

بررسی جهش های ژنتیکی دخیل در مقاومت دارویی در سویه های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس جدا شده از مسلولین استان مازندران

• دکتر مهرداد مهدوی

دکترای حرفه ای دامپزشکی، گروه پژوهشی سینا مهر

• دکتر محمد رضا مهدوی

دانشجوی دکترای ژنتیک انسانی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، پژوهشکده هموگلوبینوپاتی، مرکز تحقیقات تالاسمی

Mahdavi899@gmail.com

• دکتر فرهنگ بابا محمودی

متخصص بیماری های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران
مرکز تحقیقات مقاومت های میکروبی

• بیتا طالبی

کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه پژوهشی سینا مهر

• پیام روشن

کارشناس ارشد ایمنی شناسی، گروه پژوهشی سینا مهر

• حسین جلالی

کارشناس ارشد ژنتیک، دانشگاه علوم پزشکی مازندران
پژوهشکده هموگلوبینوپاتی، مرکز تحقیقات تالاسمی

و حساس مربوط به داروهای خط اول و دوم که در درمان باکتری استفاده می شود با روش مولکولی LPA مورد بررسی قرار گرفتند.

نتیجه: از بین تمامی موارد بررسی شده، سه نمونه مقاوم به کینولون (۵/۵٪)، سه نمونه مقاوم به کانامایسین / آمیکاسین (۵/۵٪) و چهار نمونه مقاوم به استرپتومایسین (۷/۴٪) بودند. در دو نمونه جهش در کدون katG مشاهده شد که مربوط به مقاومت به ایزونیاژید می باشد (۳/۷٪) همچنین سه مورد مقاوم به ریغامپین دیده شد (۵/۵٪) و چهار مورد نیز نسبت به بیش از یک دارو مقاوم بودند (۷/۴٪).

بحث: از آنجایی که روش LPA سریع و آسان قابل اجرا می باشد که به طور همزمان قادر است وجود مقاومت به چندین دارو را در بیماران بررسی کند، استفاده از آن در تشخیص مقاومت دارویی و ارائه راهکار درمانی مناسب در کلیه مسلولین پیشنهاد می گردد.

کلمات کلیدی: سل، سل مقاوم به چند دارو، مقاومت دارویی، LPA.

زمینه و هدف: ظهور مقاومت دارویی مایکو باکتریوم توبرکلوزیس و به ویژه پیدایش سویه های مقاوم به چند دارو، مشکلاتی را برای درمان و کنترل شیوع سل در سرتاسر جهان به وجود آورده است. تشخیص سریع مقاومت دارویی در درمان و کنترل این بیماری از اهمیت بالایی برخوردار است. هدف از این پژوهش بررسی الگوی مقاومت دارویی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در استان مازندران در طول سال ۱۳۹۱ با روش سریع (Line Probe Assay (LPA) بوده است تا به کمک آن بتوان سویه های مقاوم موجود در این استان را شناسایی کرد.

مواد و روش ها: در این بررسی در ابتدا نمونه های خلط مبتلایان به سل رویی مراجعه کننده به مراکز بهداشتی درمانی استان مازندران جمع آوری گردید و با ۴٪ NaOH تیمار شدند و سپس بر روی محیط لوین اشتاین- جانسون کشت داده شدند، از میان نمونه هایی که کلونی های باکتری سل در آنان رشد کردند، به طور تصادفی ۵۴ مورد انتخاب گردیدند. تمامی این پنجاه و چهار نمونه از نظر وجود ژن های مقاوم

امروزه مساله مقاومت دارویی و به خصوص مقاومت به چند دارو چالشی جدی برای برنامه های کنترل بیماری سل محسوب می شود. استفاده بی رویه از داروهای ضد سل منجر به ظهور سویه های مقاوم به داروهای مورد نظر می شود. فاکتورهای ژنتیکی و ابتلا به HIV نیز از عوامل موثر در بروز این نوع از سویه های مقاوم می باشند.

کند رشد بودن مایکوباکتریوم توبرکولوزیس و زمان بر بودن و پر هزینه بودن تست های تعیین حساسیت دارویی باعث شده است که از روش کشت برای تشخیص و درمان همه مسلولین استفاده نشود و برای همه بیماران، بدون در نظر گرفتن سوابق بیماری و تعیین حساسیت دارویی سویه بیماریزا، داروهای یکسانی تجویز می شود. در این شرایط و با توجه به متفاوت بودن سویه های توبرکولوزیس در مناطق مختلف، بررسی و مشخص کردن این سویه ها در هر منطقه و استفاده از آن در تعیین استراتژی مناسب درمانی به منظور جلوگیری از ایجاد و گسترش سویه های مایکوباکتریوم توبرکولوزیس مقاوم به چند دارو مفید می باشد. این کار قبل از سال ۲۰۰۰ میلادی توسط WHO به همراه سازمان جهانی مبارزه با بیماری های ریوی، به عنوان یک پروژه جهانی شروع شده است (۵). هدف از این مطالعه نیز آن بود تا به بررسی وجود موتاسیون های مختلف در جمعیت مسلولین استان مازندران با استفاده از روش سریع LPA بپردازد.

مواد و روش ها

در این مطالعه ۵۴ نمونه از افراد شناخته شده ای که نمونه های کشت خلط آنان نشان دهنده وجود مایکوباکتریوم توبرکولوزیس بود مورد بررسی قرار گرفتند. دو کلنی با ابعاد ۰/۵ میلی متر از نمونه هایی که کشت آنان مثبت بود انتخاب شدند و به میکروتیوب های حاوی نیم میلی لیتر TE 1X منتقل شدند سپس میکروتیوب ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد انکوبه شدند تا همگی غیر فعال گردند. DNA ژنومی باکتری به روش سیتیدیم بروماید (CTAB) استخراج گردید. در این روش به هر یک از میکروتیوب ها ۷۰ میکرولیتر لیزوزیم با غلظت 10 mg/ml اضافه گردید و نمونه ها حداقل

بررسی های صورت گرفته بیانگر آن است که در حدود یک سوم از جمعیت جهان به عامل بیماری سل، مایکوباکتریوم توبرکولوزیس، آلوده هستند که در ۵ الی ۱۰٪ از افراد مبتلا بیماری سل بروز پیدا می کند (۱). سل بیماری ای است که از دوران باستان تاکنون با انسان همراه بوده است (۲) و علی رغم تمامی تلاش هایی که تاکنون برای از بین بردن این بیماری صورت گرفته است، این عارضه همچنان سالانه بیماران زیادی را به کام مرگ می فرستد. بنا به آمارهای موجود، در سال ۲۰۱۲، ۱/۱ میلیون نفر در سرتاسر جهان در اثر سل جان خود را از دست دادند که معادل ۳۰۰۰ نفر در روز است (۳). دلیل عدم کاهش مرگ و میر ناشی از بیماری شکل گیری مقاومت های متعدد دارویی در این باکتری می باشد که درمان آن را دشوار می نماید و سویه های مقاوم به عنوان سویه های غالب در اثر انتخاب طبیعی سریع در یک جمعیت شیوع می یابند.

مقاومت به بیش از یک دارو در یک سویه در اثر جهش های مکرر پدید می آید. هنگامی که باکتری سل دست کم نسبت به دو داروی اصلی ایزونیاژید و ریفامپین و یا پیرازینامید و اتامبوتول که از جمله داروهای خط اول درمان سل هستند مقاوم باشد سویه مورد نظر، مقاوم به چند دارو یا (MDR (multi drug resistant محسوب می شود. شیوع مایکوباکتریوم توبرکولوزیس مقاوم به چند دارو در کشورهای در حال توسعه و کشورهای جهان سوم بیشتر محسوس می باشد (۴)

سویه های مایکوباکتریوم توبرکولوزیس که تواما مقاوم به چند دارو می باشند برای اولین بار در سال ۱۹۹۰ در جهان گزارش شد و پس از آن سریعا به یک معضل جهانی تبدیل شد (۵). تنها در سال ۲۰۱۰ در حدود ۶۵۰/۰۰۰ مورد بیماری سل که در اثر مایکوباکتریوم توبرکولوزیس مقاوم به چند دارو بوجود آمده بودند در سرتاسر جهان مشاهده شد همچنین سویه هایی از مایکوباکتریوم توبرکولوزیس با مقاومت دارویی فراگیر یا XDR (extensively drug resistant) و مواردی از سویه های مایکوباکتریوم توبرکولوزیس مقاوم به کلیه داروها یا TDR (total drug resistant) در بیماران گزارش گردیدند (۵).



در دمای ۴۷ درجه سانتیگراد گرم شده بود، با دقت توسط پیپت روی ترکیب قبلی اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه به بن ماری شیکر دار ۴۷ درجه سانتیگراد منتقل شد. در مرحله بعد بافر Hybridization خارج و استریپ ها دو بار و هر بار به مدت ۱ دقیقه با محلول wash شستشو داده شدند و پس از آن ۱ میلی لیتر محلول wash در درون هر چاهک ریخته و در بن ماری ۴۷ درجه به همان ترتیب قبل به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شدند. در پایان این مرحله محلول wash با پیپت خارج شد و استریپ ها این بار ۲ سری، هر سری با ۱ میلی لیتر محلول رقیق شده rinse شستشو داده شدند. در مرحله بعد پس از خارج کردن محلول rinse، ۱ میلی لیتر محلول کنجوجه رقیق شده اضافه و نیم ساعت در دمای اتاق بر روی شیکر افقی انکوبه شدند. سپس ۳ مرتبه با ۱ میلی لیتر محلول rinse شستشو شدند و به چاهک ها ۱ میلی لیتر سوبسترا اضافه گردید و به مدت ۱۰-۱۲ دقیقه (بسته به شدت رنگ گرفتن نوار) در دمای اتاق و روی شیکر انکوبه شدند. این مرحله باید در تاریکی انجام شود. در نهایت سوبسترا از چاهک خارج و استریپ ها دو بار با ۱ میلی لیتر آب مقطر شسته شدند. نوارهای رنگی ایجاد شده بر روی استریپ ها با کمک دفترچه راهنمای درون کیت بررسی شدند. (۷)

نتایج

در این مطالعه ۵۴ نمونه از مبتلایان به سل (شامل ۳۳ مرد و ۲۱ زن) که کلونی های میکوباکتریوم توبرکلوزیس از نمونه های خلط آن ها در محیط کشت لوین اشستاین-جانسون رشد کرده بودند مورد مطالعه قرار گرفتند. تمامی این بیماران از استان مازندران جمع آوری گردیدند. ۱۱ مورد از نمونه های مورد بررسی دارای مقاومت به حداقل یک دارو بودند که شامل ۲ نفر زن و ۹ نفر مرد بوده اند. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که از مجموع جهش های مقاومت دارویی بررسی شده، مقاومت به استرپتومايسين دارای بیشترین فراوانی می باشد (۷/۴٪) و فراوانی مقاومت به کینولون، کانامایسین / آمیکایسین، ریفاپمپین و ایزونیاژید به ترتیب ۵/۵٪، ۵/۵٪ و ۳/۷٪ بوده است (جدول ۱).

۱ ساعت در بن ماری ۳۷ درجه سانتیگراد منتقل شدند. در مرحله بعد به تمامی نمونه ها ۷۵ میکرولیتر محلول SDS / Proteinase K ۱٪ اضافه گردید و در بن ماری ۶۵ درجه سانتیگراد انکوبه شدند در طی مدت انکوباسیون نمونه ها به طور مرتب شیک داده شدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر NaCl 5M و ۱۰۰ میکرولیتر محلول CTAB/NaCl، که قبلا در ۶۵ درجه سانتیگراد قرار داده شده بودند نیز به آن ها اضافه گردید و به مدت ۱۰ دقیقه در ۶۵ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. پس از آن ۷۵۰ میکرولیتر محلول کلوروفرم/ ایزوآمیل الکل با نسبت ۱:۲:۵ به هریک از نمونه ها اضافه شد و خوب مخلوط گردیدند. نمونه ها ۸ دقیقه و در دور ۱۱۰۰۰ g سانتریفیوژ شدند که در این مرحله سه فاز ایجاد شد که مایع رویی به تیوب جدید منتقل شده و ۴۵۰ میکرولیتر ایزوپروپانول سرد به آن اضافه گردید. این تیوب ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۰- قرار گرفتند و سپس در دور ۱۱۰۰۰ g و به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند و پس از خارج کردن مایع رویی، رسوب باقی مانده که DNA ژنومی می باشد دو بار با اتانل ۷۰٪ شستشو شد و به آن آب مقطر اضافه گردید. (۶)

به منظور شناسایی جهش های دخیل در مقاومت دارویی در ابتدا دو واکنش Multiplex PCR توسط کیت GenID (تولید کشور آلمان) انجام گرفت و با استفاده از الکتروفورز محصول واکنش روی ژل ۳٪ از صحت عملکرد محصولات PCR اطمینان حاصل شد، در نهایت محصولات PCR در مجاورت نوارهایی که الیگونوکلو تیدهای مکمل نواحی سالم و جهش یافته که به صورت تک رشته به آن ها متصل بودند قرار گرفتند. پس از انجام مراحل هیبریدیزاسیون، شستشو و رنگ آمیزی، الگوهای ایجاد شده در هر استریپ برای تک تک نمونه ها بررسی گردیدند. مراحل کار بدین صورت است که ۴۰ میکرو لیتر از محلول denaturing (باز کننده دو رشته DNA) در گوشه چاهک ریخته و سپس ۲۰ میکرو لیتر از هر یک از محصولات PCR مربوط به نمونه مورد نظر نیز به آن افزوده و توسط پیپت خوب بهم زده می شود و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. سپس ۱ میلی لیتر محلول hybridization buffer که



جدول ۱: فراوانی جهش های ایجاد کننده مقاومت

دارویی در بیماران مبتلا به سل در استان مازندران

بحث

یکی از علل ظهور و گسترش سویه های مایکو باکتریوم

توبرکلوزیس مقاوم به

چند دارو مصرف بی

رویه داروهای ضد سل

بوده است. تشخیص

زود هنگام بیماری سل و

تشخیص مقاومت های

دارویی در بیماران مبتلا

بسیار حیاتی می باشد.

بنابراین استفاده از روشی

که بتواند در مدت زمان کوتاهی نوع مقاومت های دارویی را مشخص کند از اهمیت بالایی برخوردار است. در مطالعه حاضر به منظور بررسی مقاومت های دارویی در بیماران مبتلا به سل از روش LPA استفاده شد که روشی به نسبت سریع می باشد و قادر است همزمان وجود مقاومت به چندین دارو را در یک فرد بررسی کند تا بر اساس آن بتوان راهکار درمانی مناسب تری برای درمان فرد مبتلا پیشنهاد داد.

وقوع جهش در ژن های باکتری سبب بروز مقاومت به داروهای مختلف می شود. جهش های شایعی که منجر به بروز مقاومت به دارو در میکروب سل می شوند در مطالعات مختلف شناسایی شدند. جهش هایی که در ژن های *inhA* و *katG* رخ می دهند منجر به ایجاد مقاومت به ایزونیازید می شوند. جهش در ژن *rpoB* در بروز مقاومت به ریفامپین دخیل است و جهش در ژن های *rpsL*، *gydB* و *rrs* منجر به مقاومت به استرپتومايسين می شوند. مقاومت به آمیکاسین/کانامایسین بر اثر موتاسیون در ژن های *rrs* و *eis*.

مقاومت به کاپرومایسین بر اثر جهش در *rrs* و *tyla* و مقاومت به پیرازینامید در اثر تغییر در ژن *pncA* بوجود می آیند. همچنین تغییر در ژن *gyrA* علت بروز مقاومت به کینولون می باشد (۸). حساسیت و اختصاصیت جایگاه های وقوع جهش مربوط به هر دارو در مطالعات مختلفی به

داروهای مورد بررسی	ایزونیازید		ریفامپین		استرپتومايسين			آمیکاسین/کانامایسین		کینولون
	<i>inhA-16-8-15</i>	<i>katG 315</i>	<i>rpoB 516</i>	<i>rpoB 531</i>	<i>rpoB 526</i>	<i>rpsL 43</i>	<i>rpsL 88</i>	<i>rrs 1483</i>	<i>rrs 1400-1401</i>	<i>gyrA 90-94</i>
جهش ژنی مورد بررسی										
جهش های مشاهده شده در مردان	۰	۲	۳	۰	۰	۲	۱	۳	۳	۲
جهش های مشاهده شده در زنان	۰	۰	۰	۰	۰	۲	۱	۰	۰	۱
مجموع جهش های مشاهده شده	۰	۲	۳	۰	۰	۴	۲	۳	۳	۳
مجموع افراد مقاوم مشاهده شده (۵۴)	۲			۳		۴			۳	

۳/۲۰٪ از نمونه ها حداقل به یکی از داروهای بررسی شده مقاوم بوده و در ۴/۷٪ از نمونه ها نیز بیش از یک جهش مشاهده شد (جدول ۲).

تمامی نمونه هایی که مقاوم به ایزونیازید بوده اند دارای جهش در ژن *katG* بوده اند و نمونه ای که مقاوم به ایزونیازید باشد و در ژن *inhA* دارای جهش باشد در این مطالعه یافت نشد. در نمونه های مقاوم به ریفامپین نیز جهش تنها در جایگاه ۵۱۶ ژن *rpoB* شناسایی شد در حالی که در مقاومت به آمیکاسین/کانامایسین، نیمی از نمونه ها در جایگاه ۱۴۰۱-۱۴۰۰ و نیمی دیگر در جایگاه ۱۴۸۳ از ژن *rrs* دارای جهش بوده اند. در تمامی نمونه های مقاوم به استرپتومايسين کلیه جهش ها در ژن *rpsL* مشاهده گردیدند و سویه های مقاوم به استرپتومايسين فاقد جهش در ژن *rrs* بوده اند.

جدول ۲: فراوانی افراد دارای مقاومت به یک یا بیش از یک آنتی بیوتیک

نوع مقاومت دارویی	ژن جهش یافته	نمونه های واجد جهش	مجموع
مقاومت تک دارویی	ریفامپین (<i>rpoB 516</i>)	۲	۷ (۱۲/۹٪)
	کانامایسین	۲	
	استرپتومايسين (<i>rpsL</i>)	۱	
مقاومت به دو دارو	ایزونیازید (<i>katG</i>)	۲	۴ (۷/۴٪)
	استرپتومايسين + کینولون	۳	
مقاومت چند دارویی (MDR)	حداقل به ایزونیازید و ریفامپین	۰	۰



مورد استفاده در درمان سل هستند صورت پذیرفته است. در استان گلستان جاوید و همکاران با استفاده از روش PCR به تکثیر ژن های *inhA* و *katG* جهت شناسایی مقاومت به ایزونیازید و *rpoB* جهت شناسایی مقاومت به ریفامپین پرداختند (۱۵) که نتایج حاصل از آن پژوهش نشان داد که از ۷۵ نمونه بررسی شده ۵/۷٪ در ژن *katG* و ۳/۴٪ در ژن *inhA* دارای جهش بوده اند که دو مورد از آن ها تواما ناقل هر دو جهش بوده اند. مقاومت به ایزونیازید در ۶/۹٪ از نمونه ها وجود داشت و ۴/۶٪ از موارد نیز در ژن *rpoB* جهش وجود داشته است.

پورحاجی باقر و همکاران در سال ۱۳۹۰ در استان مازندران با استفاده از تکنیک PCR تعداد ۱۳۴۵ بیمار را از نظر وجود جهش هایی که منجر به ایجاد مقاومت به ایزونیازید و ریفامپین می شوند مورد بررسی قرار دادند که بیشترین مقاومت نسبت به ایزونیازید و فراوان ترین جهش در ژن *katG* بوده است (۱۶). با این وجود مطالعات ذکر شده به بررسی سایر جهش های ایجاد کننده مقاوت دارویی در باکتری سل نپرداخته اند. مطالعه حاضر نه تنها به بررسی مولکولی مقاومت دارویی به ایزونیازید و ریفامپین می پردازد بلکه وجود سایر مقاومت های دارویی را به همراه فراوانی انواع جهش ها مورد مطالعه قرار می دهد و در نتیجه شناخت جامع تری از وجود مقاومت در ژن های مختلف حاصل می شود.

در مطالعه حاضر، هیچ یک از بیماران مورد مطالعه دارای مقاومت به چند دارو نبوده اند که نشان دهنده این است که مایکوباکتریوم تویرکلوزیس مقاوم به چند دارو هنوز به عنوان مشکل جدی در استان مازندران بروز پیدا نکرده است. در استان گلستان و شهرستان تبریز نیز در آخرین بررسی های انجام شده نتایج مشابهی به دست آمد (۱۵). در مطالعه ما ۳/۷٪ از نمونه ها دارای جهش در ژن های مسئول مقاومت به ایزونیازید بوده اند و همگی در ژن *katG* دارای نقص بوده اند و موردی که دارای موتاسیون در ژن *inhA* باشد یافت نشد که این یافته با همه تحقیقات انجام شده مبنی بر این که درصد بیشتری از جهش هایی که منجر به مقاومت نسبت به ایزونیازید می گردند مربوط به *katG* می باشد مطابقت دارد. در مطالعه حاضر همه موارد مقاوم به ریفامپین

عنوان جایگاه های شایع، مورد تایید قرار گرفته است و حاصل این مطالعات نتایج تقریبا مشابهی بوده است. در مطالعاتی که به طور جداگانه در کره و برزیل صورت پذیرفت جهش های *katG-315.inhA-15*، *rps-143.rrs-1401*، *rpoB-531* به عنوان جهش های معمول شناسایی شدند (۹ و ۱۰). نتایجی که Isakova و همکاران در سال ۲۰۰۵ به دست آوردند نشان داد که جهش در جایگاه های ۵۳۱ و ۵۱۶ و ۵۳۶ در ژن *rpoB*، جهش های شایعی هستند و جهش جایگاه ۵۳۱ از شیوع بالاتری برخوردار است (۱۱). در مطالعه دیگری که در کره جنوبی و در سال ۲۰۱۳ صورت پذیرفت علاوه بر جایگاه های ذکر شده، جایگاه های *pncA-159* و *gyrA-94.embB-306* نیز به عنوان جایگاه های مستعد برای وقوع جهش و در نتیجه ظهور مقاومت دارویی معرفی شدند (۸). در ونزوئلا نتایج به دست آمده در مورد مقاومت به ایزونیازید حاکی از آن بود که جهش در ژن *katG* دارای حساسیت ۸۸/۲٪ و اختصاصیت آن ۱۰۰٪ می باشد (۱۲). در اهواز نیز جهش های موجود در ژن های *inhA* و *rpoB* و *katG* در بیماران مبتلا به سل شناسایی شدند. در زنجان مقاومت به داروی ایزونیازید در مسلولین مورد بررسی قرار گرفتند که در هر دو مطالعه نتایج یکسان حاصل آمد و جهش در جایگاه های *rpoB-531*، *inhA-15*، *katG-315*، دارای بالاترین فراوانی بودند و حساسیت این جایگاه ها نیز تایید شدند (۱۳). در تهران نیز در مطالعه ای جداگانه جهش های *gyrA* و *rrs* بررسی شدند (۱۴). در سال ۱۳۸۶ دوستدار و همکاران وجود جهش در ژن *rpoB* را بررسی کردند و نشان دادند بررسی مولکولی جایگاه های ۵۳۱ و ۵۱۶ و ۵۲۶ در تشخیص مقاومت به ریفامپین ارزشمند است و بروز تغییر در این جایگاه ها در ایران به نسبت شایع می باشد و در جایگاه های دیگر جهش به ندرت شناسایی می شود. نتایج این تحقیق همچنین نشان می دهد که جهش در جایگاه های *rpoB-516* و *rpoB-526* با فراوانی متفاوت نسبت به دیگر نقاط جهان وجود دارد (۶). در مطالعه ما روشی انتخاب شد که جایگاه های جهش های شایع ذکر شده قابل شناسایی باشند.

مطالعات مختلفی در ایران جهت شناسایی انواع جهش های موجود در ژن هایی که دخیل در مقاومت به داروهای مختلف



در جایگاه ۵۱۶ ژن rpo-B نقص داشتند و در جایگاه های 531 - rpoB و 526 - rpoB تغییری مشاهده نشد در حالی که ذاکر بستان آبادی و همکاران نشان دادند که بر خلاف مطالعه حاضر جهش در جایگاه ۵۲۶ در ژن rpoB دارای بیشترین فراوانی بوده و مانند بررسی حاضر تغییری در جایگاه 531 - rpoB در نمونه های ایرانی شناسایی نکردند (۱۷). مطالعات مختلف نشان داده اند که جهش در جایگاه 526 - rpoB در معدودی از کشورها دیده شده است (۱۸ و ۱۹). در این پژوهش مقاومت به ریفامپین بیشتر از مقاومت به ایزونیازید مشاهده که نتایج مطالعه خلیل زاده و همکاران که در سال های ۱۹۹۹ تا ۲۰۰۴ میلادی انجام شد را تایید می کند (۲۰).

مطالعه ما نشان داد که مقاومت به استرپتومایسین بیش از سایر داروها شایع است. در بررسی ای که توسط صادقیان و نادری نسب و همکاران در مشهد صورت پذیرفت نیز استرپتومایسین دارای بیشترین مقاومت بوده است و مقاومت نسبت به دیگر داروهای مورد بررسی در سطح پایینی قرار داشت (۲۱).

در این مطالعه مقاومت به داروهایی که به عنوان داروهای خط دوم درمان سل مورد استفاده قرار می گیرند در مواردی مشاهده شده است که نگران کننده است زیرا این پدیده یک ریسک فاکتور برای درمان مبتلایان به مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به چند دارو محسوب می شود و در صورت شیوع باکتری های مقاوم به چند دارو استفاده از سایر دارو ها برای درمان بیماری دشوار خواهد بود. به

دلیل آن که در صورت مقاوم بودن به داروهای رده اول، از داروهای خط دوم برای درمان استفاده می شود و مقاوم بودن به این داروها، منجر به عدم موفقیت در درمان این بیماران می شود و در نتیجه سویه های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به چند دارو گسترش بیشتری پیدا خواهد کرد.

در مطالعه حاضر ۳۲/۷٪ (۱۸ نمونه) از نمونه های خلط افراد مبتلا اسامیر منفی بوده اند در حالی که در تمامی این افراد باکتری توبرکلوزیس پس از کشت روی محیط لوین اشتاین رشد کردند که این امر بر لزوم استفاده از روش های ملکولی (به ویژه LPA) جهت تشخیص بیماری سل تاکید می کند، زیرا پس از منفی شدن اسامیر و تا زمان مشخص شدن جواب کشت مدت زمان زیادی طول می کشد و در درمان فرد مبتلا وقفه ایجاد می شود.

روش های مبتنی بر PCR روش هایی سریع برای تشخیص جهش هایی که منجر به ایجاد مقاومت دارویی می شوند، می باشند ولی از آن جایی که جهش های متعددی در ژن های مختلف ممکن است رخ داده باشد شناسایی تمام آن ها مستلزم انجام واکنش های PCR متعدد می باشد. روش LPA که در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت با استفاده از انجام دو واکنش PCR و به تبع آن آشکار سازی بر روی نوارهای مربوطه قادر است به طور همزمان وجود یازده جهش مختلف را که باعث بروز مقاومت به ۵ نوع داروی متفاوت می شوند بررسی کند. این روش در مقایسه با شیوه های متداول فعلی، روشی سریع تر در بررسی مقاومت های دارویی می باشد و انجام این تست برای کلیه افراد مسلول توصیه می شود



References

- 1- Conaty SJ, Hayward AC, Story A, Glynn JR, Drobniowski FA, Watson JM. Explaining risk factors for drug-resistant tuberculosis in England and Wales: contribution of primary and secondary drug resistance. *Epidemiol Infect.* 2004 Dec;132(6):1099-108.
- 2- Donoghue HD, Lee OY, Minnikin DE, Besra GS, Taylor JH, Spigelman M. Tuberculosis in Dr Granville's mummy: a molecular re-examination of the earliest known Egyptian mummy to be scientifically examined and given a medical diagnosis. *Proc Biol Sci.* 2010 Jan 7;277(1678):51-6. doi: 10.1098/rspb.2009.1484. Epub 2009 Sep 30.
- 3- Jayachandran R, Scherr N, Pieters J. Elimination of intracellularly residing *Mycobacterium tuberculosis* through targeting of host and bacterial signaling mechanisms. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2012 Sep;10(9):1007-22. doi: 10.1586/eri.12.95.
- 4- Ahmad S, Mokaddas E. Recent advances in the diagnosis and treatment of multidrug-resistant tuberculosis. *Respir Med.* 2009 Dec;103(12):1777-90. doi: 10.1016/j.rmed.2009.07.010. Epub 2009 Aug 5.
- 5- Chiang CY, Centis R, Migliori GB. Drug-resistant tuberculosis: Past, present, future. *Respirology.* 2010 Apr;15(3):413-32. doi: 10.1111/j.1440-1843.2010.01738.x. Epub 2010 Mar 19.
- 6- Doostdar F, Khosravi A, Farnia P, Bahremand A R. Detection of *rpoB* gene mutations in *Mycobacterium Tuberculosis* isolates from Iranian patients. *Iranian journal of medical microbiology.* 2007 Spring ;1(1): 17-22.
- 7- <http://aid-diagnostika.com/english/kits/GenID/infection.htm>
- 8- Almeida Da Silva PE, Palomino JC. Molecular basis and mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: classical and new drugs. *J Antimicrob Chemother.* 2011 Jul;66(7):1417-30. doi: 10.1093/jac/dkr173. Epub 2011 May 9.
- 9- Inawali HN, Hwang SC, Park YK, Kim H, Lee YS, Chung GT, Choe KH, Ryoo S. Characterization of mutations in multi- and extensive drug resistance among strains of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in Republic of Korea. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013 Jun;76(2):187-96.
- 10- Spies FS, von Groll A, Ribeiro AW, Ramos DF, Ribeiro MO, Dalla Costa ER, Martin A, Palomino JC, Rossetti ML, Zaha A, da Silva PE. Biological cost in *Mycobacterium tuberculosis* with mutations in the *rpsL*, *rrs*, *rpoB*, and *katG* genes. *Tuberculosis (Edinb).* 2013 Mar;93(2):150-4. doi: 10.1016/j.tube.2012.11.004. Epub 2012 Dec 29.
- 11- Isakova ZhT, Pak OA, Iusupova Elu, Myrzaliev BB, Chubakov Tch, Goncharova ZA, Tumashova AF, Kozhomkulov MD, Kozhomkulov DK, Alisherov Ash, Friedland J, Aldashev AA. Use of biological microchips in the determination of drug-resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to rifampicin. *Probl Tuberk Bolezn Legk.* 2005;(8):50-3.
- 12- Romay Z, Arráiz N, Fuenmayor A, Ramírez C, Rojas L, Paris R. Detection of S315T mutation in the *katG* gene as a strategy for identification of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in a reference laboratory. *Rev Chilena Infectol.* 2012 Dec;29(6):607-13.
- 13- Khosravi AD, Goodarzi H, Alavi SM. Detection of genomic mutations in *katG*, *inhA* and *rpoB* genes of *Mycobacterium tuberculosis* isolates using polymerase chain reaction and multiplex allele-specific polymerase chain reaction. *Braz J Infect Dis.* 2012 Jan-Feb;16(1):57-62.
- 14- Tahmasebi P, Farnia P, Sheikholeslami F, Velayati A. Rapid identification of extensively and extremely drug resistant tuberculosis from multidrug resistant strains; using PCR-RFLP and PCR-SSCP. *Iran J Microbiol.* 2012 Dec;4(4):165-70.
- 15- Javid S, Ghaemi A, Amirmozaffari N, Rafiee S, Moradi A, Dadgar T. Detection of Isoniazid and Rifampin Resistant Strain of *Mycobacterium Tuberculosis* Isolated from patients in Golestan province (North of Iran). *mjgoums.* 2009; 3 (1) :0-0
- 16- Pourhajbagher M, Nasrollahi M, Musavi S.R, Rahimi-Esboei B, Ghorbani Pashakolaei A. Drug Resistance in *Mycobacterium Tuberculosis* Isolates to Isoniazid and Rifampin. *J Babol Univ Med Sci.* 2012 May 14(3)
- 17- Bostanabad SZ, Shekarabei M, Nojumi SA, Jabbarzadeh E, Ghalami M, Kazemi VM, Beigdeli MG, Karim Rahimi M, Bossak M, Sagalchik ER, Konstantina Surkova L, Mikhaelovna Zalutskaya A, Slizen V, Petrovich Titov L. Study of Genetic Evolution in *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Patients with Active Pulmonary Tuberculosis in the Iran and Belarus. *Open Microbiol J.* 2011;5:32-42. doi: 10.2174/1874285801105010032. Epub 2011 Jul 4.
- 18- Pozzi G, Meloni M, Iona E, Orrù G, Thoresen OF, Ricci ML, Oggioni MR, Fattorini L, Orefici G. *rpoB* Mutations in Multidrug-Resistant Strains of *Mycobacterium tuberculosis* Isolated in Italy. *J Clin Microbiol.* 1999 Apr;37(4):1197-9.
- 19- Qian L, Abe C, Lin TP, Yu MC, Cho SN, Wang S, Douglas JT. *rpoB* Genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing Family Isolates from East Asian Countries. *J Clin Microbiol.* 2002 Mar;40(3):1091-4.
- 20- Khalilzadeh S, Boloorsaz MR, Safavi A, Farnia P, Velayati AA. Primary and acquired drug resistance in childhood tuberculosis. *East Mediterr Health J.* 2006 Nov;12(6):909-14.
- 21- Namaei MH, Sadeghian A, Naderinasab M, Ziaee M. Prevalence of primary drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Mashhad, Iran. *Indian J Med Res.* 2006 Jul;124(1):77-80.

