مقاله تحقیقی

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره چهاردهم، شمارهٔ ۳، اردیبهشت۱۳۹۱، صفحه ۷۲-۶۶

مقاومت مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به داروهای ایزونیازید و ریفامپین

مریم پورحاجی باقر(MSc) [۱]، محترم نصرالهی(PhD) *[۱]، سیدرضا موسوی(BSc) [۲]، بهمن رحیمی اسبوئی(MSc) [۳]،
ابوذر قربانی پاشاکلائی(MSc) [۴]

۱- گروه میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران
۲- مرکز بهداشت استان مازندران
۳- گروه انگل شناسی دانشگاه علوم پزشکی مازندران
۴- گروه ایمونولوژی دانشگاه علوم پزشکی مازندران

دریافت: ۹۰/۵/۲۵، اصلاح: ۹۰/۶/۱۶، پذیرش: ۹۰/۸/۱۸

خلاصه

سابقه و هدف: بیماری سل خطرناکترین بیماری عفونی حال حاضر جهان است. ایزونیازید و ریفامپین از داروهای مهم خط اول درمان سل می باشند. مقاومت به این داروها در بسیاری از نقاط جهان رو به افزایش است. این مطالعه به منظور تعیین میزان مقاومت و حساسیت دارویی ایزونیازید و ریفامپین در بیماران مسلول مراجعه کننده به بخش سل مرکز بهداشت استان مازندران انجام شد.

مواد و روشها: این مطالعه مقطعی بر روی ۱۳۴۵ نفر مراجعه کننده به مرکز سل استان مازندران طی یکسال انجام شد. نمونه های تهیه شده از این افراد بر روی محیط لوین اشتاین جانسون کشت داده شدند. استخراج DNA از کلنی و تعیین مقاومت به ایزونیازید و ریفامپین با روش PCR به ترتیب با استفاده از پرایمر ژن های MUTB-gyrB، inhA، KatG و rpoB انجام شد.

یافته ها: از ۱۳۴۵ نمونه، ۶۵ نمونه کشت مثبت به دست آمد. با استفاده از پرایمر ژن MUTB-gyrB مشخص گردید که از این ۶۵ نمونه، ۵۹ نمونه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می باشند. مقاومت به ایزونیازید توسط پرایمر ژن inhA در ۳ مورد (۵/۰۸٪) و حساسیت به آن در ۵۶ مورد (۹۴/۹۲٪)، توسط پرایمر ژن KatG مقاومت در ۴ مورد (۶/۷۷٪) و حساسیت به آن در ۵۵ مورد (۹۳/۲۳٪) مشاهده شد. مقاومت با ریفامپین توسط پرایمر ژن rpoB در ۱ مورد (۱/۷٪) و حساسیت به آن نیز در ۵۸ مورد (۹۸/۳٪) رؤیت شد.

نتیجه گیری: نتایج مطالعه نشان داد که بیشترین مقاومت نسبت به داروی ایزونیازید وجود دارد و PCR روش مناسبی جهت شناسایی سویه های حساس و مقاوم به ایزونیازید و ریفامپین می باشد.

واژه های کلیدی: ایزونیازید، ریفامپین، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، مقاومت دارویی.

مقدمه

سل ریوی یکی از دلایل عمده مرگ و میر ناشی از عفونتهای باکتریال بوده و ۹۵٪ موارد آن در کشورهای در حال توسعه در آسیا، آفریقا، خاورمیانه و آمریکای لاتین که وسایل و امکانات محدودی برای تشخیص و درمان در اختیار دارند، رخ می دهد (۲و۱). سل مقاوم به دارو، عامل مرگ و میر و افزایش دوره سرایت بیماری می باشد (۳). طبق توصیه سازمان بهداشت جهانی قبل از تجویز آنتی بیوتیک باید حساسیت باکتری به انواع داروها مشخص گردد. با گسترش پاندمی ایدز در جهان و ظهور و گسترش سویه های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به دارو به ویژه سویه های (Multi Drug Resistance, MDR)، با مقاومت همزمان میکروب سل نسبت به حداقل دو داروی ایزونیازید و ریفامپین، اثر درمان های دارویی برای توبرکلوزیس (Tuberculosis, TB) به شدت سرکوب شده است (۴). در سال های اخیر تعداد افراد مبتلا به سل مقاوم به چند دارو، بالا رفته و دامنه ای بین ۷۷-۱۵ درصد را شامل می شود (۵). در ایران شیوع مقاومت دست کم در یک دارو (ایزونیازید) ۵ درصد و شیوع MDR-TB با موارد قبلاً درمان شده ۴۸/۲٪ می باشد (۶). در مطالعه ای که در ایران انجام شد

▣ این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی به شماره ۲۹/۹۰ کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران می باشد.
* مسئول مقاله:
آدرس: ساری، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، گروه میکروبیولوژی، تلفن: ۰۱۵۱-۳۵۴۳۰۸۱
e-mail:mnasrolahei@yahoo.ca

[DOR: 20.1001.1.15614107.1391.14.3.10.0]

میزان مقاومت چند دارویی در بیماران جدید ۲/۶٪ در مقابل ۵۶٪ بیماران قبلاً درمان شده، اعلام گردید (۷). انجام آزمایشات مرسوم تعیین حساسیت در مورد مایکوباکتریوم توبرکلوزیس علاوه بر مشکلات موجود در مسیر خالص سازی کلنی و غلظت های مختلف دارو، نیاز به حداقل ۴-۳ هفته زمان دارد. لذا بهتر است روش های مطمئن مولکولی جانشین روش های مرسوم گردد. برخی از این روشها سریع، ارزان و در عین حال دقیق هستند (۶).

یکی از داروهای مؤثر سل ایزونیازید می باشد. ایزونیازید یک پیش دارو است و فعالیت آنتی بیوتیکی آن به فعال سازی باکتریایی به وسیله آنزیم کاتالاز-پراکسیداز (KatG) بستگی دارد که موجب ایجاد رادیکال های فعالی می شود که نواحی بسیاری را در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مورد هدف قرار می دهند (۸).

مطالعات اخیر نشان داده که احتمالاً به علت اهمیت جزء پراکسیداز برای قابلیت زیست سلول حذف کامل ژن نادرست است (۹). به این دلیل بیشترین مقاومتی که از طریق تغییر در KatG ایجاد می شود، انتخاب جهش های خاصی است که باعث کاهش فعالیت کاتالاز در سطحی است که ارگانیسم های مقاوم به ایزونیازید قادر به زیست باشد. طبق مطالعات گذشته، جانشینی در کدون

315 AGC⟶ACG (Ser⟶Thr) بیشترین میزان جهش را شامل می شود. این جهش های ایجاد شده توازن بهینه بین کاهش فعالیت کاتالاز و بالاترین سطح مورد نیاز از فعالیت پراکسداز KstG را فراهم می کند (۱۰). جهش های مرتبط با مقاومت به ایزونیازید نسبت به سایر عوامل ضد سلی، مانند ریفامپین بسیار پیچیده تر است و ژن های متعددی از قبیل KasA، inhA در این میان دخیل هستند (۱۱). inhA (انول- Acp ردوکتاز) که یک پروتئین دخیل در مایکولیک اسید می باشد و در بیوسنتز دیواره سلولی دخیل است، هدف دیگری برای ایزونیازید می باشد و جهش های مرتبط با مقاومت فنوتیپی ایزونیازید در دو لوکوس inhA در مطالعات پیشین توصیف شده است. بنابراین بیشترین موتاسیون هایی که مرتبط با مقاومت به ایزونیازید می باشند، KatG و inhA هستند. ریفامپین از دیگر داروهایی است که برای درمان سل به کار می رود و مقاومت به آن تقریباً همیشه در نتیجه جهش های نقطه ای در ژن rpoB (ژن کدکننده زیر واحد RNA،β پلی مراز) ایجاد می شود (۱۲). روش PCR به دلیل سهولت و سرعت بالا یک روش با اهمیت در شناسایی مایکوباکتریوم های مقاوم به دارو است به طوری که محل قرار گیری باندها و وزن مولکولی آن ها می تواند گویای نوع جهش روی داده، در ژن مورد نظر باشد (۱۳).

این مطالعه به منظور بررسی و ارزیابی مقاومت دو داروی ایزونیازید و ریفامپین در بیماران مراجعه کننده به مرکز سل استان مازندران و ارائه روشی مناسب و سریع جهت شناسایی سویه های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به این دو دارو انجام شد تا بتوان با استفاده از داروهای اختصاصی تر و با اثر مطمئن تر از یک سو امکان درمان کم خطرتر و قابل تحمل تر را برای بیمار فراهم ساخت و از سوی دیگر امکان ایجاد مقاومت دارویی را به حداقل رساند.

مواد و روشها

این مطالعه مقطعی، بر روی ۱۳۴۵ بیمار که پس از ویزیت توسط پزشک متخصص عفونی مشکوک به سل تلقی شده و به مرکز بهداشت استان مازندران در طی تیر ۱۳۸۹ لغایت خرداد ۱۳۹۰ مراجعه کرده بودند، انجام شد. نمونه های افراد مشکوک به بیماری سل در صورت مثبت شدن اسمیر، با داشتن حداقل یکی از شرایط سرفه بیش از ۳ هفته، خلط فراوان، وجود خون در خلط، درد طولانی قفسه سینه، کم اشتهایی، کاهش وزن، تب و لرز طولانی مدت وارد مطالعه شدند. در صورت منفی شدن اسمیر نمونه ها پس از رنگ آمیزی و مصرف داروی ضد سل بیش از یکماه از مطالعه خارج شدند.

تهیه اسمیر و کشت: ابتدا نمونه های جمع آوری شده شامل ۱۲۲۲مورد خلط (۹۰/۸٪)، ۱۵مورد مایع پلور (۱/۱۱٪)، ۸ مورد مایع آسیت (۰/۶٪)، ۲ مورد خون (۰/۱۴٪)، ۶۳ مورد مایع برونش (۴/۶۸٪)، ۱مورد زخم (۰/۰۷٪)، ۱۴ مورد شیره معده (۱/۰۴٪)، ۱۲مورد ادرار (۰/۹٪)، ۱ مورد مایع کیست کبدی (۰/۰۷٪)، ۱ مورد آبسه (۰/۰۷٪)، ۱ مورد مایع مفصل (۰/۰۷٪)، ۱ مورد ترشحات گردن (۰/۰۷٪)، ۱ مورد بیوپسی پا (۰/۰۷٪) و ۳ مورد بافت (۰/۲۲٪)، با استفاده از سودو N- استیل-L- سیستئین هموژنیزه و دکانتامینه گردید و سپس به کمک رنگ آمیزی ذیل نلسون از نظر وجود باسیل های اسیدفست مورد بررسی قرار گرفت. برای کشت نمونه های اسمیر مثبت، از محیط لوین اشتاین جانسون (Lowenstein-Jensen) خریداری شده از شرکت بهارافشان ایران استفاده شد. جداسازی اولیه و کشت مایکوباکتریوم ها از نمونه ها طبق پروتکل استاندارد انجام شد (۱۲).

استخراج *DNA*: مقدار ۱۰۰ µl از آب مقطر استریل و یا TE (Tris-EDTA, PH=7.0) را در میکروتیوب ۱/۵ سی سی ریخته و یک کلنی از محیط کشت لوین اشتاین جانسون را وارد این میکروتیوب کرده و سوسپانسیونی تهیه گردید. سپس مقدار ۴۰۰ µl از محلول DNG Plus را به آن اضافه نموده و میکروتیوب را به مدت ۲۰-۱۵ ثانیه ورتکس کرده و سپس به آن مقدار ۳۰۰ µl ایزوپروپانل اضافه شد. بعد از ۱۵-۱۰ ثانیه ورتکس، میکروتیوب به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ و بعد از گذشت این زمان، محلول رویی را خارج کرده و این بار مقدار ۱ سی سی از اتانل ۷۵٪ را وارد میکروتیوب کرده و بعد از ورتکس کردن با دور ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه میکروتیوب سانتریفیوژ گردید. با اتمام سانتریفیوژ محلول رویی را بیرون ریخته و مجدداً مقدار ۱ سی سی از اتانل ۷۵٪ را وارد میکروتیوب کرده و باز هم با دور ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه میکروتیوب را سانتریفیوژ نمودیم. بعد از سانتریفیوژ، محلول رویی را بیرون ریخته و میکروتیوب در ترموبلاک ۶۵ درجه سانتیگراد قرار گرفت تا داخل میکروتیوب کاملاً خشک گردد. مقدار ۵۰ µl از آب مقطر استریل را به میکروتیوب افزوده و به مدت ۵ دقیقه در ترموبلاک با درجه حرارت ۶۵ درجه سانتیگراد قرار داده شد. بعد از به پایان رسیدن این زمان، میکروتیوب را ورتکس کرده و به کمک سمپلر محتوای میکروتیوب ها را پر و خالی کردیم و دیواره آن شستشو داده شد. در این مرحله، میکروتیوب حاوی ۵۰ µl از DNA باکتری بود.

***PCR* جهت شناسایی کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس:** برای انجام PCR، از Master mix آماده تهیه شده از شرکت فرمنتاز کانادا (توالی پرایمر براساس ژن gyr B) استفاده گردید (۱۴). برای آماده سازی ترکیب PCR mix به حجم ۲۵ µl برای هر واکنش از ۱۲/۵ µl از Master mix آماده، ۱/۳ µl از هر پرایمر، ۲ µl از DNA ژنومی هر سویه جدا شده و ۷/۹ µl آب مقطر استریل دیونیزه استفاده شد. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر به صورت ۵ دقیقه در حرارت 95^{oC} سپس ۳۰ سیکل حرارتی شامل 94^{oC} یک دقیقه، 65^{oC} یک دقیقه، 72^{oC} یک دقیقه و در نهایت یک سیکل حرارتی 72^{oC} به

[DOR: 20.1001.1.15614107.1391.14.3.10.0]

مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. بعد از انجام واکنش، ۵ µl از نمونه های PCR شده در ژل آگاروز ۱ درصد حاوی اتیدیوم بروماید با ولتاژ ۹۵ ولت به مدت ۴۰ دقیقه الکتروفورز گردیدند. حضور باند قوی در منطقه ۱۰۲۰bp مؤید تکثیر شدن قطعه مورد بررسی و حضور کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس است. در فرآیند PCR از آب مقطر به عنوان کنترل منفی و از DNA استخراج شده موجود در کیت (Mycobacterium Tuberclosis, MTB) (سیناژن-ایران) به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

انجام *PCR* جهت شناسایی مقاومت به ایزونیازید و ریفامپین: برای انجام PCR، از Master mix آماده تهیه شده از شرکت فرمنتاز کانادا (توالی پرایمر مقاومت دارویی) استفاده شد (۱۵). برای آماده سازی ترکیب PCR mix به حجم ۲۵ µl برای هر واکنش از ۱۲/۵ µl از Master mix آماده، ۱/۳ µl از هر پرایمر، ۲ µl از DNA ژنومی هر سویه جدا شده و ۷/۹ µl آب مقطر استریل دیونیزه استفاده شد. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر به صورت ۵ دقیقه در حرارت 95^{oC} سپس ۳۵ سیکل حرارتی شامل 94^{oC} به مدت ۱۵ ثانیه، 45^{oC} به مدت ۳۰ ثانیه، 72^{oC} به مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت یک سیکل حرارتی 72^{oC} به مدت ۷ دقیقه، بعد از انجام واکنش، ۵ µl از نمونه های PCR شده در ژل آگاروز ۱/۵ درصد حاوی اتیدیوم بروماید با ولتاژ ۹۵ ولت به مدت ۴۰ دقیقه الکتروفورز گردید. در فرآیند PCR از آب مقطر به عنوان کنترل منفی و از DNA استخراج شده موجود در کیت MTB به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. به منظور ارزیابی کیفیت DNA استخراج شده و محاسبه کمیت آن، از دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده شد. لذا پس از اندازه گیری جذب نوری (Optical Density, OD) محلول DNA در ۲۶۰ نانومتر، برای محاسبه کمیت DNA از فرمول:

ضریب رقت برحسب میکروگرم× ۵۰ × جذب نور در ۲۶۰ نانومتر= غلظت DNA در محلول برحسب میکروگرم استفاده شد:

برای تعیین کیفیت و نسبت خالص بودن DNA، جذب DNA در ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه گیری شد.

$$A = OD_{260} / OD_{280}$$

نسبت جذب A بین ۲- ۱/۸ نشاندهنده DNA خالص می باشد.

از شاخص مرکزی و پراکندگی جهت آنالیز و تعیین فراوانی داده ها استفاده شد و میزان فراوانی بیماری سل در بین افراد مشکوک مراجعه کننده به مرکز سل با ضریب اطمینان ۹۵٪ (CI 95%) محاسبه گردید.

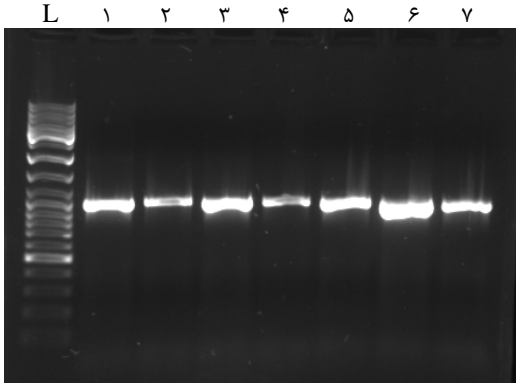
یافته ها

در این مطالعه ۱۳۴۵ نمونه از افراد مشکوک به سل مراجعه کننده به مرکز بهداشت استان مازندران جمع آوری شد که شامل خلط، مایع پلور، مایع آسیت، خون قاعدگی، مایع برونش، زخم، شیره معده، ادرار، مایع کیست کبدی، آبسه، مایع مفصل، ترشحات گردن، بیوپسی پا و بافت بودند که فراوان ترین آن ها، ۱۲۲۲ مورد (۹۰/۸٪) مربوط به خلط بود. میانگین سنی افراد مسلول ۱۷/۹۳±۴۵/۵ سال بوده است. حداقل سن بیماران ۱۵ سال و حداکثر آن ۷۹ سال بود. میزان فراوانی بیماری سل ۳ تا ۵ درصد با ضریب اطمینان ۹۵٪ می باشد. از ۱۳۴۵ نمونه جمع آوری شده، ۶۵ نمونه (۴/۸۳٪) از طریق کشت و ۵۷ نمونه (۴/۲۳٪) توسط اسمیر مثبت تشخیص داده شدند. شایع ترین علائم بیماری سل به ترتیب، سرفه بیش از ۳ هفته (۹۵/۳۸٪)، خلط فراوان (۸۹/۲۳٪)، کم اشتهایی (۸۳/۰۷٪)، درد قفسه سینه (۷۵/۳۸٪)، تب و لرز (۷۳/۸۴٪)، کاهش وزن (۶۹/۲۳٪) و وجود خون در خلط (۲۹/۲۳٪) بوده است (جدول ۱).

جدول ۱. نتایج کشت و اسمیر مثبت در نمونه های جمع آوری شده از افراد مسلول مراجعه کننده به مرکز بهداشت استان مازندران برحسب جنس و گروه های سنی

گروه سنی	اسمیر مثبت		کشت مثبت	
	زن	مرد	زن	مرد
	تعداد	تعداد	تعداد	تعداد
۱۰ -۱۹	۲	۳	۲	۳
۲۰ -۲۹	۷	۳	۸	۳
۳۰ -۳۹	۵	۲	۵	۳
۴۰ -۴۹	۱۱	۴	۱۳	۴
۵۰ -۵۹	۷	۲	۸	۲
۶۰ -۶۹	۳	۱	۳	۲
۷۰ -۷۹	۲	۵	۲	۷
مجموع	۳۷	۲۰	۴۱	۲۴
تعداد کل	۵۷		۶۵	

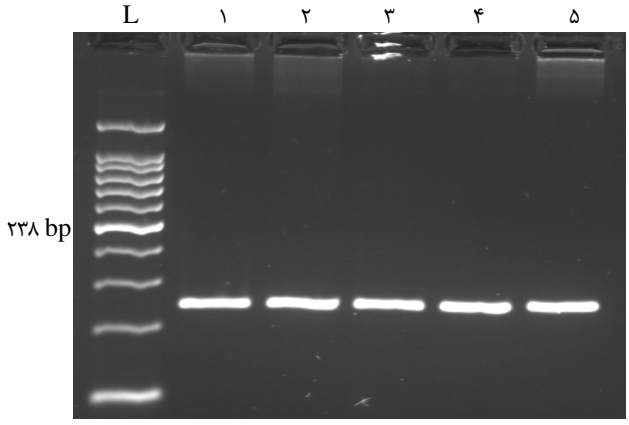
سنجش نمونه ها با پرایمر ژن gyrB نشان داد که ۵۹ نمونه (۹۰/۷۶٪) مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و ۶ نمونه (۹/۲۳٪) غیر توبرکلوزیس بودند (تصویر ۱). در روش PCR و با استفاده از ژن inhA، از میان ۵۹ ایزوله مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، ۵۶ ایزوله (۹۴/۹۲٪) حساس به ایزونیازید و ۳ ایزوله (۵/۰۸٪) مقاوم به ایزونیازید بود (تصویر ۲) و با استفاده از ژن KatG، از میان ۵۹ ایزوله مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، ۵۵ ایزوله (۹۳/۲۳٪) حساس به ایزونیازید و ۴ ایزوله (۶/۷۷٪) مقاوم به ایزونیازید بود (تصویر ۳). با استفاده از ژن rpoB، از میان ۵۹ ایزوله مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، ۵۸ ایزوله (۹۸/۳٪) حساس به ریفامپین و ۱ ایزوله (۱/۷٪) مقاوم به ریفامپین بود (تصویر ۴).



تصویر ۱. PCR جهت شناسایی کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس توسط ژن gyrB.

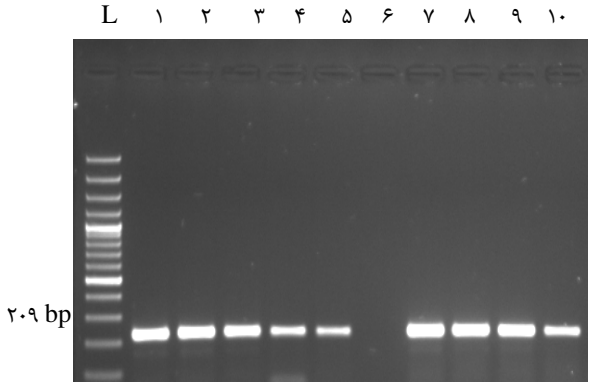
مارکر Lane 1، ۱۰۰ bp : کنترل مثبت، Lane 2,3,4,5,6,7 : کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (۱۰۲۰ bp).

[DOR: 20.1001.1.15614107.1391.14.3.10.0]



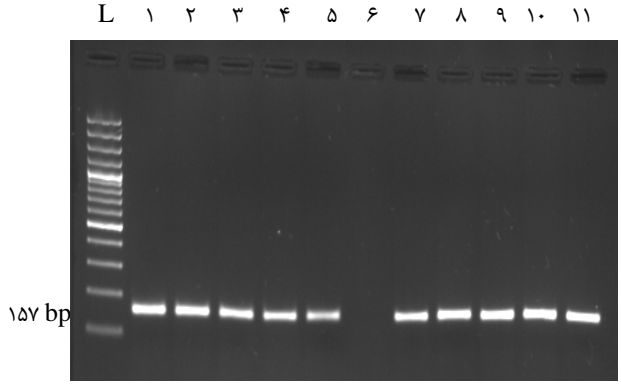
تصویر ۲. PCR جهت بررسی مقاومت و حساسیت به ایزونیازید توسط ژن inhA

Lane 1: H37Rv به عنوان کنترل مثبت، Lane 2,3,4: حساس به ایزونیازید، L مارکر ۱۰۰ bp.



تصویر ۳. PCR جهت بررسی مقاومت و حساسیت به ایزونیازید توسط ژن KatG

Lane 1: H37Rv به عنوان کنترل مثبت، Lane 1-5,7-10: حساس به ایزونیازید، Lane 6: مقاوم به ایزونیازید، L مارکر ۱۰۰ bp.



تصویر ۴. PCR جهت بررسی مقاومت و حساسیت به ریفامپین توسط ژن rpoB

Lane 1: H37Rv به عنوان کنترل مثبت، Lane 1-5,7-11: حساس به ریفامپین، Lane 6: مقاوم به ریفامپین، L مارکر ۱۰۰ bp.

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه، کمترین میزان بروز بیماری سل در گروهای سنی ۱۹-۱۰ سال (۵ مورد، ۷/۶۹٪) و ۶۹-۶۰ سال (۵ مورد، ۷/۶۹٪) و بیشترین بروز بیماری در گروه سنی ۴۹-۴۰ سال (۱۷ مورد، ۲۶/۱۵٪) مشاهده شد که ۴ مورد (۲۳/۵۲٪) مردان و ۱۳ مورد (۴۷/ ۷۶٪) را زنان تشکیل دادند. طی مطالعه ای که در سال ۱۳۸۰ در ایران بر روی سنین افراد مبتلا به سل انجام گرفت، کمترین میزان بروز بیماری سل در گروه سنی ۹-۵ سال با ۱/۵ در یکصد هزار نفر و بیشترین بروز بیماری در سنین بالای ۶۵ سال با ۸۸/۲ در یکصد هزار نفر مشاهده گردیده است (۲).

شایع ترین علائم بیماری سل به ترتیب، سرفه بیش از ۳ هفته (۹۵/۳۸٪)، خلط فراوان (۸۹/۲۳٪)، کم اشتهایی (۸۳/۰۷٪)، درد قفسه سینه (۷۵/۳۸٪)، تب و لرز (۷۳/۸۴٪)، کاهش وزن (۶۹/۲۳٪) و وجود خون در خلط (۲۹/۲۳٪) بوده است. در مطالعه حاضر، از میان ۵۷ مورد اسمیر مثبت، ۳۷ مورد (۶۵٪) مربوط به زنان و ۲۰ مورد (۳۵٪) مربوط به مردان بود و از ۶۵ مورد کشت مثبت، ۴۱ مورد (۶۳/۰۷٪) مربوط به زنان و ۲۴ مورد (۳۶/۹۲٪) مربوط به مردان بود. بنابراین در این مطالعه، میزان شیوع بیماری سل در زنان بیشتر از مردان می باشد که از این جهت با نتایج سایر مطالعات انجام شده در ایران مطابقت دارد (۲). در مطالعه حاضر، مقاومت به ایزونیازید توسط ژن inhA در۳ نمونه (۵/۰۸٪) و حساسیت به آن در ۵۶ نمونه (۹۴/۹۲٪) و توسط ژن KatG در ۴ نمونه (۶/۷۷٪) مقاومت و در ۵۵ نمونه (۹۳/۲۳٪) حساسیت مشاهده شد. ۱ نمونه (۱/۷٪) توسط ژن rpoB مقاوم به ریفامپین و ۵۸ نمونه (۹۸/۳٪) حساس به ریفامپین بودند.

Dinmohammadi و همکاران که در مطالعه خود وجود جهش در نواحی خاصی از ژن های KatG و inhA را در ۹۰ نمونه کشت مثبت بیماران مسلول ریوی بررسی نمودند، ۳۴/۵٪ از نمونه های مقاوم به ایزونیازید فنوتیپ Thr315 و ۶۵/۵٪ از نمونه های مقاوم فنوتیپ Ser315 داشتند و از ۵۲ نمونه مقاوم به ایزونیازید ۳۴/۶ درصد کدون ۴۶۳ دارای اسیدآمینه آرژنین و ۶۵/۴٪ اسیدآمینه لوسین را دارا بودند (۱۱). در مطالعه ای که توسط Torres در اسپانیا انجام شد، از بین ۹۶۴ سویه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس ،۳۸ سویه (۹/۳٪) مقاوم به ریفامپین، ۷۹ سویه (۲/۸٪) مقاوم به ایزونیازید و ۲۲ سویه (۳/۲٪) هم MDR بودند (۱۶). در یک مطالعه از ۵۲ سویه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، ۴ سویه (۷/۷٪) مقاوم به ایزونیازید و ۳ سویه (۵/۸٪) مقاوم به ریفامپین بودند (۱۷). در مطالعه Drobniewski و همکاران مقاومت به ریفامپین، ایزونیازید و MDR به ترتیب ۵۸/۲٪، ۵۱/۶٪ و ۴۴/۷٪ بدست آمد (۱۸). در مطالعه Somoskovi که مقاومت به ایزونیازید و ریفامپین با توجه به ژن های KatG و inhA و rpoB سنجیده شد، مشخص گردید که در ۹۲ سویه مقاوم، ۵۵٪ مقاومت از طریق جهش در ژن KatG و حدود ۲۰ درصد مقاومت از طریق جهش در ژن inhA ایجاد می شود و در ۲۵٪ سویه های مقاوم جهشی در هیچ کدام از این دو ژن دیده نشد. در مورد مقاومت به ریفامپین همه (۱۰۰٪) موارد مقاومت از طریق جهش در ژن rpoB دیده شد (۱۹). در تحقیق حاضر، نمونه های مورد مطالعه بیشترین مقاومت را نسبت به ایزونیازید نشان دادند که از این جهت با دیگر مطالعات انجام شده همخوانی دارد (۱۷و۱۶). برای کاهش میزان مرگ و میر در بیماران آلوده شده با سویه های مقاوم MTB، شناسایی سویه های مقاوم در زمان کوتاه تر امری ضروری به نظر می رسد. بنابراین می توان گفت روش

[DOR: 20.1001.1.15614107.1391.14.3.10.0]

PCR اگر با پرایمرهای متنوع تر که جهشهای بیشتری را شامل می شود، انجام گردد، می تواند روشی مناسب جهت شناسایی موتاسیون و سویه های مقاوم به ایزونیازید و ریفامپین باشد که منجر به کاهش تولید و انتشار سویه های مقاوم به دارو شده و به کمک آن می توان مقاومت دارویی را به حداقل رساند.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران، مسئولان بخش سل مرکز بهداشت استان مازندران و آقای محمدرضا نظری به دلیل همکاری در اجرای این تحقیق تشکر و قدردانی می گردد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1391.14.3.10.0]

Drug Resistance in Mycobacterium Tuberculosis Isolates to Isoniazid and Rifampin

M. Pourhajibagher (MSc) [1], M. Nasrollahi (PhD) [×1], S.R. Musavi (BSc)[2], B. Rahimi-Esboei (MSc)[3], A. Ghorbani Pashakolaei (MSc)[4]

1. Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
2. Health Care Center of Mazandaran Province, Sari, Iran
3. Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
4. Department of Immunology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

J Babol Univ Med Sci; 14(3); May 2012; pp: 66-72.
Received: Aug 16th 2011, Revised: Sep 7th 2011, Accepted: Nov 9th 2011.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Tuberculosis is the most dangerous infectious disease in the world today. Rifampicin (RMP) and Isoniazid (INH) are the two most important first-line anti-tuberculosis drugs for the treatment of tuberculosis. Resistance to these drugs has been increased in most of countries. The aim of this study was evaluation of drug resistant in mycobacterium tuberculosis isolates to Isoniazid and Rifampin in patients that referred to health care center of Mazandaran province, Iran.

METHODS: In this cross-sectional study, 1345 samples were collected of patients with clinical suspicions of tuberculosis that referred to health care centre of Mazandaran from July 2010 to June 2011. The specimens were cultured on Lowenstein-Jensen medium to detect the mycobacteria. DNA extraction of colonies and resistance to Isoniazid and Rifampin were evaluated by using the primers of inhA, KatG and rpoB genes.

FINDINGS: Of 1345 specimens, only 65 isolates were positive culture. Out of 65, 59 were MTBC by using the primers of MUTB-gyrB gene. Among this isolates, 56 (94.92%), 55 (93.23%) and 58 (98.3%) were susceptible and 3 (5.08%), 4 (6.77%) and 1 (1.7%) were resistant to inhA, KatG and rpoB, respectively.

CONCLUSION: The most resistance has been associated to Isoniazid. PCR can be a good method for identifying of the resistant strains of mycobacterium.

KEY WORDS: *Rifampin, Isoniazid, Mycobacterium tuberculosis, Drug resistance.*

[×]Corresponding Author;
Address: Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
Tel: +98 151 3543081
E-mail: mnasrolahei@yahoo.ca

[DOR: 20.1001.1.15614107.1391.14.3.10.0]

References

1.ATS-American Thoracic Society. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. Am J Resp Crit Care Med 2000;161(4Pt1):1376-95.

2.Rafi A, Maaddab R. Principles of mycobacteriology. 1st ed. Tabriz: Sotude Publications 2003; pp: 73-6. [in Persian]

3.Cheng X, Zhang J, Yang L, et al. A new multi-PCR-SSCP assay for simultaneous detection of isoniazid and rifampin resistance in mycobacterium tuberculosis. J Microbiol Methods 2007;70(2):301-5.

4.Guo JH, Xiang WL, Zhao QR, et al. Molecular characterization of drug-resistant mycobacterium tuberculosis isolates from Sichuan Province in China. Jpn J Infect Dis 2008;61(4):264-8.

5.Kim SY, Park YJ, Song E, et al. Evaluation of the Combichip mycobacterial drug-resistance detection DNA chip for identifying mutations associated with resistance to isoniazid and rifampin in mycobacterium tuberculosis. Diagn Microbiol Infect Dis 2006;54(3):203-10.

6.Doustdar F, Khosravi AD, Farnia P, Bahremand AR. High frequency of mutations in the rpoB gene in rifampicin-resistant clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis from Iran. Int J Antimicrob Agents 2007; Epub ahead of print.

7.Mirsaeidi MS, Tabarsi P, Farnia P, et al. Trends of drug resistant mycobacterium tuberculosis in a tertiary tuberculosis center in Iran. Saudi Med J 2007;28(4):544-50.

8.Jiao WW, Mokrousov I, Sun GZ, et al. Molecular characteristics of rifampin and isoniazid resistant mycobacterium tuberculosis strains from Beijing, China. Chin Med J 2007;120(9):814-9.

9.Telenti A, Imboden P, Marchesi F, et al. Detection of rifampicin-resistance mutations in mycobacterium tuberculosis. Lancet 1993;314(8846):647-50.

10.Piatek AS, Telenti A, Murray MR, et al. Genotypic analysis of mycobacterium tuberculosis in two distinct populations using molecular beacons: implications for rapid susceptibility testing. Antimicrobial Agents Chemother 2000;44(1):103-10.

11. Dinmohammadi F, Farnia P, Biglari A, et al. Identification of the mutations related to resistance of mycobacterium tuberculosis to isoniazid by use of PCR-RFLP in TB patients. Sci J Kurdistan Univ Med Sci 2009;14(4):1-9. [in Persian]

12.Kent PT, Kubica GP. Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. U.S. Department of Health and Human Services. Publication (CDC) 86-8236. Centers for Disease Control, Atlanta, USA, 1985.

13.Nakhjavani FA, Bahador A. Direct detection of Mycobacterium sp in respiratory specimen with rpoB-PCR and comparison with concentration fluorochrome staining. Res J Med Med Sci 2006;1(2):68-71.

14.Abass NA, Suleiman KM, El Jalii IM. Differentiation of clinical mycobacterium tuberculosis complex isolates by their gyrB polymorphism. Indian J Med Microbiol 2010;28(1):26-9.

15.Javid N, Ghaemi E, Mozafari NA, Rafiee S, Moradi AV, Dadgar T. Resistance to Isoniazid and Rifampin in Mycobacterium tuberculosis isolates of patients in Golestan province. Med Lab J 2009;3(1):1-8.

16.Torres MJ, Criado A, Gónzalez N, Palomares JC, Aznar J. Rifampin and isoniazid resistance associated mutations in mycobacterium tuberculosis clinical isolates in Seville, Spain. Int J Tuberc Lung Dis 2002;6(2):160-3.

17.Pfyffer GE, Bonato DA, Ebrahimzadeh A, et al. Multicenter laboratory validation of susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis against classical second-line and newer antimicrobial drugs by using the radiometric BACTEC 460 technique and the proportion method with solid media. J Clin Microbiol 1999;37(10): 3179-86.

18.Drobniewski F, Balabanova Y, Ruddy M, et al. Rifampin- and multidrug-resistant tuberculosis in Russian civilians and prison inmates: Dominance of the Beijing strain family. Emerg Infect Dis 2000;8(11):1320-6.

19.Somoskovi A, Dormandy J, Mitsani D, Rivenburg J, Salfinger M. Use of smear-positive samples to assess the PCR-based genotype MTBDR assay for rapid, direct detection of the mycobacterium tuberculosis complex as well as its resistant to isoniazid and rifampin. J Clin Microbiol 2006;44(12):4459-63.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1391.14.3.10.0]