در درمان بیماری سل می باشد ولی امکان ایجاد مقاومت به اتامبوتول وجود دارد. هدف از این تحقیق، استفاده از روش مولکولی سریع multiplex (allele - specific polymerase chain reaction) MAS-PCR برای تعیین مقاومت به داروی اتامبوتول و مقایسه آن با روش proportion می باشد که موتاسیون در باز اول و سوم embB306 را مورد بررسی قرار دهد تا از این طریق بتوان سریع مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم

dCTP, dGTP بود و $40 \mu\text{l}$ پارافین استریل اضافه شد واکنش در ترمال سایکلر به صورت ذیل انجام شد؛ سیکل اول 95°C به مدت چهار دقیقه، ۶ سیکل بعدی ۹۴ یک دقیقه، ۷۵ یک دقیقه و ۷۲ چهل ثانیه، ۶ سیکل بعدی ۹۴ یک دقیقه، ۷۴ یک دقیقه و ۷۲ چهل ثانیه و ۲۰ سیکل بعدی ۹۴ یک دقیقه، ۷۳ چهل ثانیه و 72°C چهل ثانیه انجام شد و سیکل آخر به مدت دو دقیقه در 72°C قرار داده شدند (۸) در نهایت قطعات تکثیر یافته در ژل آگاروز ۱ درصد الکتروفورز گردید و پس از رنگ آمیزی با 0.5 میکروگرم / میلی لیتر اتیدایوم بروماید، در مقابل نور UV حاصل از ترانس لومیناتور، مورد بررسی قرار گرفتند و تعداد و اندازه قطعات به دست آمده از مقایسه با DNA Ladder 100 bp سایز مارکر تعیین گردید.

در این روش سویه های حساس، سه باند 160 ، 324 ، و 210 bp ایجاد می کنند در حالی که سویه های مقاوم به اتامبوتول دارای موتاسیون در باز اول embB306، دو باند 324 و 210 bp تولید می کنند و سویه های مقاوم به اتامبوتول حاوی موتاسیون در باز سوم embB306 دو باند 324 و 160 bp تولید می کنند قطعه 324 bp توسط پرایمرهای خارجی Emb1F و Emb2R تولید می شود و در تمام سویه های مقاوم و حساس به اتامبوتول وجود دارد (شکل شماره ۱).

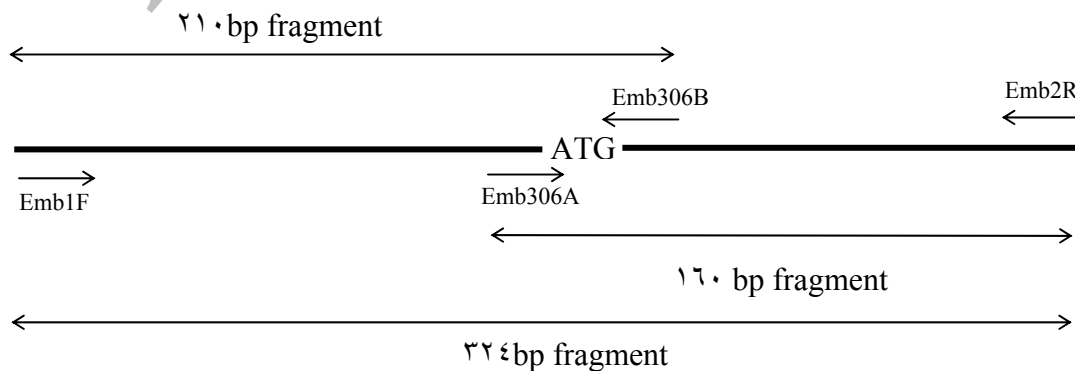
مقاومت، رشد ۱ درصد برای هر چهار دارو در مقایسه با کنترل بود (۱۰).

جداسازی DNA

برای استخراج DNA از باکتری های کشت یافته استفاده شد و دولوپ از باکتری ها به میکروتیوب استریل دارای $400 \mu\text{l}$ بافر TE انتقال داده شد و بمدت ۲۰ دقیقه در حرارت 80 درجه سانتیگراد قرار داده شد و با استفاده از لیزوزیم، SDS، پروتیناز K و CTAB، DNA جدا گردید و بعد از رسوب با ایزوپروپانول و شستشو با اتانول ۷۰ درصد در بافر (10mM Tris, 1mM EDTA, pH=8, TE) حل گردید (۱۱).

MAS-PCR

روش MAS-PCR برای شناسایی موتاسیون در باز اول وسوم embB306 مورد استفاده قرار گرفت پرایمرهای مورد استفاده Emb1F, Emb306B, Emb306A و Emb2R بودند DNA استخراج شده به مقدار $5 \mu\text{l}$ به مخلوط PCR (حجم نهایی $50 \mu\text{l}$) اضافه شد که دارای 5 pmol از پرایمرهای Emb2R و Emb306A و 50 mM MgCl_2 ، Emb306B و Emb1F از پرایمرهای Taq DNA 2 U ، $1/5$ سیناژن) و $200 \mu\text{M}$ از هر کدام از dCTP, dATP,



شکل شماره ۱: منظره شماتیک از قطعه هایی از ژن embB که در روش MAS-PCR تکثیر می یابند.

یافته ها

جدول شماره ۱: مقایسه روش MAS-AR با proportion جهت

شناسایی سویه های مقاوم و حساس به اتامبوتول

روش	سویه های مقاوم به اتامبوتول	سویه های حساس به اتامبوتول	کل
porportion	۴ (۳/۳۳)	۱۱۶ (۹۶/۶۷)	۱۲۰
MAS-PCR	۱۰ (۸/۳۳)	۱۱۰ (۹۱/۶۷)	۱۲۰

بحث

مایکو باکتری مکانیسم های مختلفی را برای فرار از کشته شدن توسط دارو به کار می گیرد یکی از این مکانیسم ها ایجاد موتاسیون در ژن های می باشد که پروتئین های هدف دارو را کد می کنند (۳) ژن embB ژنی است که آرابینوزیل ترانسفراز را کد می کند که پروتئین هدف اتامبوتول می باشد ایجاد موتاسیون در embB موجب مقاومت به اتامبوتول می گردد (۱۲) و بیشتر موتاسیون ها در این ژن در embB306 رخ می دهد. تعداد سویه های مقاوم مایکو باکتریوم توبرکلوزیس به یک یا چند داروی خط اول در حال افزایش است (۴) و روش استاندارد برای درمان توبرکلوزیس مقاوم به چند دارو (MDR-TB) وجود ندارد و عفونت با این سویه ها خصوصا در افرادی که دچار سوء تغذیه و یا آلوده به HIV هستند، منجر به مرگ می گردد، لذا شیوع MDR-TB یک خطر جدی برای کنترل سل در سرتاسر جهان می باشد (۱۳) و موجب افزایش سل در دنیا می گردد (۱۴). در این تحقیق از ۱۲۰ سویه جدا شده، ۷ سویه (۵/۸۳ درصد) حداقل به دو دارو از سه داروی ریفامپین، ایزونیاژید و اتامبوتول مقاوم بودند که درصد نسبتا بالایی از مقاومت به چند دارو می باشد. درصد MDR در کشورهای مختلف متفاوت می باشد، در نپال ۴۸ درصد، در ایالت گجرات هند ۳۳/۸ درصد (۱۵)، بولیوی ۱۵/۳ درصد و پاکستان ۲۸ درصد (۱۶) گزارش شده است. با توجه به این که روش proportion مدت

۱۲۰ سویه مایکو باکتریوم توبر کلوزیس مورد بررسی قرار گرفتند. با روش proportion، ۱۱۶ سویه حساس به داروی اتامبوتول و ۴ سویه (۳/۳۳ درصد) مقاوم با اتامبوتول بودند و هم چنین، ۱۲ سویه (۱۰ درصد) مقاوم به ریفامپین و ۱۳ سویه (۱۰/۸۳ درصد) مقاوم به ایزونیاژید و ۲۷ سویه (۲۲/۵ درصد) مقاوم به استرپتومايسين بودند. بر اساس نتایج به دست آمده همه سویه های مقاوم به اتامبوتول از نوع مقاوم به چند دارو (MDR) بودند. از سویه های مقاوم به اتامبوتول دو سویه، به استرپتومايسين، ریفامپین و ایزونیاژید مقاوم بودند و یک سویه مقاوم به ایزونیاژید و استرپتومايسين بود. دو سویه حساس به اتامبوتول، به استرپتومايسين، ریفامپین و ایزونیاژید مقاوم و به ریفامپین و ایزونیاژید مقاوم بودند و یک سویه، به ایزونیاژید و ریفامپین مقاوم و به اتامبوتول و استرپتومايسين حساس بود و هم چنین پنج سویه، به استرپتومايسين و ایزونیاژید مقاوم به اتامبوتول و ریفامپین حساس بود. از چهار سویه مقاوم به اتامبوتول، سه نمونه از اهالی نخجوان جدا شده بود و فرد چهارم اهل تبریز بود. در کل از ۱۲۰ سویه، ۷ سویه (۵/۸۳ درصد) حداقل به دو دارو از سه داروی ریفامپین، ایزونیاژید و اتامبوتول مقاوم بودند. روش MAS-PCP برای شناسایی موتاسیون در embB306 مورد استفاده قرار گرفت. همه سویه های مقاوم به اتامبوتول دو باند، نشان دادند که دو سویه دارای دو باند ۳۲۴ و ۲۱۰ bp است و دو سویه دو باند ۳۲۴ و ۱۶۰ bp را داشتند و تمام سویه های حساس به اتامبوتول غیر از شش سویه سه باند ۳۲۴، ۲۱۰ و ۱۶۰ bp نشان دادند در آن شش سویه، در چهار سویه، دو باند ۳۲۴ و ۱۶۰ bp دیده شد و در دو سویه دو باند ۳۲۴ و ۲۱۰ bp وجود داشت، جدول شماره ۱. همه سویه های حساس و مقاوم به اتامبوتول باند ۳۲۴ bp را نشان دادند که دلالت بر آن داشت که ۱۲۰ سویه جدا شده مایکو باکتریوم توبرکلوزیس بودند.

باید وجود داشته باشد. مزایای روش MAS-PCR برای تشخیص مقاومت به اتامبوتول شامل؛ ۱- آزمایش سریع است و مستقیماً بر روی نمونه‌های کلینیکی بدون جداسازی ارگانیسیم قابل انجام است ۲- این روش ژنوتیپ سویه‌ها را مورد بررسی قرار می‌دهد در حالی که روش proportion فنوتیپ یا بیان ژنوتیپ را مورد ارزیابی قرار می‌دهد که تحت تاثیر شرایط آزمایشگاهی می‌باشد ۳- خطر MAS-PCR در مقایسه با proportion کم‌تر است. ۴- با روش MAS-PCR هم‌چنین شناسایی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس صورت می‌گیرد. روش MAS-PCR دارای نقاط ضعف ذیل می‌باشد:

۱- مقاومت مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به اتامبوتول ممکن است از طریق مکانیسم‌های دیگر رخ داده باشد.

۲- موتاسیون در embB306 در برخی از سویه‌های حساس به اتامبوتول وجود دارد.

۳- ممکن است موتاسیون در embB306 وجود داشته باشد ولی موجب مقاومت به اتامبوتول نشود.

۴- نتایج مثبت کاذب به سبب آلودگی نمونه‌ها با اسیدنوکلئیک خارجی رخ دهد. بر اساس نتایج این تحقیق پیشنهاد می‌شود در مواردی که پزشک معالج حدس می‌زند بیمار آلوده به مایکو باکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به چند دارو می‌باشد، بهتر است از روش MAS-PCR برای بررسی مقاومت استفاده گردد.

سپاسگزاری

از همکاری آقای سیروس امینی و کارکنان مرکز تحقیقات سل و بیماری‌های ریوی تبریز در ثبت مشخصات بیماران و اخذ نمونه تقدیر و تشکر می‌گردد.

زیادی طلب می‌کند، استفاده از روش شناسایی سریع برای مایکوباکتریوم‌های مقاوم به داروی اتامبوتول ضروری به نظر می‌رسد. روش MAS-PCR یکی از این روش‌های سریع است که از آن برای بررسی موتاسیون در embB306 استفاده گردید. در روش PCR وجود مهارکننده‌های PCR از نمونه‌های کلینیکی و محتویات غشاء مایکوباکتری‌ها مشکل‌ساز می‌باشند (۱۷) لذا در این تحقیق برای استخراج DNA علاوه از SDS و پروتئیناز K از ماده CTAB استفاده شد. CTAB به عنوان یک دترجنت کاتیونیک، پروتئین‌ها و پلی ساکاریدها را رسوب می‌دهد و موجب جدا شدن مهارکننده‌های PCR می‌گردد.

در این بررسی هر چهار سویه مقاوم به اتامبوتول دارای موتاسیون در embB306 بودند و هم‌چنین شش سویه حساس به اتامبوتول دارای موتاسیون در embB306 بودند. در مطالعه Mokrousov نیز، موتاسیون در embB306 در سویه‌های حساس به اتامبوتول دیده شد (۷) نکته جالب این است که تمام سویه‌های حساس به اتامبوتول، دارای موتاسیون در embB306، حداقل به یکی از سه آنتی‌بیوتیک ریفامپین، ایزونیاژید و استرپتومايسين مقاوم بودند و در سویه‌های حساس به هر چهار آنتی‌بیوتیک ریفامپین، ایزونیاژید، استرپتومايسين و اتامبوتول موتاسیون در embB306 دیده نشد. با توجه به این که ۷۵ درصد سویه‌های مقاوم به اتامبوتول و ۵۷ درصد سویه‌هایی که حداقل به دو دارو از سه داروی ریفامپین، ایزونیاژید و اتامبوتول مقاوم بودند از اهالی نخبوان از کشور آذربایجان جدا شده بودند و مهاجرت به عنوان یکی از عوامل موثر در مقاومت به دارو گزارش شده است (۱۸) لذا کنترل دقیقی برای بیمارانی که از نخبوان برای تشخیص بیماری و درمان به تبریز مراجعه می‌کنند

فهرست منابع

1. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, et al. Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. *Nature*. 1998; 393(11): 537-44.
2. Soini H, Musser JM. Molecular diagnosis of Mycobacteria. *Clin. Chem*. 2001; 47: 809-14.
3. Ramaswamy S, Musser JM. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in Mycobacterium tuberculosis: *Tuberc. Lung Dis*. 1998; 79(1): 3-29.
4. Cohn DJ, Bustreo F, Raviglione MC. Drug-resistant tuberculosis: review of the world wide situation and the WHO/IUATLD global surveillance project. *Clin. Infect. Dis*. 1997; 24: S121-S30.
5. Parsons LM, Salfinger M, Clobridge A, Dormandy J, Mirabello L, Polletta VL, et al. Phenotypic and molecular characterization of Mycobacterium tuberculosis isolated resistant to both Isoniazid and Ethambutol. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2005; 49(6): 2218-25.
6. Gillespie SH. Evaluation of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis: Clinical and molecular perspective. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2002; 46(2): 267-74.
7. Mokrousov I, Otten T, Vyshnevskiy B, Narvakaya O. Detection of embB306 mutations in ethambutol-susceptible clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis from Northwestern Russia: Implications for genotypic resistance testing. *J. Clin. Microbiol*. 2002; 40(10): 3810-3.
8. 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.
9. Alcaide F, Pfyffer GE, Telenti A. Role of embB in natural and acquired resistance to ethambutol in Mycobacteria. *Antimicrob. Agents Chemother*. 1997; 41(10): 2270-3.
10. Rieder HL, Chonde TM, Myking H, Urbanczik R, Laszlo A, Kim SJ, et al. The public health service national tuberculosis reference laboratory and the national laboratory network. *IUATLD*. 1998; 72-76.
11. Von Soolingen D, De Haas PEW, Hermans PWM, Van Embden JDA. DNA fingerprinting of Mycobacterium tuberculosis. *Methods Enzymol*. 1994; 235: 196-205.
12. Ramaswamy SV, Amin AG, Goksel S, Stager CE, Dou SJ, Sahli HL, et al. Molecular genetic analysis of nucleotide polymorphisms associated with ethambutol resistance in human isolates of M. tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2000; 44(2): 326- 36.

13. Sharma SK, Mohan A. Multidrug-resistant tuberculosis. *Indian J. Med. Res.* 2004; 120: 354-376.
14. Pereira M, Tripathy S, Inamdar V, Ramesh K, Bhavsar M, Date A, et al. Drug resistance pattern of *Mycobacterium tuberculosis* in seropositive and seronegative HIV-TB patients in Pune, India. *Indian J. Med. Res.* 2005; 121: 235-40.
15. Siddiqi N, Shamim M, Hussain S, Choudhary RK, Ahmed N, Prachee, et al. Molecular characterization of Multidrug-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from patients in north India. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002; 46(2): 443-50.
16. Butt T, Ahmad RN, Kazmi SY, Rafi N. Multidrug resistant Tuberculosis in Northern Pakistan. *J. Pak. Med. Assoc.* 2004; 54(9): 469-72.
17. Wilson SM, McNerney R, Nye PM, Godfrey-Faussett PD, Stoker NG, Voller A. Progress toward a simplified polymerase chain reaction and its application to diagnosis of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 1993; 31: 776-82.
18. Brudey k, Gordon M, Mostrom P, Svensson L, Jonsson B, Sola C, et al. Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in Western Sweden. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42(7): 3046-51.