Archive of SID

مجـلهی علمی، پژوهشی دانشگاه علـوم پزشکـی زنجـان
دورهی ۱۷، شـمارهی ٦٦، بهار ۱۳۸۸، صفحات ۲۹ تا ۴۰

تشخیص موتاسیون در کدون ۳۱۵ ژن *katG*، مارکر مقاومت به ایزونیازید در سوشهای مایکوباکتریوم توبرکولوزیس جدا شده از بیماران اصفهان و تهران با روش PCR-RFLP

دکتر پرویز مهاجری[۱]، دکتر اکبر توکلی[۲]، دکتر شراره مقیم[۳]

نویسندهی مسئول: کرمانشاه، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، دانشکده پزشکی، گروه میکروبشناسی p_mohajeri@yahoo.com

دریافت:۸۷/۸/۲۷ پذیرش:۸۸/۳/۹

چکیده

زمینه و هدف: *مقاومت دارویی سل، پیوسته در حال افزایش است و با توجه به محدود بودن داروهای موثر، وجـود ایـن مقاومـتهـا بـه عنـوان تهدیدی در برنامهی کنترل سل محسوب میشود. ایزونیازید بهعنوان موثرترین دارو در از بین بردن باسیلهای سل شناخته شده است که مقاومت به آن نیز براحتی ایجاد میشود. در این بین، موتاسیونهای katG مخصوصاً جانشینی S315T عامل مقاومت به ایزونیازیـد در اکثـر مـوارد سـل است. تواتر این جانشینی در جمعیتهای مختلف متفاوت است. مطالعهی حاضر مشخصههای مولکولی مقاومت به ایزونیازیـد را در سـویههـای باسیلسل نشان میدهد که از آن میتوان بهعنوان ابزار سریع تشخیصی مقاومت استفاده نمود.*

روشبررسی: *با استفاده از روش نسبی ۱ درصد، حساسیت ۱۲۶ سویهی مایکوباکتریوم توبرکولوزیس جدا شـده از بیمـاران شـهرهای اصـفهان و تهران نسبت به ایزونیازید تعیین شد. نوع موتاسیون در کدون ۳۱۵ ژن katG در سویههای مقاوم به ایزونیازید با استفاده از روش PCR-RFLP مشخص گردید. بدینمنظور محصول ۳۵۵ جفت بازی PCR بهوسیلهی آنزیم MspI برش داده شد.*

یافتهها: *از ۱۲۶ مایکوباکتریوم توبرکولوزیس جدا شده، ۳۲ سویه (۲۵/۴ درصد) مقاوم به ایزونیازید بود. میزان این مقاومت در نمونههای اصفهان ۲۲/۶ درصد (۱۹ سویه) و در نمونههای تهران ۳۱ درصد (۱۳ سویه) بود. در کل، ۷۲ درصد از انواع جدا شدهی مقاوم به ایزونیازید با اسـتفاده از آنالیز لوکوس katG 315 قابل تشخیص بود.*

نتیجهگیری: *PCR-RFLP با MspI بیشتر سویههای مقاوم ایزونیازیـد (۷۲ درصـد) را کـه دارای موتاسـیون در کـدون ۳۱۵ ژن katG بودنـد مشخص نمود. توجه به جنبههای مولکولی سویههای مقاوم به ایزونیازید منجر به ارایهی ابزارهای ژنوتیپی مختلف برای تشخیص سریع مقاومـت به ایزونیازید در انواع جدا شدهی کلینیکی میشود.*

واژگان کلیدی: مایکوباکتریوم توبرکولوزیس، ایزونیازید، PCR-RFLP، katG، اصفهان، تهران

۱- دکترای باکتریشناسی پزشکی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه
۲- دکترای میکروبشناسی، استاد دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
۳- دکترای ویروسشناسی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

سالیانه، سل موجب مرگ حدود ۲ میلیون نفر در دنیا می‌شود و اکثر این موارد در کشورهای در حال توسعه یا عقب مانده اتفاق می‌افتد. سازمان جهانی بهداشت تخمین زده است که بین سالهای ۲۰۰۰ و ۲۰۲۰، نزدیک به یک بیلیون فرد دیگر به سل آلوده خواهند شد و از این میان ۲۰۰ میلیون نفر به بیماری مبتلا شده و ۳۵ میلیون نفر نیز بر اثر بیماری سل جان خود را از دست خواهند داد (۲و۱). علی رغم پیشرفت‌هایی که در درمان و مهار بیماری سل حاصل شده، هنوز هم این بیماری به‌عنوان یکی از مشکلات عمده‌ی بهداشتی مخصوصاً در کشورهای در حال توسعه باقی است (۳). در حال حاضر ایزونیازید و ریفامپین در کنار هم شالوده‌ی درمان شیمیائی کوتاه مدت عفونت‌های مایکوباکتریوم توبرکولوزیس را تشکیل می‌دهند (۵و۴). مشاهدات پیشین حاکی از آن است که باسیل‌های سل، در مجاورت با ایزونیازید خاصیت مقاومت به رنگ‌بری با اسید را از دست داده، از بین می‌روند. بدین ترتیب محققین حدس می‌زنند که این دارو باعث تغییر در ترکیب لیپیدی دیواره‌ی سلولی شود (۶). تشخیص مایکوباکتریوم توبرکولوزیس و نیز تعیین الگوی حساسیت دارویی آن ارزش فراوانی در بکارگیری روش‌های درمانی موثر و نیز کنترل جهانی سل دارد (۷). ظهور سویه‌های مقاوم دارویی مایکوباکتریوم توبرکولوزیس، مانع بزرگی را در مسیر درمان و کنترل بیماری ایجاد نموده است. رویداد سل مقاوم به دارو در نقاط مختلف جغرافیایی یکسان نیست. فراوانی سویه‌های MDR (سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکولوزیس با مقاومت توام به ایزونیازید و ریفامپین) سالهاست که در حال افزایش است و تاکنون چندین مورد از شیوع آنها گزارش شده است. استونی، ایران، چین، هند و برخی نواحی روسیه بعنوان اندمیک ترین نواحی وجود مقاومت دارویی معرفی شده است. مطالعات انجام گرفته نشان می‌دهد که نزدیک ۵ درصد از باسیل‌های سل کشت داده شده از بیماران ایرانی، MDR هستند (۸). مقاومت دارویی در یک جمعیت باکتریایی بزرگ باسیل سل در پی موتاسیون‌های خودبخودی تک مرحله‌ای و اتفاقی روی می‌دهد. احتمال بروز موتاسیون‌های مرتبط با مقاومت دارویی برای ریفامپین$^{-۸}$۱۰ است در حالی‌که این مقدار در خصوص ایزونیازید و برخی از داروهای مرسوم ضد سلی $^{-۶}$۱۰ است (۹). بررسی خصوصیات مولکولی سویه‌های باسیل سل مقاوم به داروی متعلق به نواحی جغرافیایی مختلف، اطلاعات مفیدی برای ارایه‌ی روش‌های مولکولی بهتر تشخیص مقاومت دارویی فراهم می‌آورد (۱۰). آنزیم katG باسیل سل هم به‌عنوان یک آنزیم کاتالاز باعث حذف پراکسید هیدروژن شده و هم به‌عنوان یک آنزیم پراکساید می‌تواند ایزونیازید را اکسید کرده و به‌فرم فعال درآورد تا بتواند اثر ضد سلی داشته باشد (۱۱).

مقاومت مایکوباکتریوم توبرکولوزیس به ایزونیازید ممکن است به‌واسطه‌ی انواع مختلفی از موتاسیون‌هایی روی دهد که حداقل در سه ژن مختلف ***katG***، ***InhA*** (کد کننده‌ی پروتئین انوئیل اسیل کاریر ردکتاز) و ***kasA*** (کد کنندی β- کتواسیل ACP سنتتاز) و ناحیه‌ی بین ژنی ***oxyR- ahp***C پدید می‌آیند. موتاسیون‌هایی که در ***katG*** اتفاق می‌افتد مخصوصاً جانشینی S315T، مسئول بروز اکثر موارد مقاومت به ایزونیازید محسوب می‌شود. گرچه، فراوانی جانشینی S315T ***katG*** در جمعیت‌های مختلف، یکسان نیست (۱۲). برخی از این موتاسیون‌ها باعث بروز تغییرات کونفورماسیونی در katG می‌شوند و برخی نیز از اتصال ایزونیازید جلوگیری می‌کنند (۱۳). به عبارت دیگر، به نظر می‌رسد تغییرS315T که در محل اتصال ایزونیازید بروی katG روی می‌دهد عامل بخش عمده‌ای از شکست‌های درمانی سل باشد. هدف از مطالعه‌ی ما، تعیین فراوانی موتاسیون S315T ژن ***katG*** انواع جدا شده‌ی باسیل سل مقاوم به ایزونیازید جدا شده در اصفهان و تهران بود.

www.SID.ir

Archive of SID

روش بررسی

جداسازی مایکوباکتریوم توبرکولوزیس، کشت و تشخیص- ۱۲۶ نمونه‌ی باسیل سل جدا شده از بیماران مراجعه کننده به مرکز سل اصفهان، انستیتو پاستور و بیمارستان مسیح دانشوری تهران موجود در بانک میکروبی بخش مایکوباکتریولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت. پس از کشت اولیه برروی محیط لونشتین جانسون و رنگ آمیزی زیل نلسون، از تست‌های تولید نیاسین، احیای نیترات، IS6110 PCR، مورفولوژی کلنی، تولید پیگمان و سرعت رشد برای تشخیص باکتری استفاده شد. جهت انجام IS6110 PCR از پرایمرها و روشی استفاده شد که هلیر و همکارانش ارائه نموده بودند (۱۴).

تست تعیین حساسیت به ایزونیازید- از محیط لونشتین جانسون و روش مرسوم نسبی ۱ درصد که توسط کانتی و همکارانش ابداع شده جهت انجام تست تعیین حساسیت به ایزونیازید استفاده شد (۱۵). به‌طور خلاصه در این روش، غلظت مناسب ایزونیازید (۰/۲ میکروگرم در میلی‌لیتر) در محیط لونشتین جانسون تهیه شد و سپس این محیط به‌وسیله‌ی ۰/۱ میلی لیتر از غلظت 10^{-2} و 10^{-4} جدا شده‌ی باسیل سل که از سوسپانسیون یک‌مک‌فارلند تهیه شده بود کشت داده شد. از محیط فاقد ایزونیازید بعنوان محیط شاهد استفاده شد. محیط‌های کشت این مرحله، بمدت ۳ هفته در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد. اگر تعداد کلنی‌های رشد کرده برروی محیط کشت حاوی دارو کمتر از ۱ درصد محیط کشت فاقد ایزونیازید باشد، باسیل جدا شده‌ی مربوطه حساس تلقی می‌شود و اگر تعداد کلنی‌های محیط کشت حاوی دارو، ۱ درصد یا بیشتر از محیط کشت فاقد دارو باشد ایزوله‌ی مورد نظر، مقاوم تلقی می‌گردد. نتایج تست تعیین حساسیت، با استفاده از محیط 7H10 تائید شد. از باسیل سل H37Rv ATCC 27294 نیز به‌عنوان سویه‌ی شاهد و استاندارد که به تمام داروهای ضد سلی حساس است استفاده شد. میزان مقاومت به‌صورت درصد کلنی‌های رشد کرده بروی محیط‌های کشت حاوی دارو گزارش گردید (۱۶).

استخراج DNA باکتری- جهت استخراج DNA، ابتدا باکتری از سطح محیط لونشتین جانسون برداشت شد و به لوله‌ی میکروسانتریفوژ حاوی یک میکرولیتر بافر TE منتقل شد. روش CTAB که توسط گوری و همکاران طراحی شده جهت استخراج DNA کروموزومال بکار رفت (۱۷). به‌طور خلاصه، ابتدا سوسپانسیون در دمای ۸۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه قرار داده شد تا باکتری‌ها کشته شوند. سپس سوسپانسیون با لیزوزیم ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت یک ساعت مجاور شد. سوسپانسیون حاصل با SDS یک درصد و ۰/۱ میلی گرم در میلی لیتر پروتئیناز K در دمای ۶۵ درجه به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شد. برای کامل شدن تلاشی باکتری از N–اتیل–NNN– تری متیل آمونیوم بروماید در دمای ۶۵ درجه‌ی سانتی‌گراد، به مدت ۱۰ دقیقه استفاده شد. DNA استخراج شده از باکتری‌های متلاشی شده با استفاده از کلروفرم– ایزوآمیل الکل و سپس رسوب دادن با ایزوپروپانل جدا شد. غلظت DNA نیز با اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد.

تشخیص موتاسیون *katG* S315T با استفاده از PCR-RFLP- از touchdown PCR، کنترل‌های مثبت و منفی و شرایط استریل جهت تکثیر نواحی مورد نظر استفاده شد. در طی این مرحله، ناحیه‌ی ۳۵۵ جفت بازی ژن *katG* (Genbank accession BX842578 region 75186-77408) با استفاده از پرایمرهایی که احمد و همکارانش ارایه نموده بودند تکثیر شد (۱۸).

www.SID.ir

Archive of SID

katG F: 5'-CCC ATG GCC GCG GCG GTC GAC ATT-3'
katG R: 5'-CGC CGT CCT TGG CGG TGT ATT GCC-3'

حجم نهایی مخلوط PCR، ۵۰ میکرولیتر و حاوی بافر Roche PCR، ۱۰ پیکومول از هر پرایمر، ۱۰ نانوگرم DNA استخراج شده، ۰/۱ میکرومولار dNTP و ۲ واحد آنزیم DNA پلی مراز Taq (سیناژن) بود. PCR با استفاده از ماسترسایکلر اپندورف ۵۳۳۲ انجام گرفت. تلاشی اولیه‌ی پروتیئن‌ها در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، ۹۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به‌مدت یک دقیقه و در ادامه، سه سیکل شامل یک دقیقه در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در ۶۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و یک دقیقه در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد، سه سیکل شامل یک دقیقه در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در دمای ۶۳ درجه‌ی سانتی‌گراد و یک دقیقه در ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد، سه سیکل شامل یک دقیقه در ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در دمای ۶۱ درجه‌ی سانتی‌گراد و یک دقیقه در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد، سه سیکل شامل یک دقیقه در ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در دمای ۵۹ درجه و یک دقیقه در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد، سه سیکل شامل یک دقیقه در ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در دمای ۵۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و یک دقیقه در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد و در آخر ۵ دقیقه در دمای۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۵ دقیقه انجام شد.

یافته‌ها

اطلاعات دموگرافیک- از میان ۱۲۶ نمونه‌ی باسیل سل، ۸۴ مورد (۶۷ درصد) مربوط به شهر اصفهان و ۴۲ مورد (۳۳ درصد) مربوط به تهران (۳۴ بیمار از انستیتو پاستور و ۸ بیمار از بیمارستان مسیح دانشوری) بود. ۸۵ نفر از بیماران مرد (۶۷/۵ درصد) و ۴۱ نفر (۳۲/۵ درصد) زن بودند. ۹۶ نفر از بیماران ایرانی (۷۶/۲ درصد) و ۳۰ نفر (۲۳/۸ درصد) افغانی بودند.

الگوهای مقاومت به ایزونیازید- از ۱۲۶ نمونه‌ی جدا شده‌ی باسیل سل، ۳۲ سویه (۲۵/۴ درصد) مقاوم به ایزونیازید بودند. میزان مقاومت در نمونه های جمع آوری شده در اصفهان ۲۲/۶ درصد (۱۹ مورد) و در تهران ۳۱ درصد (۱۳ سویه) بود.

تشخیص و آنالیز موتاسیون در کدون ۳۱۵ ژن *katG*- PCR قطعه‌ی IS6110، در مورد تمام نمونه‌های جدا شده با تکثیر محصول، ۱۲۳ جفت بازی همراه بود که بروی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شد (شکل ۱). موتاسیون ACC در کدون ۳۱۵ ژن *katG* با استفاده از PCR قطعه‌ی مربوط به کدون ۳۱۵ و سپس تاثیر آنزیم محدود کننده‌ی *MspI* (سایت برش C↑CGG) تشخیص داده شد (PCR-RFLP). موتاسیون AGC به ACC (GCGG به CCGG) با کسب یک سایت برش جدید برای آنزیم *MspI* همراه بود. قطعه‌ی تکثیر یافته‌ی باسیل سل H37Rv همانند جدا شده‌های کلینیکی فاقد ACC در کدون ۳۱۵ بود. بنابراین محصول هضم *MspI* در این موارد، سه قطعه ۱۵۱، ۱۱۴ و ۷۹ جفت بازی گردید.

در حالیکه قطعات مربوط به جدا شده‌های دارای ACC (Ser315Thr)، چهار قطعه‌ی ۱۳۰، ۱۱۴، ۷۹ و ۲۱ جفت بازی گردید. همانطور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، در پی این تغییر با پیدایش یک محل برش جدید، قطعه‌ی ۱۵۱ جفت بازی به دو قطعه‌ی ۱۳۰ و ۲۱ جفت بازی تبدیل شد (۲۰و۱۹). در این مطالعه موتاسیون AGC به ACC در کدون ۳۱۵ (سرین به تره اونین) با استفاده از تکنیک PCR-RFLP و آنزیم محدودکننده‌ی *MspI* در ۲۳ مورد از تعداد کل ۳۲ سویه‌های جدا شده‌ی مقاوم به ایزونیازید تشخیص داده شد. جدول شماره یک توزیع فراوانی موتاسیون‌های ایجاد کننده‌ی مقاومت در انواع

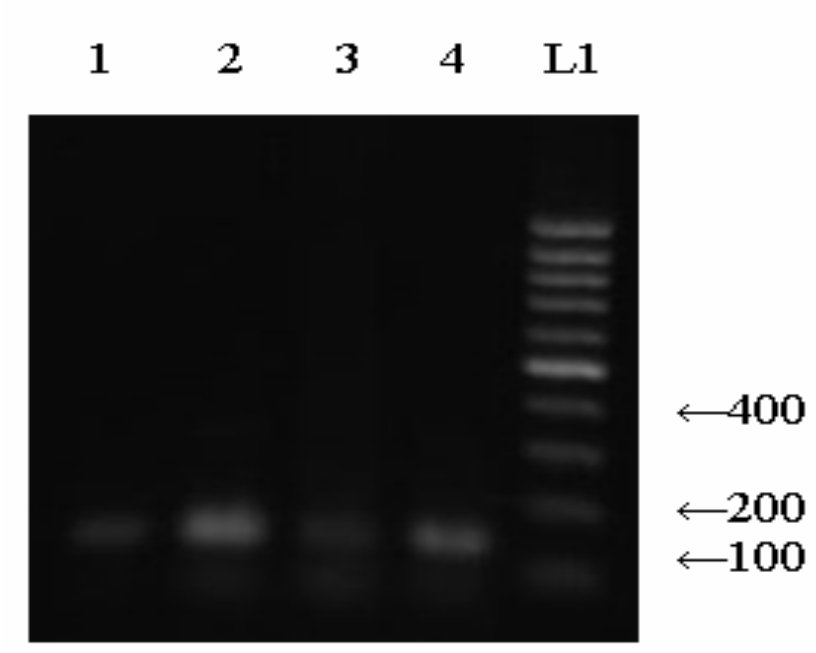
www.SID.ir

Archive of SID

جدا شده‌ی مقاوم را در شهرهای اصفهان و تهران نشان می‌دهد. از ۲۳ مورد ذکر شده ۱۵ مورد به اصفهان، ۷ مورد به انستیتو پاستور و یک مورد نیز به بیمارستان مسیح دانشوری تعلق داشت. نتیجه‌ی تعیین توالی DNA در شکل 2c وجود این موتاسیون را تایید می‌کرد. به عبارت دیگر، ۷۲ درصد ایزوله‌های مقاوم به ایزونیازید (۲۳ سوش) را توانستیم با استفاده از آنالیز تنها لوکوس 315 *katG* تشخیص دهیم. موتاسیونی در ۹ سوش باقی‌مانده در این لوکوس مشاهده نشد. هیچ یک از سویه‌های حساس نیز موتاسیونی در کدون ۳۱۵ نداشتند (جدول ۱).

جدول ۱: توزیع فراوانی موتاسیون‌های ایجادکننده‌ی مقاومت در انواع باسیل سل مقاوم به ایزونیازید در شهرهای اصفهان و تهران

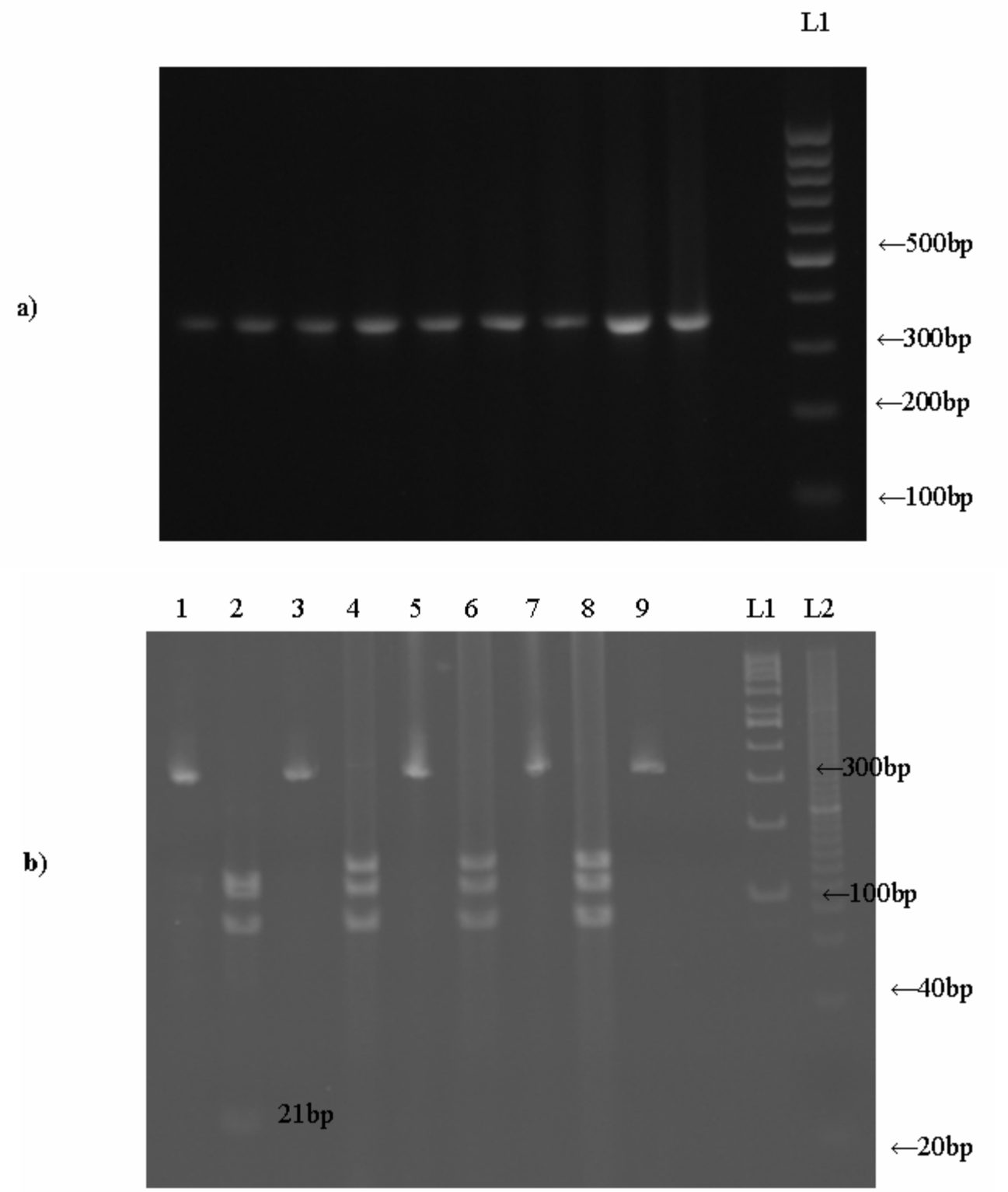
نوع موتاسیون / شهر	موتاسیون احتمالی در سایر نواحی		موتاسیون در کدون ۳۱۵ ژن *katG*		جمع	
	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد
اصفهان	۲۲/۱ درصد	۴	۷۸/۹ درصد	۱۵	۱۰۰ درصد	۱۹
تهران	۳۸/۵ درصد	۵	۶۱/۵ درصد	۸	۱۰۰ درصد	۱۳
جمع	۲۸/۱ درصد	۹	۷۱/۹ درصد	۲۳	۱۰۰ درصد	۳۲



شکل ۱: الکتروفورز قطعه‌ی آمپلی فای شده‌ی ۱۲۳ جفت بازی IS6110 بروی ژل آگارز ۲ درصد (لاین‌های ۱ تا ۴). DNA لدر فرمنتانس ۱۰۰ جفت بازی (لاین L)

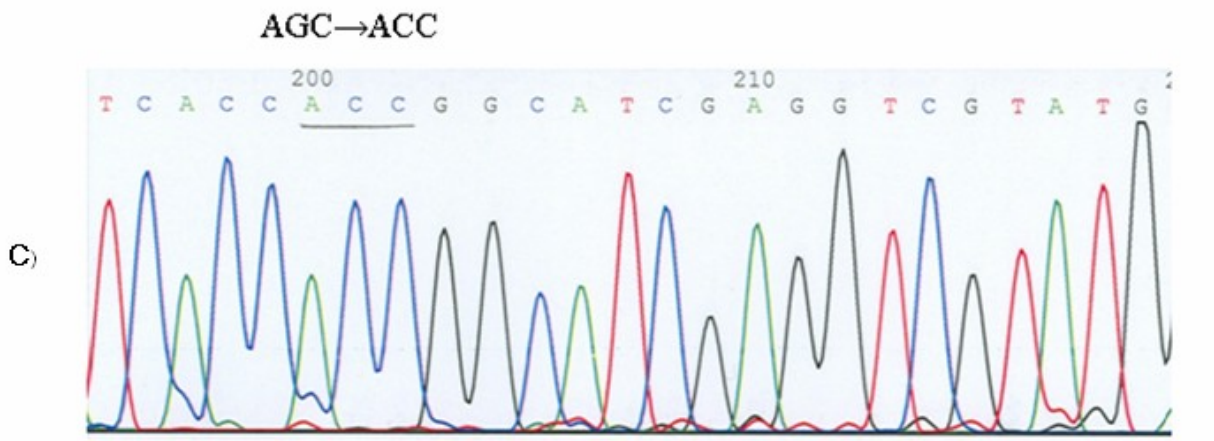
www.SID.ir

Archive of SID



www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲: آمپلیفیکاسیون ناحیه‌ی ژنی katG اطراف کدون ۳۱۵ با پرایمرهای katG F, R (شکل a و باندهای ۱، ۳، ۵، ۷ و۹شکل b). الگوهای RFLP آمپلیفیکاسیون katG بعد از هضم جدا شده‌های کلینیکال مایکوباکتریوم توبرکولوزیس مقاوم به ایزونیازید (باند۲) و حساس به ایزونیازید (باندهای ۴، ۶، ۸). یک DNA لدر ۱۰۰ جفت بازی (لاین L1) و یک DNA لدر ۲۰ جفت بازی (لاین L2) در باندهای آخر قرار دارد. الگوی موجود در باند ۲مشخصه‌ی جانشینی S315T در کدون ۳۱۵ است. جزئیات الگوهای RFLP در متن آمده است. شکل a مربوط به ژل آگارز ۱ درصد و شکل b مربوط به ژل پلی اکریلامید ۱۰ درصد است. در شکل c الکتروفوروگرام سکونسینگ DNA پس از آمپلی‌فیکاسیون katG با PCR آورده شده است. (مربوط به نمونه‌ی لاین ۱ شکل 2b) شکل نشان‌دهنده‌ی یک موتاسیون در کدون ۳۱۵ (AGC→ACC, Ser→Thr) است.

بحث

در حال حاضر تست‌های تعیین حساسیت دارویی به‌عنوان ابزاری مناسب برای انتخاب رژیم‌های درمانی مناسب جهت درمان موفق مسلولین مخصوصاً سل مقاوم چند دارویی بکار می‌رود. از سویی نیز انجام این تست‌ها، ارزیابی میزان تاثیر برنامه‌ی کنترل سل به‌خصوص انواع سل مقاوم به دارو را ممکن می‌سازد (۲۱). روش‌های مختلفی برای تعیین حساسیت باسیل سل به داروهای ضد سل وجود دارد ولی هیچیک از آنها کامل نیست و نتایج آنها پزشکان را برای درمان موثر مسلولین چندان راضی نمی‌کند. جهت انجام روش‌های متداول کلینیکی مثل روش‌نسبی و روش‌مطلق، نیاز به پرسنل کارآمد و ماهر و صرف زمان طولانی و هزینه‌ی بالا می‌باشد و در عین حال نتایج این تست‌ها چندان قابل تکرار و مطمئن نیست (۲۲). ایران یکی از کشورهایی است که میزان ابتلا به سل در آن بالاست. مطالعات اخیر نشان می‌دهد که ایران یکی از مناطق اندمیک انواع جداشده‌های مقاوم به دارو نیز هست (۵و۳). بنابراین بکار بردن روش‌های مولکولی برای تشخیص موتاسیون‌هایی که مرتبط با مقاومت دارویی است می‌تواند زمان مورد نیاز برای شناسایی انواع مقاوم را تا حدود زیادی کاهش دهد. در حال حاضر تست‌های شناسایی ژنوتیپ مقاومت به داروهای ضد سل، به‌واسطه‌ی سرعت عمل و نتایج موثق، گزینه‌ی مناسبی برای جانشینی تست‌های مرسوم تعیین حساسیت محسوب می‌شود (۷). گرچه مطالعات انجام گرفته نشان می‌دهد که در بروز مقاومت به ایزونیازید ممکن است انواع مختلفی از موتاسیون‌ها در مناطق ژنی گوناگون دخالت داشته باشد، ولی شیوع بالای جانشینی سرین با تره اونین در کدون ۳۱۵ ژن katG شناسایی این موتاسیون را روش مناسبی برای غربالگری مقاومت به ایزونیازید در

www.SID.ir

Archive of SID

انواع کلینیکی باسیل سل مطرح می‌سازد. مطالعات فراوان انجام گرفته حاکی از آن است که مقاومت به ایزونیازید تا حدود زیادی در رابطه با موتاسیون‌هایی است که در *katG* اتفاق می‌افتد. آبال و همکارانش در مطالعه‌ای، نشان دادند که ۶۹ درصد انواع مقاوم به ایزونیازید در کویت، حاصل جانشینی S315T در *katG* بودند (۲۰). مطالعات دیگر انجام گرفته فراوانی این نوع موتاسیون را در ترکیه ۶۳ درصد، در روسیه ۹۸ درصد، در دبی ۶۴ درصد، و در بیروت ۳۵ درصد نشان می‌دهد (۲۴و ۲۱و۱۲)، سایر مطالعات میزان شیوع این موتاسیون را ۷۴ درصد در دهلی، ۵۹ درصد در کره جنوبی و ۵۵ درصد در هلند نشان می‌دهند (۲۶و۲۵، ۲۳). احمد و همکارانش نشان دادند که اکثر انواعی که به سه یا چند دارو مقاومند و MDR محسوب می‌شوند (۷۲/۷ درصد) حامل جانشینی S315T هستند و۷۰ درصد ایزوله‌های دبی (امارات متحده عربی) که تنها به ایزونیازید مقاومت دارند حامل این نوع موتاسیون می‌باشند (۲۷). دوستار و همکارانش در طی مطالعه‌ای که به تازگی انجام گرفته، نشان دادند حدود ۵۶ درصد از انواع جدا شدی باسیل سل مقاوم به ایزونیازید دارای موتاسیون سرین به تره اونین در کدون ۳۱۵ ژن *katG* هستند (۲۸). ذاکر بستان آباد و همکارانش نیز در مطالعه‌ای در شرق ایران، فراوانی این نوع موتاسیون را ۶۱ درصد تعیین کرده‌اند (۲۹). همچنین مطالعات صورت گرفته نشان می‌دهد که وجود تره اونین در کدون ۳۱۵، برای مقاومت به ایزونیازید ۱۰۰ درصد اختصاصی است و هیچ سویه‌ی حساسی این اسید آمینه را در موقعیت ۳۱۵ ندارد (۳۰، ۲۷) در مطالعه‌ای که انجام دادیم فراوانی موتاسیون در کدون ۳۱۵ ژن *katG* در میان انواع باسیل سیل مقاوم به ایزونیازید، ۷۲ درصد بود و بدین ترتیب می‌توان دریافت که این نوع موتاسیون تا حدود زیادی می‌تواند پیش‌بینی کننده‌ی مقاومت به ایزونیازید در جمعیت باسیل‌های سل منطقه باشد. نتایج مطالعه‌ی ما به همراه سایر مطالعاتی که اخیراً انجام گرفته نشان می‌دهد که رابطه‌ی مشخص بین وجود موتاسیون در کدون ۳۱۵ و مقاومت به ایزونیازید در انواع جداشده‌ی باسیل سل وجود دارد (۳۱). در این مطالعه، ما از روش PCR-RFLP برای تشخیص موتاسیون S315T در *katG* استفاده کردیم و قطعه‌ی ۳۵۵ جفت بازی حاصل از تکثیر ژن *katG* با استفاده از آنزیم محدود کننده‌ی *MspI* هضم شد. موتاسیون‌هایی که در کدون ۳۱۵ اتفاق می‌افتد می‌تواند باعث تغییر در سایت‌های برش *MspI* گردد که با آنالیز RFLP قابل پی‌گیری است. بدین ترتیب می‌توان دریافت که PCR-RFLP ابزار مناسبی برای شناسایی جهش‌ها فراهم می‌آورد. با استفاده از این تکنیک می‌توان در مناطقی که انواع جدا شده‌ی باسیل سل مقاوم به ایزونیازید دارای فراوانی بالایی هستند، الل جهش‌یافته را از انواع وحشی افتراق داد. از سویی این روش تا حدودی ارزان است و تنها نیازمند انجام PCR معمول و در پی آن الکتروفورز می‌باشد. بنابراین می‌توان این روش را به‌صورت معمول در بسیاری از آزمایشگاه‌های نه چندان پیشرفته انجام داد. باکونیت و همکارانش، حساسیت و ویژگی PCR-RFLP را به ترتیب ۸۵/۷ و۱۰۰ درصد تعیین نمودند (۳۱). نتایج مطالعه‌ی اخیر نیز مانند اکثر مطالعات انجام گرفته در ایران و سایر کشورها نشان می‌دهد که درصد قابل توجهی از انواع جداشده‌ی باسیل سل مقاوم به ایزونیازید دارای جهش S315T در ژن *katG* هستند.

با توجه به شواهد موجود در خصوص شیوع بالای جهش S315T در *katG* در مناطق مختلف ایران بنظر می‌رسد که تکنیک PCR-RFLP را بتوان به‌عنوان ابزاری ساده و سریع جهت تشخیص مقاومت به ابزونیازید در باسیل‌های سل کلینیکی معرفی نمود، تا با انجام تنها یک تست بتوان درصد قابل ملاحظه‌ای از جدا شده‌های مقاوم به ایزونیازید را تشخیص داد. مطالعه‌ی حاضر نشان می‌دهد که می‌توان باسیل‌های سل مقاوم به ایزونیازید را از طریق بررسی منطقه‌ای که بیشترین تغییرات ژنتیکی را در ژن *katG* متحمل

www.SID.ir

Archive of SID

می‌شود و باعث تغییر توالی اسید آمینه‌ای می‌گردد غربالگری نمود. البته می‌بایست یادآور شد که تنها با بررسی موتاسیون S315T نمی‌توان تمام انواع مقاومت به ایزونیازید را تشخیص داد و کماکان جهت بررسی کل ایزوله‌ها نیاز به انجام تست‌های مرسوم تعیین حساسیت می‌باشد و این امر ناشی از وجود موتاسیون‌های متنوعی است که در مناطق مختلفی از ژنوم باکتری روی می‌دهد.

نتیجه‌گیری

در مطالعه‌ای که انجام گرفت حذف کامل *katG* مشاهده نشد. بدین ترتیب می‌توان تصور کرد که عدم حضور ژن *katG* می‌تواند برروی بقای انواع جدا شده اثر منفی داشته باشد. از سوی دیگر نتیجه‌ی فوق تأییدی بر این فرضیه است که باسیل سل کلینیکی حامل موتاسیون در کدون ۳۱۵ ژن *katG* کماکان بیماریزا می‌ماند (۳۲). طبق مطالعه‌ی انجام شده می‌توان پیش‌بینی کرد که در کشورهای در حال توسعه، غربالگری باسیل سل برای حضور موتاسیون S315T ممکن است ابزار مفیدی را جهت تشخیص انواع مقاوم به ایزونیازید فراهم نماید تا بتوان دستورالعمل مفیدی را برای کنترل و مهار مقاومت دارویی تدوین نمود.

تشکر و قدردانی

از آقایان دکتر نصر اصفهانی، یزدانی، صالحی، بهره‌مند، کریمی، رادی، عجمی، متیاری (Mitari)، بروش (Brosch)، زینف (Zainulf)، حسن زاده و همایی که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند، صمیمانه متشکریم.

منابع

1- Frieden TR, Sterling TR, Munsiff SS, Watt CJ, Dye C. Tuberculosis. *Lancet.* 2003; 362: 887-99.

2- Corbett EL, Watt CJ, Ealker N, et al. The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic. *Arch Intern Med.* 2003; 163: 1009-21.

3- Morris RP, Nguyen L, Gatfield J, Visconti K, Nguyen K. Ancestral antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005; 102: 12200-5.

4- Armstrong S, McDermott R, Klavdt K. TB: WHO report on the tuberculosis epidemic. Geneva, WHO, 1997. 52.

5- Davis PD. The worldwide increase in tuberculosis: how demographic changes, HIV infection and increasing numbers in poverty are increasing tuberculosis. *Ann Med.* 2003; 35: 235-43.

6- Narvskaya O, Otten T, Limeschenco E, et al. Nosocomial outbreak of multidrug-resistant tuberculosis caused by a strain of *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family in St.Petersburg, Russia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2002; 21: 596-602.

7- Tavakoli A, Safaee HG, Navvabakbar F, Salehi M, Bahremand A, NasrIsfahani B. Mutations in the *rpoB* gene of rifampin resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Isfahan by PCR-SSCP. *J Sci IR IRAN.* 2005; 16(2): 131-8.

8- Mohammad S, Ibrahim P and Sadikun A. Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to

www.SID.ir

Archive of SID

isoniazid and its derivative, 1-isonicotinyl-2-nonanoyl hydrazine: *investigation at cellvlar level Tuberculosis.* 2004; 84: 56-62.

9- Espinal MA, Kim SJ, Suarez PG, et al. Standard short-course chemotherapy for drug-resistant tuberculosis: treatment outcomes in 6 countries. *JAMA.* 2000; 283: 2537-45.

10- Amiri MV, Mirsaeldi SM, Mohajer K, Mansoori SD, Tabarsi P, Masjedi MR. Pattern of drug resistance in pulmonary TB patients. Tanaffos. 2003; 2: 47-51.

11- Paramasivan CN, Venkataraman P. Drug resistance in tuberculosis in India. *Indian J Med Res.* 2004; 120: 377-86.

12- Aktas E, Durmaz R, Yang D, Yang Z. Molecular characterization of isoniazid and rifampin resistance of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Malatya, Turkey. *Microb Drug Resist.* 2005; 11: 94-9.

13- Ramaswamy S, Musser JM. Molecular genetics basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuber Lung Dis.* 1998; 79: 3-29.

14- Tang X, Morris SL, Langone JJ, Bockstahler LE. Microarray and allele specific PCR detection of point mutations in *Mycobacterium tuberculosis* genes associated with drug resistance. *J Microbiol Methods.* 2005; 63: 318-30.

15- Mo L, Zhang W, wang J, et al. Three-dimentional model and molecular mechanism of *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidas (katG) and isoniazid-resistant *katG* mutants. *Microb Drug Resist.* 2004; 10: 269-79.

16- Lavender C, Globan M, Sievers A, Billmen-Jocobe H, Fyfe J. Molecular characterization of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates collected in Australia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49: 4068-74.

17- Yu S, Girotto S, Lee C, Magliozzo RS. Reduced affinity for isoniazid in the S315T mutant of *Mycobacterium tuberculosis katG* is a key factor in antibiotic resistance. *J biol Chem.* 2003; 278: 14769-75.

18- Canetti G, Fox W, khomenko A, et al. Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity, and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programmes. *Bull World Health Organ.* 1969, 41: 21-43.

19- Ozturk CE, Balbay OA, Kaya D, et al. The resistance to major antituberculosis drugs of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from the respiratory system specimens of tuberculosis patients in Duzce, Turkey. *Jap J Infect Dis.* 2005;58: 47-9.

20- Gori A, Esposti AD, Bandera A, et al. Comparison between spoligotyping and IS6110 restriction fragment length polymorphism in molecular genotyping analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Mol Cell Probes.* 2005; 19: 236-44.

21- Ahmad S, Mokaddas E. Contribution of AGC to ACC and other mutations at codon 315 of the *katG* gene in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from the Middle East. *Int J Antimicrob Agents.* 2004; 23: 473-9.

www.SID.ir

Archive of SID

22- Cockerill FR 3rd, Uhi JR, Temesgen Z, et al. Rapid identification of a point mutation of the *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase *(katG)* gene associated with isoniazid resistance. *J Infect Dis.* 1995; 171: 240-5.

23- Abal AT, Ahmad S, Mokaddas E. Variations in the occurance of S315T mutation with in *katG* gene in isoniazid-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolated from Kuwait. *Microb Drug Resist.* 2002; 8: 99-105.

24- Shemyakin IG, Stepanshina VN, Ivanov IY, et al. Characterization of drug-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* derived from Russian inmates. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2004; 8:1194-203.

25- Van soolingen D, de Hass PE, Van Doorn HR, et al. Mutations at amino acid position 315 of the *katG* gene are associated with high-level resistance to isoniazid, other drug resistance, and successful transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in the Netherlands. *J Infect Dis.* 2000; 182: 1788-90.

26- Marttila H, Soini H, Huovinen P, Viljanen M. *KatG* mutations in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates recovered from Finnish patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996; 40: 2187-9.

27- Haas WH, Schilke K, Brand J. et al. Molecular analysis of *katG* gene mutations in strains of *Mycobacterium tuberculosis* complex from Africa. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997; 41: 1601-3.

28- Doustar F, Khosravi AD, Farnia P, Masjedi MR, Velayati AA. Molecular analaysis of isoniazid resistance in different genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from Iran. *Microb Drug Resist.* 2008, 14: 273-9

29- Zakerbostanabad S, Titov LP, Bahremand AR. Frequency and molecular characterization of isoniazid resistance in *katG* region of MDR isolates from tuberculosis patients in southern endemic border of Iran. *Infect Genet Evol.* 2008, 8: 15-9.

30- Ahmad S, Fares E, Araj GF, Chaugh TD, Mustafa AS. Prevalence of S315T mutation within the *katG* gene in isoniazid-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Dubai and Beirut. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2002; 6: 920-6.

31- Leung ET, Kam KM, Chiu A, et al. Detection of katG Ser315Thr substitution in respiratory specimens from patients with isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* using PCR-RFLP. *J Medi Microbiol.* 2003; 52: 999-1003.

32- Bakonyte D, Baranauskaiet A, Cicenaite J, Sosnovskaja A, Stakenas P. Molecular characterization of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in Lithuania. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47: 2009-11.

www.SID.ir

Archive of SID

Detection of Mutation in Codon 315 katG Gene as a Gene Marker Associated with Isoniazid Resistance, in Mycobacterium tuberculosis Strains Isolated from Patients in Isfahan and Tehran by PCR-RFLP Method

Mohajeri P[1], Tavakoli A[2], Moghim S[2]

[1]Dept. of Microbiology, Faculty of Medicine, Kermanshah University of Medical Science, Kermanshah, Iran

[2]Dept. of Bacteriology, Faculty of Medicine, Isfahan University of Medical Science, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Mohajeri P. Dept. of Microbiology, Faculty of Medicine, Kermanshah University of Medical Science, Kermanshah, Iran

E-mail: p_mohajeri@yahoo.com

Received: 17 Nov 2008 **Accepted:** 30 May 2009

Background and Objective: Drug resistance to tuberculosis is continuously increasing and is a significant threat to tuberculosis control programs because afew effective drugs are present against *Mycobacterium tuberculosis*. Although isoniazid (INH) is the most effective drug against tuberculosis, resistance to this drug also develops readily. Mutations in *katG*, specially the Ser315Thr substitution, are responsible for isoniazid resistance in a large proportion of patients with tuberculosis. However, the frequency of the *katG* Ser315Thr substitution varies among population samples. This study provided molecular characterization of isoniazid resistance of *M. tuberculosis* strains and extended our knowledge about molecular basis of *M. tuberculosis* drug resistance that is widely applicable for rapid drug resistance detection.

Materials and Methods: Using 1% proportional method, the sensitivity of 126 strains isolated from patients in Isfahan and Tehran to isoniazid was determined. The *katG* mutations in codon 315 associated with isoniazid resistance among isoniazid resistant isolates was determined by PCR-RFLP. In this way, 355 bp PCR products were digested by *MspI*.

Results: Out of 126 isolates of *M. tuberculosis*, 32 (25.4%) strains were determined as INH resistant. Resistance rate was 22.6% (19 strains) in Isfahan and 31% (13 strains) in Tehran. Overall, 72% of isoniazid-resistant isolates could be identified by analysis of just *katG* 315 loci.

Conclusion: The PCR-RFLP using *MspI* restriction enzyme that detects *katG* Ser315Thr substitution could be identified in 72% of isoniazid-resistant strains. Elucidation of the molecular characterization of isoniazid resistance in *M. tuberculosis* has led to the development of different genotypic approaches to the rapid detection of isoniazid resistant in clinical isolates.

Key words: Mycobacterium Tuberculosis, Isoniazid, PCR-RFLP, KatG, Isfahan, Tehran

www.SID.ir