Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences

Babazadeh, et al. *Med J Tabriz Uni Med Sciences*. 2024;46(5):524-533.
doi: 10.34172/mj.2024.054
https://mj.tbzmed.ac.ir

TUOMS PRESS

Original Article

Molecular resistance of Ethambutol in clinical samples obtained from patients admitted to the health center in Ardabil province using MAS-PCR

Furugh Babazadeh[1], Jafar Mohammadshahi[2], Hafez Mirzanejad-Asl[3], Reyhaneh Rahimzadeh[1], Zohreh Neyestani[1], Roghayeh Teimourpour[3*]

[1]MSc Student, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Ardabil University of Medical Science, Ardabil, Iran
[2]Department of Infectious Disease, Faculty of Medicine, Ardabil University of Medical Science, Ardabil, Iran
[3]Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Ardabil University of Medical Science, Ardabil, Iran

ARTICLE INFO

Article History:
Received: 3 Sep 2023
Accepted: 7 Dec 2023
ePublished: 9 Oct 2024

Keywords:
- Mycobacterium tuberculosis
- DNA
- Ethambutol
- MAS-PCR

Abstract

Background. Global stop TB is a critical strategy which aims at reducing the incidence of tuberculosis to less than one case per one million people by 2050. To achieve this goal, it is necessary to establish a timely diagnosis of the disease, provide an effective treatment, and identify the drug-resistant strains. Therefore, this study aimed to identify the resistance to ethambutol in patients referred to Ardabil Health Center.

Methods. In this descriptive cross-sectional study, 71 clinical samples were collected from the patients referred to Ardabil Health Center between 2017-2020. The samples were first examined adopting microscopic method, and then DNA was extracted using the boiling method. Specific primers and MAS-PCR technique were employed for identification of ethambutol resistance strains.

Results. Out of 71 collected specimens, six samples were NTM (8.45%). Out of all the examined samples, 36 samples (50.7%) had embB306 gene mutation, of which three samples were NTM (total NTM resistance was 50%). Out of the samples identified as resistant to ethambutol, six samples had a low bacterial load as +1 (16.67%), eight samples had a moderate bacterial load as +2 (22.22%), and the rest had a high bacterial load as +3 (61.11%).

Conclusion. In sum, the frequency of resistance to ethambutol was 50.7%, which was higher than that reported by previous similar studies. Furthermore, it was determined that the MAS-PCR method was a fast, cheap, and reliable method for identifying resistance to the first-line tuberculosis drugs such as ethambutol. Therefore, this method may have facilitated evaluating the resistance to other first-line drugs at the same time and preventing the spread of resistant strains in the community through early detection of the antibiotic resistance.

Practical Implications. Our study results may have been useful in increasing the awareness among the physician and health care workers of the ethambutol resistance level in indigenous strains in Ardabil province.

How to cite this article: Babazadeh F, Mohammadshahi J, Mirzanejad-Asl H, Rahimzadeh R, Neyestani Z, Teimourpour R. Molecular resistance of Ethambutol in clinical samples obtained from patients admitted to the health center in Ardabil province using MAS-PCR. *Med J Tabriz Uni Med Sciences.* 2024;46(5):524-533. doi: 10.34172/mj.2024.054. Persian.

Extended Abstract

Background

M. tuberculosis as a causative agent of tuberculosis can enter the human body through inhaling infected droplets and can affect every part of the body through blood and lymph streams. Despite many attempts over the past decades to treat

*Corresponding author; Email: r.teymourpour@gmail.com
© 2024 The Authors. This is an Open Access article published by Tabriz University of Medical Sciences under the terms of the Creative Commons Attribution CC BY 4.0 License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited

tuberculosis, it has remained an unresolved health issue. According to the current estimates, a quarter of the world's population is infected with a latent form of tuberculosis. HIV-TB coinfection along with the emergence and spread of multiple drug-resistance strains has created a critical situation for the future of human health worldwide. To address this situation, the stop TB project was developed by WHO to decrease the incidence rate of the disease to less than one case per one million people by 2050. Considering the importance of the issue, the present study aimed to investigate the resistance level of ethambutol as one of the first-line drugs against tuberculosis among indigenous strains in Ardabil province.

Methods

In this descriptive cross-sectional study conducted between 2017-2020, a total of 71 clinical specimens were taken from the patients admitted to the Health Center in Ardabil province. Inclusion criteria were any changes in chest radiography and the presence of acid – fast bacilli in sputum, Bronchoalveolar lavage (BAL) or any other specimens. Genus, underlying disorders, length of medication, and disease outcome were recorded as demographic data. Bacterial isolation and phenotypic susceptibility tests were not performed due to several limitations. According to the standard protocols, specimens were treated with NaOH 2% and N-Acetyl-L-cysteine 1% for decontamination and digestion of the specimens, respectively. After centrifuge, the obtained pellets were subject to smear preparation and Ziehl–Neelsen staining. The bacterial load was scored microscopically according to standard guidelines. The pellets underwent DNA extraction adopting the boiling method. The MAS-PCR method was employed for identifying a mutation in the embB306 gene.

Results

IS6110 gene, a molecular marker for identification of tuberculosis complex, was not detected in six specimens (8.45%**)** and, therefore, these specimens were considered as NTM strains. EmbB306 gene mutation, responsible for ethambutol resistance, was verified with MAS-PCR. Out of 71 specimens, embB306 gene mutation was detected in 36 cases (50.7%) of which three cases belonged to the NTM group. Bacterial load of the specimens was in range of +1(16.67%), +2(22.22%), and +3(61.11%). Furthermore, 65.96% of the patients were male, most of who received medication for 4-6 months (52.63%). Diabetes was the most prevalent underlying disease, and also, recurrence and death rates among the cases were 2.63% and 5.26% of, respectively.

Conclusion

An effective treatment of tuberculosis infection has remained a thorny problem due to the complex nature and waxy structure of the mycobacterial cell wall which act as a barrier to the entry of drugs. Drug resistant is a serious issue since it creates public health and economic burdens. Several mechanisms have been identified that trigger resistance to anti-mycobacterial agents including the drug modifying and inactivating enzymes, an efflux pump which actively transport the drugs outside the cell, and Spontaneous mutations in the TB genome which decrease the drug-target affinity. Resistance can be grouped as primary or secondary resistance. Primary resistance is related to infection with a resistant strain of TB, but secondary resistance is associated with initial infection with a susceptible strain of TB which during treatment susceptible strain becomes resistant. MDR and XDR terms are related to the strains that have become resistant to the main first and second anti-mycobacterial agents. Ethambutol is one of the first-line drugs against tuberculosis, which can be replace by streptomycin in the anti-TB medication regime. The antimicrobial activity of ethambutol is limited to mycobacteria. This antibiotic was initially designed against isoniazid-resistant strains, and has an effect synergistic with other antimycobacterial drugs such as isoniazid, rifampin, and fluoroquinolones. In patients who are infected with a strain sensitive to rifampin but resistant to isoniazid, according to WHO guidelines, a treatment with rifampin, ethambutol, pyrazinamide, and levofloxacin is recommended for six months. EmbCAB operon is involved in the production of

arabinosyl transferase enzymes which are involved in the production of arabinogalactan as a part of the waxy structure of the mycobacterium cell wall. According to the results of the previous studies, 50 to 70% of the ethambutol resistance is associated with mutations in a small genetic region between codons 306-497 related to embB genes. These mutations mostly occur in codons embB306, embB406, and embB497. However, other mutations in any part of the embCAB operon can be involved in ethambutol resistance. Previous studies have shown that, in general, the antibiotic resistance level differs according to the geographical region and diagnosis method. Unlike previous studies in different regions of Iran, the present study showed that the level of resistance to ethambutol was high, but the level of resistance to the strain NTMs (about 50%) was consistent with that reported by other similar studies in Iran. However, it was recommended that other antimicrobial susceptibility testing methods should be adopted to confirm the results of this study. In the present study, high resistance to ethambutol was observed, which should be verified precisely using phenotypic and molecular methods with more samples in future studies.

بابازاده و همکاران. *مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز*. آذر و دی ۱۴۰۳؛۴۶(۵):۵۲۴-۵۳۳.
doi: 10.34172/mj.2024.054
https://mj.tbzmed.ac.ir

مقاله پژوهشی

مقاومت مولکولی نسبت به اتامبوتول در نمونه‌های بالینی به دست آمده از بیماران مراجعه‌کننده به مرکز بهداشت شهر اردبیل با استفاده از MAS-PCR

فروغ بابازاده[۱]، جعفر محمدشاهی[۲]،حافظ میرزانژاد اصل[۳]، ریحانه رحیم‌زاده[۱]، زهره نیستانی[۱]، رقیه تیمورپور[۳*]

[۱]دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی،دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران
[۲]گروه بیماریهای عفونی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران
[۳]گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

اطلاعات مقاله

سابقه مقاله:
دریافت: ۱۴۰۲/۰۶/۱۲
پذیرش: ۱۴۰۲/۰۹/۱۶
انتشار برخط: ۱۴۰۳/۰۷/۱۸

کلید واژه‌ها:
- مایکوباکتریوم توبرکلوزیس
- DNA
- اتامبوتول
- MAS-PCR

چکیده

زمینه. از اهداف سازمان بهداشت جهانی، کاهش شیوع بیماری سل به کمتر از یک مورد در هر یک میلیون نفر تا سال ۲۰۵۰ می‌باشد. برای رسیدن به این هدف تشخیص سریع بیماری، ارائه درمان مؤثر و شناسایی سویه‌های مقاوم به دارو اهمیت بسیاری دارد. بر این اساس این مطالعه با هدف شناسایی مقاومت نسبت به اتامبوتول در بیماران مسلول مراجعه‌کننده به مرکز بهداشت اردبیل طراحی گردید.

روش کار. در این مطالعه مقطعی-توصیفی، بین سال‌های ۹۶-۹۹، ۷۱ نمونه بالینی از بیماران مراجعه‌کننده به مرکز بهداشت اردبیل جمع‌آوری شد. نمونه‌ها ابتدا با روش میکروسکوپیک بررسی شده سپس با روش جوشاندن، DNA استخراج شد. به کمک پرایمرهای اختصاصی و تکنیک PCR حضور سویه‌های کمپلکس سلی و به دنبال آن مقاومت نسبت به اتامبوتول بررسی گردید.

یافته‌ها. از ۷۱ نمونه بالینی مورد بررسی ۶ نمونه (۸/۴۵٪) NTM بودند. از کل نمونه‌های مورد بررسی، ۳۶ نمونه (۵۰/۷٪) دارای موتاسیون ژن embB 306 بودند که از این تعداد ۳ نمونه NTM بودند (کل مقاوم‌های NTM ۵۰٪ بود). در بین ایزوله‌های مقاوم به اتامبوتول، در ۶ نمونه، لود باکتری ۱ مثبت بود (۱۶/۶۷٪)، در ۸ نمونه لود باکتری ۲ مثبت بود (۲۲/۲۲٪) و در بقیه همگی ۳ مثبت یا بالاتر بودند (۶۱/۱۱٪).

نتیجه‌گیری. در این مطالعه میزان فراوانی مقاومت نسبت به اتامبول۵۰/۷٪ بود که درصد بالایی را نشان می‌دهد. همچنین این مطالعه نشان داد که روش MAS-PCR روشی سریع، ارزان و مؤثر برای شناسایی مقاومت نسبت به داروهای خط اول سل مانند اتامبوتول می‌باشد. به کمک این روش می‌توان همزمان مقاومت نسبت به بقیه داروهای خط اول را نیز بررسی کرد و با تشخیص سریع مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی و درمان مؤثرتر سویه‌های مقاوم از گسترش سویه‌های مقاوم در جامعه پیشگیری کرد.

پیامدهای عملی. نتایج این مطالعه می‌تواند در افزایش آگاهی پزشکان و کارکنان بهداشتی و درمانی از میزان مقاومت به اتامبوتول در میان سویه‌های بومی استان اردبیل مفید باشد.

مقدمه

بیماری سل شایع‌ترین علت مرگ ناشی از بیماری‌های عفونی تک عاملی در جهان است و به‌رغم پیشرفت‌های علم پزشکی، همچنان جزء مشکلات بهداشتی در کشورهای مختلف به شمار می‌رود.[۱] در بین بیماری‌های ناتوان‌کننده در طول زندگی، بیماری توبرکلوزیس رتبه هفتم را به خود اختصاص داده است. بر اساس گزارش WHO در سال ۲۰۲۰، حدود ۱۰ میلیون نفر در سراسر جهان به بیماری سل مبتلا شدند. از این بین ۵/۶ میلیون مرد، ۳/۳ میلیون زن و ۱/۱ میلیون کودک بودند. مرگ و میر ناشی از این بیماری در این سال حدود ۱/۵ میلیون نفر بوده است.[۲،۳] اتامبوتول دارویی است که در خط اول درمان سل استفاده

*نویسنده مسؤول؛ ایمیل: r.teymourpour@gmail.com
حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی تبریز تحت مجوز کریتیو کامنز CC BY 4.0 (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

می‌شود. اتامبوتول نخستین بار در سال ۱۹۶۶ برای درمان توبرکلوز معرفی شد و بخشی از رژیم خط-اول کنونی برای درمان این بیماری است. اتامبوتول با تداخل در بیوسنتز آرابینوگالاکتان در دیواره سلولی اثر باکتریواستاتیک خود را برضد باسیل‌های تکثیر شونده سل اعمال می‌دارند. در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، ژن‌های embCAB که به‌صورت یک اپرون سازمان‌دهی شده‌اند، آرابینوزیل ترانسفراز را کدگذاری می‌کنند. آرابینوزیل ترانسفراز در سنتز آرابینوگالاکتان دخیل است که توده D-آرابینوفورانوزیل-P-دکاپرنول میانجی را ایجاد می‌کند. مکانیسم مقاومت شناخته شده به اتامبوتول با موتاسیون‌های ژن embB مرتبط هستند که در اغلب مطالعات انجام‌شده شایع‌ترین موتاسیون‌ها مربوط به مکان embB 306 بوده‌اند.

مطالعات تبادل آللیک نشان داده است که موتاسیون‌های منفرد که سبب برخی جایگزینی‌های آمینواسیدی می‌شوند، مقاومت نسبت به اتامبوتول را ایجاد می‌کنند. نشان داده شده‌است که موتاسیون در ژن‌های مسیر بیوسنتز و متابولیک دکاپرنیل فسفریل-D-B-آرابینوز، همراه با موتاسیون در embB و embC روی هم جمع‌شده و بسته به نوع و تعداد موتاسیون، بازه‌ای از حداقل غلظت‌های مهاری اتامبوتول را به وجود می‌آورند. این یافته‌ها می‌تواند بر شناسایی صحیح مقاومت اتامبوتول به وسیله روش‌های مولکولی کنونی تأثیر داشته باشد. موتاسیون‌های embB 306 درجات متغیری از مقاومت نسبت به اتامبوتول را سبب می‌شوند.[۴] این دارو معمولا در ترکیب با سایر داروهای سل مانند ایزونیازید، ریفامپین و پیرازینامید استفاده می‌شود. از این دارو برای درمان عفونت‌های ناشی از مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، کمپلکس آویوم و مایکوباکتریوم کانزاسی استفاده می‌شود و این دارو به‌طور اولیه برضد ایزوله‌های مقاوم به ایزونیازید طراحی گردید و اثر هم‌افزایی با دیگر داروهای ضد سل شامل ایزونیازید، ریفامپین و فلوروکنولون‌ها دارد. اتامبوتول آرابینوزیل ترانسفرازهای (که به‌وسیله اپرون embCAB کد می‌شوند) درگیر در ساخت آرابینوگالاکتان که جزئی از دیواره سلولی مایکوباکتری است را مهار می‌کند. مقاومت به سرعت از طریق موتاسیون در ژن emb اگر دارو به تنهایی مصرف شود رخ می‌دهد.[۵،۶] MAS-PCR یک روش ارزان و سریع جهت شناسایی موتاسیون‌ها و به دنبال آن بررسی مقاومت دارویی می‌باشد. در مطالعه‌ای صاحبی و همکاران نشان دادند در مقایسه با روش استاندارد proportional، روش MAS-PCR به‌ترتیب حساسیت و اختصاصیت ۶۸/۷۵٪ و ۱۰۰٪ دارد.[۷] از آنجایی‌که شناسایی مقاومت به داروهای خط اول بسیار مهم بوده و به طراحی رژیم درمانی مناسب کمک می‌کند و از گسترش سویه‌های مقاوم به دارو جلوگیری می‌کند این مطالعه با هدف بررسی مولکولی مقاومت به اتامبوتول طراحی گردید.

روش کار

این مطالعه از نوع مقطعی-توصیفی بوده که معیارهای ورود افرادی بودند که تغییرات در رادیوگرافی سینه داشته و باسیل‌های اسید فاست در لام زیل نلسون تهیه شده از نمونه آنها مشاهده گردید (اسمیر مثبت). جامعه آماری بیماران مراجعه‌کننده به مرکز بهداشت اردبیل وابسته به دانشگاه علوم پزشکی اردبیل که نمونه‌های بالینی آنها طی سال‌های ۹۶-۹۹ جمع‌آوری شده و مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه‌های مورد استفاده نمونه خلط و برونکوآلوئولار بودند و از این نمونه‌ها استخراج DNA انجام شد و اطلاعات دموگرافیک بیماران نیز ثبت گردید. حجم نمونه با توجه به فرمول زیر و در نظر گرفتن یک سطح معنی‌داری ۰/۰۵ و دقت ۰/۱ و میزان شیوع برابر ۰/۲۴ برابر ۷۰ تعیین گردید (d=0.1,z=1.96 ,p=0.24).[۸]

$$n = \frac{z^2 p.q}{d^2} \cong 70$$

با کمک MAS-PCR و پرایمرهای اختصاصی سویه‌های مقاوم شناسایی شدند. متغیرهای مورد بررسی در این مطالعه شامل سن، جنس، نوع نمونه، بیماری زمینه‌ای و ردیابی ژن‌های IS6110 و embB 306 بود. با استفاده از روش PCR و با پرایمرهای IS6110 حضور مایکوباکتریوم توبرکلوزیس تأیید شد. از روش MAS-PCR جهت بررسی موتاسیون در ژن embB 306 استفاده گردید. در این پژوهش از تمامی ۷۱ نمونه از بیماران مسلول مراجعه‌کننده به مرکز بهداشت اردبیل در بین سال های ۹۹-۹۶ نمونه خلط و برنکوآلئولار گرفته شد و پس از بررسی میکروسکوپیک و تعیین لود باکتری ژنوم باکتری مستقیماً از نمونه‌ها جدا شد. استخراج DNA از نمونه‌های بالینی با استفاده از روش جوشاندن (Boiling) و به‌صورت دستی انجام گرفت.[۹،۱۰] به‌طور خلاصه نمونه‌های پردازش شده برای بررسی مستقیم سانتریفوژ گردی و ۲ بار با نرمال سالین شستشو داده شد سپس در ۲۰۰ لاندا بافر استخراج (Tris-Hcl100 mM, pH=7.6, Tween20 0.05%, proteinase K 200 µg/mL) حل کرده سپس به مدت ۳ ساعت در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شده و به دنبال آن ۱۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شده و سپس به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۵۰۰۰ rpm سانتریفوژ می‌گردد. مایع رویی حاوی DNA می‌باشد که غلظت آن با نانودارپ اندازه‌گیری گردید (thermo company, NanoDrop 2000). از پرایمرهای جدول ۱ برای ژنIS6110 و موتاسیون در ژن embB 306 استفاده گردید (پیشگام، ایران). محلول واکنش PCR در

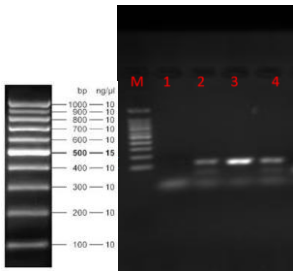
حجم ۲۵ میکرولیتر حاوی ۱۰ xPCR buffer، ۱۰ mM dNTP mix، ۱٫۵ mmol MgCl2، (1U) Taq DNApolymerase، (۵-۱۰ pmol) primer و (0.5-1 µg) template DNA تهیه گردید. در نهایت جهت تأیید نتایج، محصول PCR جهت تأیید توالی یابی (ABI 350,US) ارسال شد و نتایج بدست آمده با نرم افزار chromas v.2.6.6 (Technelysium Pty Ltd, Australia) آنالیز و با توالی موجود در بانک ژن (Genbank(/https://www.ncbi.nlm.nih.gov مقایسه گردید. داده‌های بدست‌آمده با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS v.22 مورد آنالیز قرار گرفت. برای توصیف اطلاعات از نمودارها و جداول آماری استفاده شد و جهت تحلیل اطلاعات از مدل رگرسیون لجستیک برای بررسی میزان رابطه بین متغیرهای مستقل و وابسته استفاده شد. سطح معنی‌داری آزمون‌ها کمتر از ۵% در نظر گرفته شد.

جدول۱. لیست توالی پرایمرهای مورد استفاده

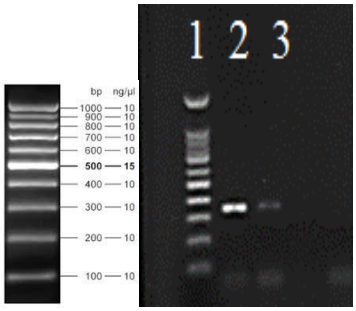
Name	(Seq(5-3	Product-size(bp)	(Anneling (°C	Reference
IS6110 F	’CTCGTCCAGCGC-CGCTTCGG-3-’۵	۱۳۰ bp	۶۲	۱۱
IS6110 R	’GAGCGTAGGCGTCGG-3(۳CCTGC(-’۵			
embB 306 F	GGCTACATCCTGGGCATG-3 -’۵	۳۳۵ bp	۵۸	۱۴
embB 306 R	GAGCCGAGCGCGATGAT-3 -’۵			

یافته‌ها

۷۱ نمونه خلط مثبت از بیماران مسلول مراجعه‌کننده به مرکز بهداشت اردبیل از سال ۱۳۹۶ تا ۱۳۹۹ جمع‌آوری شد. ۷% از بیماران سابقه درمان سل در گذشته داشتند. اکثر بیماران (۶۵/۹۶%) مرد بودند. شایع‌ترین بیماری زمینه‌ای (۱۰/۵%) دیابت بود طول دوره درمان در اکثر بیماران (۵۲/۶۳%) ۴-۶ ماه بود و وضعیت بیماران از لحاظ پیامد بیماری در اکثر موارد (۸۱/۵۸%) بهبود یافته بودند. میزان لود باکتری در این بیماران بین ۱+ تا بیش از ۳+ بود. جهت تعیین لود باکتری از رنگ‌آمیزی زیل‌نلسون و مشاهدات میکروسکوپیک لام‌ها استفاده شد. از کل نمونه‌ها ۴۲ نمونه (۵۹/۱۵ %) میزان لود باکتری ۳+ یا بالاتر از ۳ بود. ۱۳ نمونه (۱۸/۳۱%) لود باکتری ۱+ و ۸ نمونه (۱۱/۲۷%) لود باکتری ۲+ داشتند. توزیع فراوانی بیماران براساس بیماری زمینه‌ای به‌ترتیب دیابت ۱۰/۵%، بیماری روماتولوژِی ۷/۹%، نارسایی و پیوند کلیه ۵/۳%، اعتیاد ۲/۶%، ایدز ۲/۶% بود. توزیع فراوانی بیماران بر اساس طول دوره درمان به‌ترتیب ۱-۳ ماه ۷/۹%، ۴-۶ ماه ۵۲/۶۳%، ۷-۹ ماه ۱۵/۸%، ۱۰-۱۲ ماه ۱۵/۸% و بیش از ۱۲ ماه ۷/۹% بود. توزیع فراوانی بیماران بر اساس پیامد بیماری به‌ترتیب بهبود یافته ۷۱/۵۸%، تکمیل طول دوره درمان ۱۰/۵۳%، عود بیماری ۲/۶۳%، فوت ۵/۲۶% بود. از تکثیر ژن IS6110 برای تأیید سویه‌های کمپلکس سلی استفاده گردید. در این PCR از آب مقطر به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد و در نهایت محصول PCR جهت سکانس و تأیید قطعه مورد نظر برای توالی‌یابی ارسال گردید. از تعداد کل نمونه‌های مورد بررسی، ۶ نمونه (۸/۴۵%) متعلق به مایکوباکتریوم‌های غیر توبرکلوزی بودند (شکل ۱). به کمک MAS-PCR حضور موتاسیون در ژن embB 306 بررسی گردید. تکثیر قطعه bp ۳۳۵، نشان‌دهنده عدم موتاسیون و عدم تکثیر این قطعه، نشان دهنده موتاسیون می‌باشد. از BCG و آب مقطر به‌عنوان کنترل منفی استفاده گردید. از کل نمونه‌های مورد بررسی، ۳۶ نمونه (۵۰/۷%) دارای موتاسیون ژن embB 306 بودند که از این تعداد ۳ نمونه مایکوباکتریوم غیر توبرکلوزی بودند (کل مقاوم‌های NTM ۵۰% بود). در بین ایزوله‌های مقاوم به اتامبوتول، در ۶ نمونه (۱۶/۶۷%) لود باکتری ۱+ بود، در ۸ نمونه (۲۲/۲۲%) لود باکتری ۲+ بود و در بقیه (۶۱/۱۱%) همگی ۳+ یا بالاتر بودند (شکل۲).



شکل ۱. نمونه تصویری از ژن IS6110 (۱۳۰ bp) محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱%؛ ستون M: سایز مارکر ((Ladder 100 bp:CinnaClon,Iran؛ ستون۴-۲: نمونه دارای ژن IS6110 ستون۱: نمونه فاقد ژن IS6110



شکل ۲. نتایج الکتروفورز محصول برای بررسی ژن embB 306 (bp335) برروی ژل آگاروز ۱%؛ ستون۱: سایزمارکر (Ladder۱۰۰bp :SinnaClon)، ستون‌های ۲ و ۳ مربوط به محصول

بحث

اتامبوتول از داروهای خط اول سل بوده که در درمان ۴ دارویی سل می‌تواند جایگزین استرپتومایسین شود. فعالیت ضدمیکروبی اتامبوتول محدود به مایکوباکتریوم‌ها می‌باشد. این آنتی‌بیوتیک با دیگر داروهای ضد مایکوباکتریایی مانند ایزونیازید، ریفامپین و فلوروکینولون‌ها اثر سینرژیسمی دارد.[۱۲] بر طبق توصیه‌های سازمان WHO، در بیمارانی که نسبت به ریفامپین حساس هستند اما به ایزونیازید مقاوم هستند درمان با ریفامپین، اتامبوتول، پیرازین‌آمید و لووفلوکسازین به مدت ۶ ماه توصیه می‌شود.[۱۳] embCAB operon در تولید آنزیم‌های arabinosyl transferases دخیل هستند که این آنزیم‌ها در تولید arabinogalactan موجود در دیواره سلولی نقش دارد. ۵۰ تا ۷۰ % مقاومت نسبت به اتامبوتول در ارتباط با موتاسیون در منطقه ژنتیکی کوچکی بین کدون‌های ۳۰۶-۴۹۷ مربوط به ژن‌های embB است. این موتاسیون‌ها عمدتاً در کدون‌های embB 306، embB 406 و embB 497 است. با این وجود موتاسیون در بقیه قسمت‌های اپرون embCAB در ایجاد مقاومت نسبت به اتامبوتول دخیل هستند.[۱۴] شن و همکاران در سال ۲۰۰۷ ارتباط بین موتاسیون در embB 306 به‌عنوان یک مارکر مؤثر و سریع در شناسایی و مقاومت نسبت به اتامبوتول را نشان دادند.[۱۵] نتایج مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۶-۲۰۱۷ بر روی ۹۷۱۷ بیمار مبتلا به سل در ایران انجام شد نشان داد که ۱۲% از افراد مبتلا به سل در ایران مهاجرین افغان هستند و ۷۲/۳% از کل بیماران مبتلا به توبرکلوزیس به فرم ریوی گرفتار هستند. میانگین سنی مردان ۵۱/۱ و میانگین سنی زنان ۴۸/۱ سال بود. میزان موفقیت درمانی در افراد اسمیر مثبت ۸۷/۵% بود و همچنین میزان مقاومت نسبت به ایزونیازید ۱۰%، ریفامپین ۶/۲%، اتامبوتول ۲/۵% و استرپتومایسین ۴/۲% گزارش گردید.[۱۶] همچنین ۴۳۸ ایزوله مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از نظر مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های خط اول به روش فنوتیپی مورد بررسی قرار گرفتند که میزان مقاومت نسبت به ایزونیازید ۶۶/۷%، ریفامپین ۵۴/۵%، اتامبوتول ۱۲/۱%، و پیرازین آمید ۱۵/۲% بود. الگوی مقاومت دارویی در سل در هر منطقه‌ی جغرافیایی متفاوت است و جهت کنترل سل بررسی تغییرات الگوی مقاومت دارویی در نواحی مختلف جغرافیایی الزامی می‌باشد. تشخیص زودهنگام مقاومت می‌تواند باعث انتخاب مناسب درمان مناسب‌تر شود و در نتیجه احتمال شکست درمان و مقاومت به دارو را کاهش دهد.[۱۷] در مطالعه‌ای که توسط اصغرزاده و همکاران در تبریز انجام شد، توانایی دو روش MAS-PCR وproportional در شناسایی سویه‌ای مقاوم به اتامبوتول مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه موتاسیون در ژن embB به روش MAS-PCR مورد بررسی قرار گرفت. میزان مقاومت نسبت به اتامبوتول ۳/۳۳% تعیین گردید و این مطالعه نشان داد که روش MAS-PCR یک روش ساده و در عین حال حساس برای شناسایی سویه‌ای مقاوم به اتامبوتول می‌باشد.[۱۸] در مطالعه‌ی دیگری که توسط مونیر و همکاران در سال ۲۰۱۷ در پاکستان انجام شد، از MAS-PCR برای بررسی موتاسیون در ژن embB 306 استفاده شد. در این مطالعه میزان مقاومت به اتامبوتول ۵۱/۶% تعیین گردید که به یافته ما نزدیک می‌باشد. همچنین در این مطالعه نتایج حاصل از کشت و MAS-PCR با یکدیگر مقایسه شدند. روش MAS-PCR روشی حساس، سریع، ارزان و قابل اعتماد برای شناسایی موتاسیون در ژن‌های مؤثر در مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها بوده و در مورد مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به کمک این روش می‌توان به‌طور همزمان موتاسیون در چندین ژن و به دنبال آن بروز مقاومت نسبت به ایزونیازید، ریفامپینو اتامبوتول را ردیابی کرد.[۱۹] در مطالعه‌ای در اصفهان مقاومت به اتامبوتول به کمک روش مولکولی PCR-SSCP مورد بررسی قرار گرفت که میزان مقاومت به اتامبوتول ۶/۲۵% گزارش گردید که با مطالعه ما تفاوت زیادی دارد. البته باید به تعداد کم نمونه (۳۲ ایزوله) مورد بررسی در این مطالعه توجه داشت. در این مطالعه حساسیت روش PCR-SSCP برای تشخیص مقاومت نسبت به اتامبوتول مورد بررسی قرار گرفت.[۲۰] از طرفی در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۳ در انستیوپاستور تهران از MAS-PCR و کشت برای بررسی مقاومت نسبت به اتامبوتول در ۱۷۶ ایزوله مورد استفاده قرار گرفت که نشان داد ۲۷/۲۷% از ایزوله‌ها نسبت به اتامبوتول مقاوم هستند.[۲۱] میزان مقاومت در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۲-۲۰۱۳ در شمال شرق ایران ۳% گزارش گردید که با نتایج مطالعه ما تفاوت زیادی دارد.[۲۲] در مطالعه‌ای که توسط درخشانی‌نژاد و همکاران در بیمارستان مسیح دانشوری تهران در سال ۹۱ انجام شد، ۱۰۶ ایزوله مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از نظر موتاسیون در ژن embB مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه از روش MAS-PCR برای شناسایی موتاسیون استفاده گردید که ۲۷/۶% ایزوله‌ها به اتامبوتول مقاوم بودند.[۲۳] در زیمباوه مطالعه‌ای نشان داد، از ۶۱ ایزوله‌ای به لحاظ فنوتیپی به اتامبوتول مقاوم بودند در ۵۳ ایزوله موتاسیون در ژن ۵۳ مشاهده گردید. این مطالعه نشان داد استفاده از تکنیک‌های مولکولی می‌تواند تشخیص مقاومت به اتامبوتول را با حساسیت و اختصاصیت بالا تسهیل نماید.[۲۴] رمضان‌زاده و همکاران در غرب ایران در مطالعه‌ی دیگری نشان دادند، موتاسیون در ژن‌های embB ۳۰۶ و ۴۰۶ در

طی سال‌های ۲۰۱۴-۲۰۱۵ مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه ۵۰ سویه از مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بررسی شد که از ۵۰ ایزوله مورد بررسی، ۱۴٪ ایزوله نسبت به اتامبوتول مقاومت فنوتیپی داشتند که ۶/۲۷٪ از سویه‌های مقاوم دارای موتاسیون در ژن embB 306 بودند.[۲۵] همچنین در تهران مطالعه‌ای در بین سال‌های ۲۰۱۰-۲۰۱۲ انجام شد که ۱۷۶ ایزوله مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از نظر مقاومت نسبت به اتامبوتول و موتاسیون در ژن embB 306 مورد بررسی قرار گرفتند. از ۱۷۶ ایزوله مورد بررسی با روش MAS-PCR، ۴۸ ایزوله مقاوم به اتامبوتول بودند.[۲۱] در مطالعه‌ای دیگر ۱۷۴ ایزوله مایکوباکتریوم توبرکلوزیس جدا شده از بیماران ترکیه‌ای از نظر مقاومت نسبت به اتامبوتول با روش MAS-PCR مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه ۳۳ ایزوله به لحاظ فنوتیپی نسبت به اتامبوتول مقاوم بودند که از بین آنها ۱۸ ایزوله (۵۴/۵٪) دارای موتاسیون در embB 306 ، ۴ ایزوله (۱۲/۱٪) دارای موتاسیون در embB 406 و ۱ ایزوله (۳٪) دارای موتاسیون در embB 354 بودند.[۲۶] مطالعات گذشته نشان داده است که میزان مقاومت به اتامبوتول در سویه‌های کمپلکس سلی بسته به منطقه جغرافیایی و روش تشخیص متفاوت می‌باشد. برخلاف مطالعات قبلی در مناطق مختلف ایران، مطالعه حاضر سطح بالای مقاومت نسبت به اتامبوتول را نشان داد اما میزان مقاومت در سویه های NTM (حدود ۵۰٪) مطابق با سایر مطالعات در ایران بود.[۲۷،۲۸]

نتیجه‌گیری

از محدودیت‌های مطالعه حاضر عدم امکان بررسی مقاومت فنوتیپیک نسبت به اتامبوتول می‌باشد که در مطالعات آتی باید مورد توجه قرار گرفته و نتایج حاصل از این مطالعه با انجام تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی تأیید شود. در مطالعه حاضر مقاومت بالا نسبت به اتامبوتول مشاهده گردید که باید با استفاده از روش‌های فنوتیپی و در تعداد نمونه‌های بیشتر در مطالعات آتی مورد بررسی دقیق‌تر قرار گیرد و بررسی مقاومت به این آنتی‌بیوتیک قبل از تجویز توصیه می‌شود.

قدردانی

نویسندگان این مطالعه از حمایت‌های دانشگاه علوم پزشکی اردبیل برای انجام این مطالعه تشکر و قدردانی می‌کنند.

مشارکت پدیدآوران

رقیه تیمورپور در ایده‌پردازی، طراحی مطالعه، نگارش مقاله، جعفر محمدشاهی در ایده‌پردازی، طراحی مطالعه و ویرایش متن مقاله، فروغ بابازاده در جمع‌آوری نمونه‌ها، انجام تست‌های آزمایشگاهی، ریحانه رحیم زاده در انجام تست‌های آزمایشگاهی، زهره نیستانی در انجام تست‌های آزمایشگاهی، حافظ میرزانژاد در جمع‌آوری نمونه، مشارکت داشتند. همچنین همه نویسندگان نسخه نهایی مقاله را خوانده و تأیید کرده‌اند.

منابع مالی

هزینه مالی این مطالعه توسط معاوت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی اردبیل تأمین شده است.

دسترس‌پذیری داده‌ها

تمام داده‌های ایجاد شده در این مطالعه در این مقاله گنجانده شده است.

ملاحظات اخلاقی

این مقاله منتج از پایان‌نامه با کد اخلاق IR.ARUMS.MEDICINE.REC.1400.016 می‌باشد.

تعارض منافع

مؤلفان اعلام می‌کنند که این اثر حاصل یک پژوهش مستقل بوده و هیچ تضاد منافعی با سازمان‌ها و اشخاص دیگر ندارد.

References

1. World Health Organization. The sixteenth global report on tuberculosis. Tuberculosis: Executive summary. WHO Rep. 2011;2011:1-2.
2. MacNeil A, Glaziou P, Sismanidis C, Date A, Maloney S, Floyd K. Global epidemiology of tuberculosis and progress toward meeting global targets—worldwide, 2018. Morbidity and Mortality Weekly Report. 2020;69(11):281.
3. Reichler MR, Khan A, Sterling TR, Zhao H, Chen B, Yuan Y, et al. Risk factors for tuberculosis and effect of preventive therapy among close contacts of persons with infectious tuberculosis. Clinical Infectious Diseases. 2020;70(8):1562-72.
4. Lee N, Nguyen H. Ethambutol: StatPearls 2020.
5. Sia IG, Wieland ML. Current concepts in the management of tuberculosis. Mayo Clinic Proceedings. 2011;86(4):348-61.
6. Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious

Diseases E-Book: 2-Volume Set. Elsevier health sciences; 2019.
7. Sahebi L, Ansarin K, Farajnia S, Monfaredan A, Sabour S. Prevalence and risk factors of drug-resistant tuberculosis in border provinces of Iran. Postgraduate Medicine. 2015;127(6):600-6.
8. Sahebi L, Ansarin K, Farajnia S, Monfaredan A, Seyyedi M, Dastgiri S, et al. Rapid and simultaneous genotypic detection of Rifampin-Isoniazid and Ethambutol resistant Mycobacterium tuberculosis by use of MAS-PCR. International Journal of Mycobacteriology. 2015;4:89.
9. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold spring harbor laboratory press; 1989.
10. Ashouri P, Mohammadshahi J, Nikbin VS, Peeridogaheh H, Mohammadi-Ghalehbin B, Refahi S, et al. Antimicrobial Resistance, Integron Carriage, and Fluoroquinolone Resistance Genes in Acinetobacte baumannii Isolates. Archives of Clinical Infectious Diseases. 2022;17(5):e120590. doi: 10.5812/archcid-120590
11. Golub JE, Bur S, Cronin WA, Gange S, Baruch N, Comstock GW, et al. Delayed tuberculosis diagnosis and tuberculosis transmission. The international journal of tuberculosis and lung disease. 2006;10(1):24-30.
12. Drew RH. Ethambutol: An Overview. 2018;2-3.
13. World Health Organization. WHO consolidated guidelines on drug-resistant tuberculosis treatment. World Health Organization; 2019.
14. Zhao LL, Sun Q, Liu HC, Wu XC, Xiao TY, Zhao XQ, et al. Analysis of embCAB mutations associated with ethambutol resistance in multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates from China. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2015;59(4):2045-50.
15. Shen X, Shen GM, Wu J, Gui XH, Li X, Mei J, et al. Association between embB codon 306 mutations and drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2007;51(7):2618-20.
16. Doosti A, Nasehi M, Moradi G, Roshani D, Sharafi S, Ghaderi E. The Pattern of Tuberculosis in Iran: A National Cross-Sectional Study. Iranian journal of public health. 2023;52(1):193.
17. Farzaneh SS, Norouzi F, Fazeli H, Moghim S, Nasr Esfahani B. Resistance to First-line Drugs in Clinical Isolates of Mycobacterium tuberculosis in Isfahan. Journal of Isfahan Medical School. 2022;40(685):654-8.
18. Asgharzadeh M, Jahantabi AR, Shahbabian K, Nahaei MR, Rafi AN. Detection of Ethambutol-resistant Mycobacterium tuberculosis strains by MAS-PCR method and comparison with Proportion. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences. 2007;17(57):50-6.
19. Munir S, Mahmood N, Shahid S, Khan MI. Molecular detection of Isoniazid, Rifampin and Ethambutol resistance to M. tuberculosis and M. bovis in multidrug resistant tuberculosis (MDR-TB) patients in Pakistan. Microbial Pathogenesis. 2017;110:262-74.
20. Esfahani BN, Zarkesh FS, Yazdi HR, Radaee T. Detection of embB gene mutations in EMB-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates from Isfahan province by PCR-SSCP and direct sequencing. Jundishapur Journal of Microbiology. 2016;9(12):e39594. doi: 10.5812/jjm.39594
21. Bahrami S, Bahrmand AR, Safarpour E, Masoumi M, Saifi M. Detection of ethambutol-resistant associated mutations in Mycobacterium tuberculosis isolates from Iran using multiplex allele-specific PCR. 2013;1(1):41-5.
22. Tavanaee Sani A, Shakiba A, Salehi M, Bahrami Taghanaki HR, Ayati Fard SF, Ghazvini K. Epidemiological characterization of drug resistance among Mycobacterium tuberculosis isolated from patients in northeast of Iran during 2012-2013. BioMed research international. 2015;2015:Article ID 747085, 6 pages. doi: 10.1155/2015/747085
23. Derakhshani Nezhad Z, Sheikolslami FM, Farnia P, Deilami Khiabani Z, Ramazanzadeh R, Kazempoor M, et al. Identification and genetic diversity of etambutol resistant strains of mycobacterium tuberculosis by allelic-specific PCR and spologiotyping. Journal of Ardabil University of Medical Sciences. 2012;12(3):248-55.
24. Bwalya P, Solo ES, Chizimu JY, Shrestha D, Mbulo G, Thapa J, et al. Characterization of embB mutations involved in ethambutol resistance in multi-drug resistant Mycobacterium tuberculosis isolates in Zambia. Tuberculosis. 2022;133:102184.
25. Mohammadi B, Mohajeri P, Rouhi S, Ramazanzadeh R. The relationship between embb306 and embb406 mutations and ethambutol resistant in Mycobacterium tuberculosis isolated from patiens in west of Iran. Medical Journal of the Islamic Republic of Iran. 2018;32:117.

26. Yang Z, Durmaz R, Yang D, Gunal S, Zhang L, Foxman B, et al. Simultaneous detection of isoniazid, rifampin, and ethambutol resistance of Mycobacterium tuberculosis by a single multiplex allele-specific polymerase chain reaction (PCR) assay. Diagnostic microbiology and infectious disease. 2005;53(3):201-8.
27. Furukawa NW, Haider MZ, Allen SJ, Carlson SL, Lindquist SW. Resistance to first-line antituberculosis drugs in Washington state by region of birth and implications for latent tuberculosis treatment among foreign-born individuals. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 2017;96(3):543.
28. Abate G, Stapleton JT, Rouphael N, Creech B, Stout JE, El Sahly HM, et al. Variability in the management of adults with pulmonary nontuberculous mycobacterial disease. Clinical Infectious Diseases. 2021;72(7):1127-37.