Archive of SID

مجلـه دانشگـاه علـوم پـــزشکـی اردبیـل

دوره یازدهم، شماره چهارم، زمستان ۱۳۹۰، صفحات ۳۴۵ الی ۳۵۳

تعیین مقاومت به آمیکاسین در سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس MDR به روش: PCR-RFLP

پریسا طهماسبی[۱]، دکتر فاطمه مریم شیخ الاسلامی[۲]، دکتر پریسا فرنیا[۳]، دکتر مجید صادقی زاده[۴]، دکتر رشید رمضان زاده[۵]، مهدی کاظم پور[۶]، دکتر محمدرضا مسجدی[۷]، دکتر علی اکبر ولایتی[۸]

[۱]نویسنده مسئول: دانشجوی کارشناسی ارشد گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
E-mail: tahmasebiparisa@yahoo.com

[۲]استادیار مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران [۳] دانشیار گروه میکروب شناسی دانشکده پزشکی و محقق مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران [۴]استاد گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران [۵]دانشیار گروه میکروبیولوژی دانشکده پزشکی و محقق مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران [۶]مربی گروه آمار دانشکده پزشکی و محقق مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران [۷]استاد گروه داخلی دانشکده پزشکی و محقق مرکز تحقیقات سل و بیماری‌های ریوی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران [۸] استاد گروه کودکان دانشکده پزشکی و محقق مرکز تحقیقات سل و بیماریهای ریوی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

چکیده

زمینه و هدف: آمیکاسین یکی از داروهای کلیدی خط ۲ برای درمان سل می‌باشد. جهش در کدون‌های ۱۴۰۰، ۱۴۰۱ و ۱۴۸۳ از ژن srRNA ۱۶ با مقاومت به آمیکاسین در ارتباط است. هدف از این مطالعه آشکارسازی این جهش‌ها با استفاده از روش PCR-RFLP درسوش‌های مقاوم به چند دارو (MDR; Multiple Drug Resistant) مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به آمیکاسین بود.

روش‌کار: آزمون ارزیابی حساسیت دارویی با استفاده از روش تناسبی برای داروهای خط ۱ و ۲ روی ۱۰۰ ایزوله انجام شد. بر اساس نتایج حاصل از آن ۹۷ ایزوله با روش PCR-RFLP مورد آزمون قرار گرفت. از پرایمرهای rrs۱۰۹۶ و rrs۱۵۳۹ جهت تکثیر ناحیه bp ۴۶۰ از ژن *rrs* استفاده شد. سپس محصولات PCR توسط دو آنزیم برشگر *Tai* 1 و *Dde* 1 هضم گردیدند. از آزمون آماری مربع کای با استفاده از نرم افزار SPSS جهت آنالیز داده‌ها استفاده شد.

یافته ها: بر اساس نتایج حاصل از روش تناسبی از مجموع ۹۷ نمونه، ۶۳ نمونه (۶۴/۹٪) MDR و ۲۶ نمونه (۲۶/۸٪) حساس، ۸ نمونه (۸/۲٪) نیز non -MDR بودند. هم چنین ۱۳ نمونه (۱۳/۴٪) (XDR; Extensively Drug Resistant) و ۶ نمونه (۶/۱٪) (TDR; Totally Drug Resistant) شناسایی شدند. با استفاده از روش PCR-RFLP ۷ نمونه (۷/۲٪) مقاوم به آمیکاسین و ۹۰ نمونه (۹۲/۷٪) حساس به این دارو بودند. به علاوه ما دریافتیم که فراوانی جهش‌های مربوط به مقاومت به آمیکاسین در کدون ۱۴۰۰از ژن *rrs* بیشتر از سایر کدون‌ها است.

نتیجه گیری: روش PCR-RFLP می‌تواند به عنوان یک روش مکمل در تشخیص موارد مقاوم به این دارو استفاده شود. اگر چه برای افزایش حساسیت روش PCR-RFLP نیاز به بررسی کدون‌های بیشتری از ژن *rrs* می‌باشد.

کلمات کلیدی: PCR-RFLP؛ مایکوباکتریوم توبرکلوزیس؛ MDR؛ *rrs*؛ آمیکاسین

دریافت: ۹۰/۵/۱۰ **پذیرش:** ۹۰/۸/۱۶

لطفا به این مقاله به شکل زیر ارجاع دهید:

Tahmasebi P, Sheikolslami FM, Farnia P, Sadeghizadeh M, Ramazanzadeh R, Kazempoor M, Masjedi MR, Velayati AA. Detection of Amikacin-Resistance among MDR Strains of *Mycobacterium tuberculosis* by Using PCR-RFLP *Method*. J Ardabil Univ Med Sci. 2011; 11(4): 345-353. (Full Text in Persain)

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

صد و بیست و نه سال بعد از کشف باسیل سل توسط رابرت کخ در ۱۸۸۲ میلادی این ارگانیسم هنوز هم بر زندگی بشر تاثیر گذار است [۱].

امروزه از هر سه نفر جمعیت جهان، یک نفر به باسیل سل آلوده است و در هر ثانیه یک نفر به تعداد آنها افزوده می‌شود. بر طبق اطلاعات موجود، ۵۰ میلیون نفر از افراد ذکر شده، به باسیل سل مقاوم به چند دارو (MDR-TB[1]) آلوده هستند [۲].

در حال حاضرگسترش سویه‌های مقاوم به دارو به یکی از مشکلات اساسی در سطح دنیا به ویژه در کشورهای در حال توسعه تبدیل شده است. ظهور باسیل‌هایی با مقاومت گسترده (XDR-TB[2]) علاوه بر موارد مقاوم به چند دارو (MDR-TB) و به تازگی موارد مقاوم به تمام داروها (TDR-TB[3]) کنترل و مهار جهانی سل را پیچیده‌تر کرده است [۱].

مقاومت مایکوباکتریوم به داروهای ضد سل بیشتر با جهش در ژن‌های کدکننده مولکول‌های هدف دارو ایجاد می‌شود [۳].

داروهای ضدسل در حالیکه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس پاتوژن را از بین می‌برند، موجب انتخاب باکتری‌های مقاومی که این داروها علیه آنها بی تاثیر است، می‌شوند[٤].

بر اساس اعلام وزارت بهداشت و درمان در سال ۱۳۸۸ شیوع بیماری سل در ایران ۱۳/۷ مورد در صد هزار نفر بوده است. هم چنین میزان سل مقاوم به چند دارو (MDR-TB) در سال ۱۳۷۵، ۵٪ اعلام شده است [۵].

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۹ در ایران انجام شد جدیدترین شکل از سل مقاوم به دارو تحت عنوان TDR- TB یا XXDR-TB[4] معرفی شدکه به تمام داروها خط ۱ و ۲ مقاومت نشان می‌داد [۶].

باسیل‌های XDR-TB علاوه بر مقاومت به ایزونیازید و ریفامپین به فلوروکینولون‌ها و حداقل یکی از سه داروی تزریقی (کاپرومایسین، کانامایسین، آمیکاسین) مقاوم هستند[۷].

کانامایسین و آمیکاسین آمینوگلیکوزیدهایی هستند که به ریبوزوم‌های باکتریایی متصل شده و از سنتز پروتئین ممانعت می‌کنند. زیر واحد ۳۰S ریبوزوم شامل تعدادی پروتئین و ۱۶srRNA است که بخش ۱۶srRNA توسط ژن *rrs* کد می‌شود.

آمینوگلیکوزیدها با اتصال به این زیر واحد سبب اشتباه خواندن رمزهای ژنتیکی می‌گردند و بنابراین باعث افزایش سطوح پروتئین‌هایی با تاخوردگی اشتباه در سلول و در نهایت مرگ سلول می‌گردد [۸].

تغییرات نوکلئوتیدی در کدون‌های ۱٤۰۰(A به G)، ۱٤۰۱ (C به A)، ۱٤۸۳ (G به T) از ژن *rrs* در ارتباط با مقاومت به این داروها می‌باشد. بویژه اینکه مقاومت به سطوح بالای آمیکاسین وکانامایسین در ارتباط با جهش در کدون ۱٤۰۰می‌باشد [۹].

در این مطالعه حضور این جهش‌ها با استفاده از روش PCR-RFLP در سویه‌های MDR مایکوباکتریوم توبرکلوزیس که با روش تناسبی مقاوم به آمیکاسین بودند بررسی گردید.

روش کار

این مطالعه از نوع توصیفی- تحلیلی بوده و در مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، بیمارستان مسیح دانشوری تهران انجام شد. در ابتدا، ۳۰۰ نمونه خلط از بیماران مسلول با سابقه شکست درمان، مراجعه کننده به بیمارستان مسیح دانشوری طی سال‌های ۹۰-۸۹ جمع‌آوری

[1]Multi Drug Resistant -TB
[2]Extensivly Drug Resistant-TB
[3]Totally Drug Resistant- TB
[4]Extremely Drug Resistant -TB

www.SID.ir

Archive of SID

گردید. پس از هضم و آلوده‌زدایی، کشت روی محیط لونشتاین جنسن[1] انجام شد. جهت تعیین حساسیت دارویی از روش تناسبی[2] استفاده شد. این روش برای داروهای خط ۱ و ۲ روی ۱۰۰ ایزوله انجام گردید. روش تناسبی با تلقیح سوسپانسیونی از باکتری به محیط‌های کشت حاوی آنتی بیوتیک و بدون آنتی بیوتیک (محیط کنترل یا شاهد) انجام شد و نتایج بعد از ۲۸ و ٤۲ روز قرائت گردید. نسبت تعداد باسیل‌های مقاوم به هر دارو به تعداد باسیل‌های زنده در ماده تلقیح شده، اگر از حدی که نسبت بحرانی برای مقاومت نامیده می‌شود کمتر بود، باسیل نسبت به آن دارو حساس و اگر معادل آن حد و یا بیشتربود سویه مقاوم تلقی می‌گردید. غلظت داروهای خط ۱ در محیط کشت شامل: (ایزونیازید ۰/۲µg/ml، ریفامپین ٤۰µg/ml، اتامبوتول ۲µg/ml، استرپتومایسین ۱۰µg/ml) و برای داروهای خط ۲شامل (کاپرومایسین۱۰µg/ml، آمیکاسین ٤µg/ml، کانامایسین ۲۰µg/ml، سیپروفلوکساسین ۲µg/ml، سیکلوسرین ۳۰µg/ml، افلوکساسین ۲µg/ml، پاراآمینوسالسیلیک ۵ µg/ml، اتیونامید ۲۰µg/ml) بود [۱۰].

کلیه داروها از شرکت سیگمای[3] آمریکا تهیه شد. در این میان ۹۷ نمونه (۶۳ نمونه MDR و ۳٤ نمونه Non-MDR و حساس) بر اساس نتایج آزمون حساسیت دارویی مورد آنالیز مولکولی قرارگرفتند. ۳ نمونه به دلیل آلودگی از مطالعه حذف شدند. در این تحقیق از سویه استاندارد مایکوباکتریوم توبرکلوزیس H37RV که حساس به همه داروها و فاقد هر نوع جهش می‌باشد به عنوان سویه کنترل استفاده شد. استخراج DNA از نمونه‌ها با روش N- استیل N, N, N– تری متیل آمونیوم بروماید (CTAB) انجام گردید[۱۱].

مراحل PCR

از جفت پرایمرهای rrs۱۰۹۶ و rrs ۱۵۳۹ برای تکثیر ناحیه ٤۶۰bp از ژن *rrs* استفاده شد. توالی این پرایمرها که در مطالعات قبلی طراحی شده اند[۱۲] به شرح زیر است:

- پرایمر پیشرو rrs ۱۰۹۶ ´۵ GCG CAA CCC TTG TCT CAT GTT G- ´۳ از۱۷۱۷به ۱۷۳۸
- پرایمر معکوس rrs۱۵۳۹ ´۵ GGG GCG TTT TGC TGG TGC TCC- ´۳ از ۲۱۶۰ به ۲۱۸۰

برای یک واکنش ۵۰ میکرولیتری PCR، از مواد مورد نیاز به این میزان برداشته شد: ۵ میکرولیتر از بافر X PCR ۱۰، ۰/۲میلی مولار از هر پرایمر، ۰/۲ میلی‌مولار از مخلوط دزوکسی نوکلئوتیدهای چهارگانه، ۱/۲۵ واحد از آنزیم Taq پلی‌مراز (شرکت کیاژن[4] آلمان)، ۱ میکرولیتر DMSO (۲٪)، ۱/۵میلی مولار کلرید منیزیم، ۱۰ نانوگرم از DNA الگو و آب مقطر استریل به مقداری که واکنش به حجم ۵۰ میکرولیتر برسد.

برنامه PCR در دستگاه ترموسایکلر (استک[5] ژاپن) به این صورت اجرا گردید: واسرشت شدن اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه، سپس ٤۰ چرخه شامل: ۱- مرحله واسرشت شدن در دمای ۹٤ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، ۲- مرحله اتصال در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱دقیقه، ۳- مرحله سنتز در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱دقیقه، سنتز نهایی هم در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰دقیقه انجام شد.

محصولات PCR در ژل آگارز ۱/۵٪ و در بافر TAE الکتروفورز شدند. جهت اندازه‌گیری باندها از مارکر مولکولی (شرکت فرمنتاز[6] آلمان) مناسب استفاده شد. سپس محصولات حاصل از PCR به وسیله آنزیم

[1] Lowenstein Jensen
[2] Proportional Method
[3] Sigma
[4] Qiagen
[5] Astec
[6] Fermentas

www.SID.ir

Archive of SID

های برش گر *Tai*۱(شرکت فرمنتاز آلمان) و *Dde*۱ (شرکت رش[1] آلمان) هضم شدند.

جایگاه اثر آنزیم *Dde* 1 در شکل زیر آمده است و به وسیله فلش‌ها مکان برش نشان داده شده است :

۵□...C↓T N A G...۳′

۳□...G A N T↑C...۵′

برای انجام واکنش هضم مخلوط ۲/۵ میکرولیتر بافر، ۱ واحد ازآنزیم *Dde* 1، ۱ میکروگرم محصول PCR، ۱۷/۳ میکرولیتر آب مقطر تهیه کرده به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد. با توجه به جایگاه اثر آنزیم، قطعات مورد انتظارحاصل از برش با آن: در سویه‌های حساس باندهای با اندازه‌های ۲۲ جفت باز، ۱۹۱، ۲٤۸ و در سویه‌های مقاوم باندهایی با اندازه‌های ۲۲ جفت باز، ۵۲، ۱۹۱ و ۱۹۶ می‌باشند.

جایگاه اثر آنزیم *Tai* 1 در شکل زیر آمده است و به وسیله فلش‌ها مکان برش نشان داده شده است:

۵′ ... A C G T↓...۳′

۳′...↑T G C A ...۵′

برای انجام واکنش هضم مخلوط ۲ میکرولیتر بافر، ۵ واحد از آنزیم *Tai* 1، ۱ میکروگرم محصول PCR، ۱۸ میکرولیتر آب مقطر تهیه کرده به مدت ۱۶-۱ ساعت در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد انکوبه شد. با توجه به جایگاه اثر آنزیم، قطعات مورد انتظار حاصل از برش با آن: در سویه‌های حساس باندهای: ۳۰ bp، ۳۱، ۵۹، ۱۵٤، ۱۸۷ و در سویه‌های مقاوم باندهایی به اندازه‌های ۳۰، ۵۹، ۱۸۵، ۱۸۷ جفت باز می‌باشند. محصولات حاصل از برش با الکتروفورز روی ژل پلی آکریل آمید ۸٪ و رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید قابل مشاهده می‌باشند. الگوهای حساس و مقاوم حاصل از برش با دو آنزیم فوق، با الگوهای برش حاصل از سویه استاندارد H37RV مقایسه گردیدند.

جهت بررسی دقیق نتایج، تعیین توالی DNA نیز برای نمونه‌ها توسط شرکت ژن فن آوران (ایران) انجام شد. هم چنین برای مقایسه داده‌ها و بررسی معنی‌دار بودن نتایج از نظر آماری، از آزمون مربع کای استفاده گردید و مقدار $p<۰/۰۵$ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد. برای تجزیه و تحلیل اطلاعات نیز از نرم افزار آماری SPSS استفاده گردید.

یافته ها

نتایج حاصل از روش تناسبی برای داروهای خط ۱ نشان داد که ۶۳ نمونه (۶٤/۹٪) مقاوم به دو داروی ایزونیازید و ریفامپین (MDR-TB) بودند و ۲۶ نمونه (۲۶/۸٪) حساس به ایزونیازید وریفامپین، ۸ نمونه (۸/۲٪) باقیمانده به یکی از این دو دارو مقاوم (Non -MDR) بودند. هم چنین ۳۱ نمونه (۳۱/۹۵٪) مقاوم به آمیکاسین و بقیه حساس به این دارو بودند. در بین نمونه‌ها، ۱۳ نمونه (۱۳/٤٪) XDR-TB بودند. هم چنین شش نمونه (۶/۱٪) مقاوم به تمام داروهای خط ۱و۲ (TDR-TB) بودند. نتایج مقاومت آنتی بیوتیکی داروهای خط ۱و ۲ به روش تناسبی در (جدول ۱) آمده است. پس از تکثیر ناحیه bp ٤۶۰ از ژن *rrs* (شکل ۱) این قطعات با دو آنزیم *Dde* 1 و *Tai* 1 برش داده شدند.

از آنزیم *Dde* 1 برای بررسی جهش در کدون ۱٤۸۳ و از آنزیم *Tai* 1 برای بررسی جهش در کدون‌های ۱٤۰۱/۱٤۰۰ استفاده گردید. برش بوسیله *Dde* 1 در تمام ۹۷ سویه مورد بررسی الگوی حساس به داروی آمیکاسین را نشان داد. یعنی باندهایی با اندازه‌های ۱۹۱، ۲٤۸ جفت باز بر روی ژل مشاهده شدند (شکل ۲).

در هیچ یک از سویه‌های مورد بررسی الگوی هضم مقاوم با این آنزیم bp ۱۹۱، ۱۹۶مشاهده نشد. این مسئله نشان داد که هیچ کدام از سویه‌های مورد بررسی در موقعیت ۱٤۸۳جهش نداشتند. در حالیکه

[1]Roche

www.SID.ir

Archive of SID

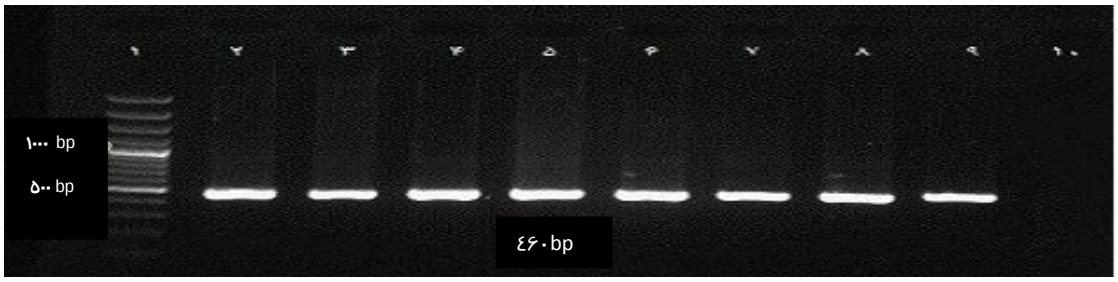
برش با آنزیم *Tai* 1 هر دو الگوی مقاوم و حساس را بروز داد (شکل ۳).

در این میان ۹۰ (٪۹۲/۷) نمونه باندهایی با اندازه‌های ۱۵٤، ۱۸۷ جفت باز مطابق با الگوی

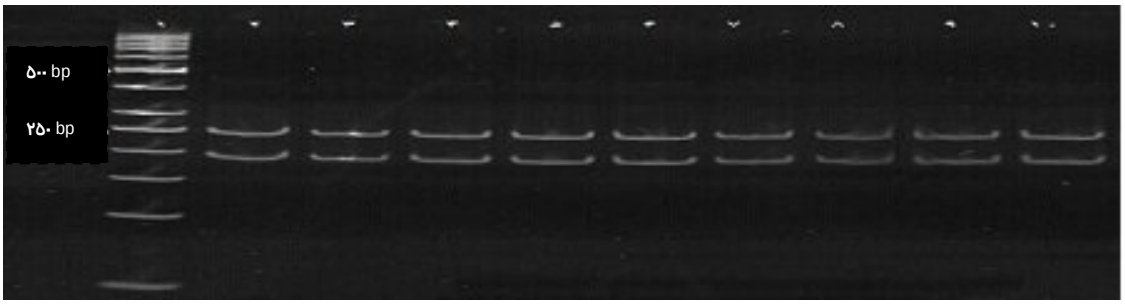
جدول ۱. نتیجه مقاومت آنتی بیوتیکی برای داروهای خط ۱ و ۲ به روش تناسبی

	INH	SM	RIF	EMB	CAP	AMK	KAN	CIP	DIS	OFX	PAS	ETH
درصد سویه های مقاوم	٪۷۰/۱	٪۲۸/۸	٪۶٤/۹	٪٤۸/٤	٪۱۳/٤	٪۳۱/۹	٪۲۷/۸	٪۱۸/۵	٪۱٤/٤	٪۱۸/۵	٪۱٤/٤	٪۱٤/٤
درصد سویه های حساس	٪۲۹/۹	٪۷۱/۲	٪۳۵/۱	٪۵۱/۶	٪۸۶/۶	٪۶۸/۱	٪۷۲/۲	٪۸۱/۵	٪۸۵/۶	٪۸۱/۵	٪۸۵/۶	٪۸۵/۶

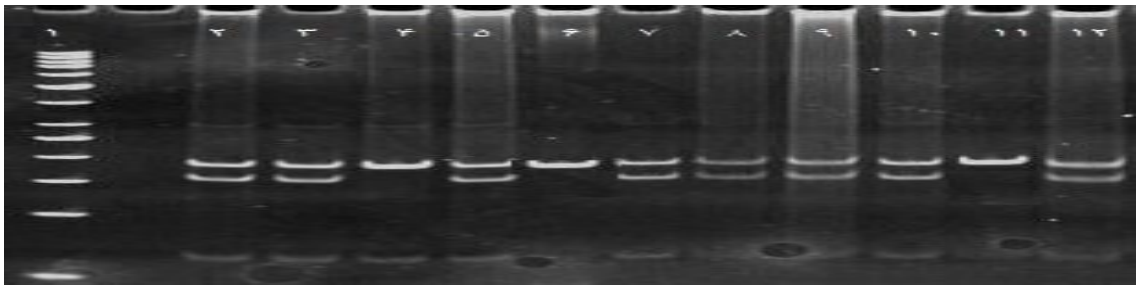
INH: Isoniazid , SM: Sterptomycin , RIF: Rifampin , EMB: Ethambutol , CAP: Capreomycin , AMK: Amikacin , KAN: Kanamycin , CIP: Ciprofloxacin, DIS: Dicycloserin, OFX: Ofloxacin, PAS: Para aminosalicylic acid, ETH: Ethionamide



شکل ۱.محصولات PCR ژن *rrs* بر روی ژل آگارز ٪۱/۵.ستون ۱مارکر مولکولی۱۰۰ bp plus , ستون ۹کنترل مثبت (H37RV), ستون ۱۰ کنترل منفی واکنش PCRاست.



شکل ۲. محصولات برش با آنزیم *Dde* 1 بر روی ژل پلی آکریل آمید ۸٪.ستون ۱ مارکر مولکولی ۵۰bp plus , ستون ۹-۲الگوی حساس دارای دو باند bp ۱۹۱،۲٤۸، ستون ۱۰ سویه H37 RV است.



شکل۳ . الگو های برش با آنزیم *Tai* 1 روی ژل پلی آکریل آمید ۸٪. ستون۱مارکر مولکولی ۵۰ bp plus ,ستون ۱۰،۹،۸،۷،۵،۴،۲ الگوی حساس دارای دو باند bp ۱۸۷و ۱۵٤، ستون،۶،۱۱،٤ الگوی مقاوم به دارو دارای دو باند بهم چسبیده bp ۱۸۵و۱۸۷ ،ستون ۱۲سویه H37RV است.

www.SID.ir

Archive of SID

حساس را نشان دادند. ۷ نمونه (۷/۳۵٪) نیز الگوی مقاوم یعنی باندهایی با اندازه‌های ۱۸۵، ۱۸۷ جفت باز را نمایان کردند. وجود الگوی مقاومت در این هفت نمونه نشانگر جهش در کدون‌های ۱٤۰۰/۱٤۰۱ می‌باشد. در مجموع این نتایج از ۹۷ نمونه مورد بررسی ۹۰ نمونه (۹۲/۷٪) حساس به آمیکاسین و ۷ نمونه (۷/۳٪) مقاوم به این دارو. تشخیص داده شدند. در بین سویه‌های مورد بررسی کدون ۱٤۰۰ بیشترین فراوانی جهش را به خود اختصاص داد. در این مطالعه ۶۲ نفر (۶۳/۹٪) ملیت ایرانی و ۹ نفر (۹/۳٪) ملیت افغان، ۲ نفر (۲/۱٪) ملیت عراقی، ٤ نفر (٤/۱٪) ملیت آذربایجانی، ۲۰ نفر (۲۰/۶٪) نیز ملیت غیر ایرانی (نامعلوم) داشتند.

بر اساس نتایج بدست آمده و استفاده از آزمون مربع کای، مقایسه بین روش PCR-RFLP و روش تناسبی انجام شد.

بین داده‌ها در روش PCR-RFLP و روش تناسبی ارتباط معنی‌داری دیده نشد ($p \geq ۰/۰۵$). در حالیکه در مقایسه روش PCR-RFLP با تعیین توالی DNA ارتباط معنی‌داری بین داده‌ها نشان داده شد ($p<۰/۰۵$) و نتایج حاصل از این دو روش با هم همپوشانی کامل داشتند.

بحث

در حال حاضر در کشور ما تشخیص مقاومت دارویی خط ۲ در بین سویه‌های MDR مایکو باکتریوم (در صورت انجام) با استفاده از روش‌های فنوتیپی و آزمون‌های حساسیت دارویی انجام می‌شود.

آزمون‌های حساسیت بر مبنای روش‌های کشت زمان بر و پر هزینه است و مشکلات متعددی در ارتباط با استاندارد کردن آزمون‌ها و پایداری داروها در محیط کشت‌های مختلف وجود دارد.

مایکوباکتریوم توبرکلوزیس یک ارگانیسم کند رشد است و استفاده از روش‌های مولکولی برای شناسایی جهش در ژن عامل مقاومت یک روش غربالگری سریع را ایجاد کرده است [۱۳].

تشخیص زود هنگام مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به دارو، در جلوگیری از انتشار موارد XDR و MDR در سطح جامعه و نجات جان افراد مسلول می‌تواند مؤثر باشد.

در این مطالعه با روش PCR-RFLP، ۹۰ نمونه (۹۲/۷٪) حساس به آمیکاسین و ۷ نمونه (۷/۳۵٪) مقاوم به آن تشخیص داده شدند. در کدون‌های مورد بررسی از ژن rrs کدون ۱٤۰۰ با بیشترین فراوانی (۱۰۰٪)، به عنوان نشانگر اصلی مقاومت شناسایی شد. از ۱۳ نمونه (۱۳/٤٪) XDR-TB این مطالعه، ۵ نمونه (۳۸/٤٪) ملیت غیر ایرانی داشتند که بیانگر اهمیت کنترل مرزها و جلوگیری از ورود بیماران مسلول مقاوم به دارو می‌باشد. همسایگی کشورمان با کشورهای افغانستان، پاکستان و عراق که بین ۸۰ تا ۸۵٪ موارد سل در دنیا را به خود اختصاص داده‌اند هم چنین با کشورهای استقلال یافته شمال کشور (با شیوع بالای MDR-TB)ضرورت توجه بیش از پیش به مرزها را مشخص می‌کند [۱٤].

مطالعات محدودی در زمینه به کارگیری روش‌های مولکولی، جهت شناسایی تغییرات ژنومی مرتبط با مقاومت به داروهای خط ۲ در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در دنیا انجام شده است.

استفاده از تکنیک PCR-RFLP در بررسی مقاومت به آمینوگلیکوزید کانامایسین توسط سوزوکی[1] و همکاران (۱۹۹۸) انجام شد. در این مطالعه از ٤۳ مورد مقاوم به کانامایسین ۲۹ مورد در موقعیت‌های ۱٤۰۰، ۱٤۰۱ و ۱٤۸۳ جهش داشتند ولی در هیچ یک از ۷۱ مورد حساس جهشی ملاحظه نشد. بیشترین فراوانی جهش در موقعیت ۱٤۰۰ (۶۰/٤٪) گزارش شد. به علاوه فراوانی جهش همزمان در موقعیت ۱٤۸۳ و ۱٤۰۱ (٤/۶٪) و در

[1]Suzuki

www.SID.ir

Archive of SID

کدون ۱۴۰۱ (۲/۳٪) بود. ضمن اینکه در ۱٤ نمونه (۳۲/۵٪) مقاوم جهشی دیده نشد [۹]. نتایج ما نیز با این یافته‌ها تطابق دارد. به طوری که بیشترین فراوانی جهش در کدون ۱٤۰۰ (۱۰۰٪) بود. اما در کدون‌های ۱٤۰۱ یا ۱٤۸۳ نمونه‌های مقاوم جهشی دیده نشد. هم چنین در ۲۵ نمونه (۸۰/۶٪) مقاوم به آمیکاسین و در تمام نمونه‌های حساس به دارو جهشی مشاهده نشد. از دیگر نتایج بررسی ما توانایی اندونوکلئازهای برش دهنده در تشخیص سویه‌های تیپ وحشی از جهش یافته می‌باشد. هم چنین کاربرد این نوع آنزیم‌ها در تمایز ژنوتیپی بین سویه‌های مقاوم بود. محصولات حاصل از هضم هر یک از آنزیم‌ها قطعاتی با اندازه‌های متفاوت ایجاد می‌نمود که این ویژگی قدرت تشخیصی روش را افزایش می‌داد. هم چنین جهش در موقعیت ۱٤۰۰ نشانگر مناسبی در تعیین مقاومت به سطوح بالای آمینوگلیکوزیدها می‌باشد.

نتایج حاصل از مطالعه ما با روش تعیین توالی DNA تایید شدند. صد درصد ایزوله‌هایی که با روش PCR-RFLP مقاوم بودند با تعیین توالی DNA نیز مقاوم نشان داده شدند. هم چنین ۱۰۰٪ موارد حساس به این دارو که فاقد هر گونه جهش بودند نیز با تعیین توالی تایید شدند.

احتمالا یکی از دلایل تفاوت در نتایج حاصل از روش تناسبی با روش مولکولی، وجود جهش در کدون‌هایی غیر از کدون‌های شناخته شده در دنیا در ارتباط با مقاومت به این دارو می‌باشد و لزوم بررسی کدون‌های بیشتر و سایر عواملی که در بروز مقاومت دارویی دخیل هستند را نشان می‌دهد. نمونه‌های فاقد جهش اما مقاوم به دارو نشانگر دخالت مکانیسم‌های دیگر در ایجاد مقاومت مانند تغییرات مورفولوژیک در نمونه‌های مقاوم به دارو [۱]، کاهش نفوذپذیری دیواره سلولی نسبت به داروها یا افزایش خروج داروها توسط پمپ‌های خارج کننده می‌باشد[۱۵].

در مطالعه‌ای که توسط فرنیا و همکاران در سال ۲۰۱۰ انجام شد تغییرات مورفولوژیک نمونه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس حساس به دارو، MDR، XDR، XXDR با استفاده از میکروسکوپ الکترونی و میکروسکوپ اتمی بررسی شد. چهار نوع تقسیم سلولی مشاهده و توضیح داده شد که سه نوع آن در تمام نمونه‌های مورد بررسی مشترک بود. نوع چهارم که تشکیل سلول‌هایی به شکل گرد از سلول‌های مادری میله‌ای شکل بود تنها در نمونه‌های XDR و XXDR مشاهده شد. تغییرات مورفولوژیک در پاسخ به تغییر شرایط محیطی طی چرخه‌های زندگی مایکوباکتریوم ایجاد می‌شود. در این بررسی نشان داده شد که اکثر موارد XDR و XXDR دارای شکلی گرد و اندازه‌ای کوچک هستندکه این ویژگی به آن‌ها در فرار از سیستم ایمنی میزبان و عدم فاگوسیته شدن، هم چنین غلبه بر اثرات ممانعتی آنتی بیوتیک‌ها کمک می‌نماید[۱].

نتیجه گیری

تمام موارد حساس به آمیکاسین با روش تناسبی، به روش PCR-RFLP نیز حساس نشان داده شد و از ۳۱/۹٪ مقاوم به روش تناسبی، ۲۳٪ با روش PCR-RFLP مقاوم تشخیص داده شد. روش PCR-RFLP می‌تواند به عنوان یک روش مکمل در تشخیص موارد مقاوم به این دارو استفاده شود. گرچه برای افزایش حساسیت روش PCR- RFLP نیاز به بررسی کدون‌های بیشتری از ژن *rrs* می‌باشد.

تشکر و سپاسگزاری

این مقاله بخشی از پایان نامه تحت عنوان (بررسی مقاومت دارویی خط۲ شامل (آمیکاسین و سپیروفلوکساسین) در بین سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس MDR با استفاده از: PCR-

www.SID.ir

Archive of SID

RFLP,PCR-SSCP) می‌باشد که در قالب طرح تحقیقاتی به شماره ب/MRC/۲۰۰۹/۱۱۲ در مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی انجام گردید.گروه مولفین بر خود لازم می‌داند از کارکنان محترم مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی به خاطر زحمات بی‌دریغ ایشان در تمام مراحل انجام کار کمال تشکر را داشته باشد.

References

1- Farnia P, Masjedi M R, Aghali Merza M, Tabarsi P, Zhavnerko G K, Ibrahim T A, et .al. Growth and cell-division in extensive (XDR) and extremely drug resistant (XXDR) tuberculosis strains: transmission and atomic force observation. Int J Clin Exp Med . 2010 Sep; 3(4): 308-14.
2- Aragon LM, Navarro F, Heiser V, Garrigó M, Español M, Coll P. Rapid detection of specific gene mutations associated with isoniazid or rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates using non-fluorescent low-density DNA microarrays. J Antimicrob Chemother. 2006 May; 57(5):825-31.
3- Ahmad S, Mokaaddas E.Recent advances in the diagnosis and treatment of multidrug-resistant tuberculosis .Respir Med. 2009 Aug;103:1777-1790.
4- Johnson R, Streicher EM, Louw GE,Warren RM,van Helden PD,Victor TC. Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Mol. Biol.2006 Jul; 8(2): 97–112.
5- Ministry of health and medical education, Diseases management center, Department of tuberculosis and leprosy control. http://www.cdc.hbi.ir/healthtopics/tb.htm.
6- Velayati AA, Masjedi MR, Farnia P, Tabarsi P, Ghanavi J, Ziazarifi AH, et al. Emergence of new forms of totally drug resistant tuberculosis bacilli: super extensively drug resistant tuberculosis or totally drug resistant strains in Iran. Chest . 2009 Apr ; 136(2): 420-5.
7- Lawn SD, Wilkinson R. Extensively drug resistant tuberculosis. BMJ . 2006 Sep; 333: 559–560.
8- Sander P, Meier A, Desmond EP. Ribosomal drug resistance in mycobacteria. Res Microbiol. 1996 Jan-Feb; 147: 59-67.
9- Suzuki Y, Katsukawa C, Tamaru A, Abe C, Makino M, Mizuguchi Y, et al. Detection of Kanamycin-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* by identifying mutations in the 16S rRNA gene. J Clin Microbiol .1998 May;36(5): 51220–1225.
10-Schwoebel V, Weezenbeek L V, Moro ML, Drobniewski F, Hoffner SE, Raviglione MC,et al. Standardization of antituberculosis drug resistance surveillance in Europe. Recommendations of a World Health Organization (WHO) and International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD) Working Group. Eur Respir J. 2000 Aug;16(2):364-71.
11- Hosek J, Svastova P, Moravkova M, Pavlik I, Bartos M. Methods of mycobacterial DNA isolation from different biological material.Veterinarni Medicina . 2006 Apr ;51: 180–192.
12-Kempsell K E , Ji Y E , Estrada-G I C E , Colston M J , Cox R A.The nucleotide sequence of the promoter, 16S & RNA and spacerregion of the ribosomal RNA operon of *Mycobacterium tuberculosis* and comparison with *Mycobacterium leprae* precursor rRNA. J. Gen. Microbiol. 1992 Aug; 938: 1717–1727.
13- Feuerriegel S, Cox H S, Zarkua N, Karimovich H A, Braker K, Ru¨sch-Gerdes S,et al. Sequence analyses of just four genes to detect extensively Drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains in Multidrug-Resistant tuberculosis patients undergoing treatment. Antimicrob Agents Chemother. 2009 Aug; 53: 3353–3356.
14- Limeschenko E, Tsalaki X, Jian M, Qian G. Hand book of TB. New York City: Wiley. 2008.p. 610-616.
15- Kocagöz T, Hackbarth CJ, Ünsal I, Rosenberg EY, Nikaido H, Chambers HF. Gyrase mutations in laboratory-selected, fluoroquinolone-resistant mutants of *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra.Antimicrob Agents Chemother. 1996 Aug; 40: 1768-74.

www.SID.ir

Archive of SID

Detection of Amikacin-Resistance among MDR Strains of *Mycobacterium tuberculosis* by Using PCR-RFLP *Method*

Tahmasebi P, MSc[1]; Sheikolslami FM, MD[2]; Farnia P, MD[3]; Sadeghizadeh M, MD[4]; Ramazanzadeh R, MD[5]; Kazempoor M, MSc[6]; Masjedi MR, MD[7]; Velayati AA, MD[8]

[1] Corresponding Author: MSc Student in Biolog Dept., Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran. Iran. E-mail:tahmasebiparisa@yahoo.com.
[2] Assistant Prof. of Mycobacteriology Research Centre (MRC), Shahid Beheshti University of Medical Sciences,Tehran, Iran.
[3] Associate Prof. of Medical Microbiology Dept., School of Medicine and Researcher in Mycobacteriology Research Centre (MRC), Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
[4] Prof. of Genetics Dept., School of Biological Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
[5] Associate Prof. of Microbiology Dept., School of Medicine and Researcher in Cellular & Molecular Research Center, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran.
[6] Lecturer in biostatistics Dept., School of Medicine, and Researcher in Mycobacteriology Research Centre (MRC), Shahid Beheshti University of Medical Sciences,Tehran, Iran.
[7] Prof. of Internal diseases Dept., School of Medicine and Researcher of National Research Institute of Tuberculosis and Lung Disease, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
[8] Prof. of Pediatrics Dept., School of Medicine and Researcher in National Research Institute of Tuberculosis and Lung Disease, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

ABSTRACT

Background & objectives: Amikacin is one of the key second-line drugs for treatment of tuberculosis. Mutations at the codons 1400, 1401and1483 of the 16srRNA gene are associated with resistance to amikacin. The purpose of this study was to detect these mutations using PCR-RFLP method in multi-drug resistant (MDR) strains of *Mycobacterium tuberculosis* showing resistance to amikacin.

Methods: Susceptibility of strains (n=100) against first and second–line anti-tuberculosis drugs was performed by proportional method. Based on antimicrobial resistance pattern 97 strains were analyzed by PCR-RFLP method. rrs1096 and rrs1539 primers were used to amplify a 460bp region of the rrs gene. Then, the PCR products were digested using *Tai* 1 and *Dde*1 restriction enzymes. The results were analyzed by the SPSS software using Chi-square test.

Results: Based on results from proportional method, 63 strains (64.9%) were MDR (Multiple Drug Resistant), 26 (26.8%) and 8 (8.2%) strains were susceptible and non-MDR, respectively. Also, 13.4% and 6.1% of the strains were XDR (Extensively Drug Resistant) and TDR (Totally drug resistant) respectively. Using PCR-RFLP method, 7 (7.2%) strains were resistant and 90 (92.7%) strains were susceptible to amikacin respectively. Moreover, we found that the mutation at the codon 1400 was the most frequent mutations responsible for resistance to amikacin.

***Conclusion*:** The PCR-RFLP method can be used as a supplemental method to detect resistance to amikacin; however to increase our knowledge, mutatuions in several number of codons in *rrs* gene need to be studied.

Key words: PCR-RFLP; *Mycobacterium tuberculosis*; MDR*; rrs*; Amikacin

www.SID.ir