



Scan online to view this article

Molecular characterization of Mycobacterium tuberculosis isolates resistance to first and second line drug on gene effect in the clinical samples from suspected patients to Tuberculosis
Samer Montazeri¹, Abbas Akhavansepahy¹, Alireza Ghasempour²,
Ahmad Majd¹, Saeed Zaker Bostan Abad³

1. Department of Biology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2. Department of Biology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

3. Department of Biology, Parand Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Aim and Background: Diagnosis of drug-resistant tuberculosis is of high value considering the importance of controlling tuberculosis. Identifying and introducing a rapid and specific diagnostic method for the causative agent of tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, is of great importance. The aim of this study is molecular characterization the presence of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* to first- and second-line drugs in suspected tuberculosis patients.

Materials and methods: This study was conducted on 2895 patients referred to different laboratory centers who were suspected to tuberculosis. The samples that were positive on the culture medium were examined by the drug resistance evaluation method and also the sequencing was performed on drug resistant genes including *katG*, *rpoB*, *rrsL* and *gyrA* to identify the corresponding mutations.

Findings: During the study period from October 2018 to March 2022, 2895 people, a total of 283 positive samples and 60 resistant samples were isolated, and the relevant mutations in each gene were determined based on nucleotide changes on the relevant genes.

Conclusion: Due to the fact that the diagnosis of tuberculosis, especially in the case of *Mycobacterium tuberculosis*, is time consuming especially when samples are positive and it takes a long time to perform the resistance evaluation test. So molecular identification and identification of the relevant mutations on the related drug-resistance genes, provides the possibility of accurate diagnosis and timely treatment

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, Drug Resistant, Tuberculosis patient. , Iau Science

Corresponding author:

Department of Biology, Parand Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Email: saeedzaker20@yahoo.com



برای مشاهده این مقاله به صورت
آنلاین اسکن کنید

شناسایی مولکولی ایزوله‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس

مقاوم به داروهای رده اول و دوم دارویی بر روی

ژن‌های مرتبط در نمونه‌های بالینی جدا شده از بیماران مشکوک به سل

سامر منتظری^۱، عباس اخوان سپهری^۱، علیرضا قاسم پور^۲، احمد مجد^۱، سعید ذاکر بستان آباد^{۳*}

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران

۲. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید بهشتی،

۳. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند، تهران، ایران

سابقه و هدف: تشخیص بیماری سل مقاوم به دارو با توجه به اهمیت کنترل بیماری سل از ارزش بالایی برخوردار است. شناسایی و معرفی روش تشخیصی سریع و اختصاصی برای عامل بیماری سل، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس دارای اهمیت بسزایی است. هدف از این مطالعه تشخیص مولکولی وجود مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به داروهای رده اول و دوم درمانی در بیماران مشکوک به سل است.

مواد و روش‌ها: این مطالعه بر روی ۲۸۹۵ بیمار مراجعه کننده به مراکز آزمایشگاهی مختلف که مشکوک به سل بوده‌اند صورت گرفت و نمونه‌هایی که روی محیط کشت مثبت شدند با روش ارزیابی مقاومت دارویی بررسی و انجام توالی‌یابی روی ژن‌های مقاوم به دارو برای اخذ توالی و شناسایی جهش مربوطه در ژن‌های *katG*, *rpoB*, *rrsL*, *gyrA* صورت گرفت.

یافته‌ها: طی مدت مطالعه از تاریخ مهر ۱۳۹۷ تا اسفند ۱۴۰۰، ۲۸۹۵ نفر که در مجموع ۲۸۳ نمونه مثبت که ۶۰ نمونه مقاوم جدا گردید که موتاسیون‌های مربوطه در هر ژن براساس تغییرهای باز آلی روی ژن مربوطه مشخص گردید.

نتیجه‌گیری: با توجه به این که تشخیص بیماری سل علی‌الخصوص در مورد مایکو باکتریوم توبرکلوزیس زمان‌بر است و همچنین بعد از مثبت بودن نمونه انجام تست ارزیابی مقاومت طولانی است، شناسایی مولکولی و انجام توالی‌یابی و مشخص شدن جهش مربوطه روی ژن مربوطه دارو، امکان تشخیص دقیق بالا رفته و درمان به موقع را مهیا می‌سازد.

واژگان کلیدی: مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، مقاومت دارویی، بیماران سل، Iau Scienc

مقدمه

بیماری سل یکی از عفونت‌های دیرینه است که باعث بیماری جمعیت‌های مختلف در رده سنی مختلف در دوره‌های زمانی متفاوت حتی با یک عدد باسیل می‌تواند به حالت بیماری فعال

نویسنده مسئول:

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند.

پست الکترونیکی: saeedzaker20@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۸/۱۲

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۱۹

ریوی و یا غیر ریوی بروز نماید. نخستین بار ماهیت بیماری سل، به وسیله ویلمین در سال ۱۸۶۵ شناخته شد. او ثابت کرد که این بیماری، مسری بوده و اگر از ضایعات سل انسان به کبک یا خرگوش تزریق گردد، در حیوانات ایجاد بیماری می‌شود این بیماری که اولین بار فساد بافت نامیده شد، به عنوان بیماری مسری در بین اقوام مدیترانه در قرن ۱۶ شناخته گردید (۱،۲،۶). در قرن هجدهم و نوزدهم، یک اپیدمی سل در سراسر اروپا و آمریکای شمالی شیوع یافت. در آن زمان هنوز کخ ریشه میکروبی سل را کشف نکرده بود. به دنبال کشف کخ، تولید واکسن‌ها و درمان دارویی سل، کم کم دانشمندان به این

برنامه‌های سیاست‌گذاری کنترل سازمان بهداشت جهانی قرار دارد و برای کنترل آن در کشورهای جهان، به‌خصوص کشورهایی که شیوع بیماری به‌علت فقر غذایی بالاست از اهمیت بالایی برخوردار است و بودجه خاصی برای آن تعلق می‌گیرد (۵،۹،۱۱).

تشخیص به‌موقع و دقیق این باکتری از سال‌های طولانی قبل مورد اهمیت بوده است، چه‌بسا تشخیص به‌موقع در درمان صحیح بیماری سل در نجات حیات انسان‌ها از اهمیت بالایی برخوردار است. لذا متخصصین و دانشمندان در سالیان متمادی در این راه به روندهای تشخیصی مختلف با تنوع امکانات گام برداشته‌اند و توانسته‌اند از مرگ و میر انسانی تا حد مناسبی جلوگیری نمایند (۱،۳،۸،۱۲).

درمان بیماری سل از دیرباز در روند اهمیت مراکز بهداشتی و بیمارستانی چه به‌صورت سرپایی و بستری بوده است و آنتی-بیوتیک‌های روتین از گروه ریفامپین، ایزونیاژید و استرپتومایسین جهت درمان افراد مسلول در برنامه درمانی DOTS سازمان بهداشت جهانی بوده است.

مقاومت دارویی یک پدیده بیولوژیک است که در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از زمان کشف اولین داروی ضد سل یعنی استرپتومایسین مشاهده شده است. بسیاری از بیمارانی که استرپتومایسین به آن‌ها تزریق شده بود به مرز مرگ رسیده و در خلط آن‌ها باکتری به‌وضوح قابل مشاهده بود. با وجود ادامه درمان و دریافت دارو، دیری نگذشت که باسیل مقاوم به استرپتومایسین در آزمایشگاه جداسازی شد (۱۱،۱۲).

مدتی پس از کشف و استفاده از استرپتومایسین برای درمان سل در دهه ۴۰ میلادی، مشخص گردید که استفاده از یک دارو به سرعت منجر به ایجاد مقاومت دارویی و به تبع آن شکست درمان می‌شود (۵،۱۳). این موضوع باعث به‌کارگیری درمان ترکیبی، با استفاده از حداقل دو دارو، برای جلوگیری از ایجاد مقاومت گردید. برخلاف بسیاری از باکتری‌ها که مقاومت آنتی‌بیوتیکی به‌علت عناصر ژنتیکی متحرک نظیر پالسمید، ترانسپوزون و اینتگرون‌ها رخ می‌دهد در مایکوباکتریوم‌ها مقاومت دارویی پایه کروموزومی دارد و اغلب ناشی از موتاسیون‌هایی در ارتباط با ناحیه محدودی از ژنوم است. این مقاومت می‌تواند به نسل‌های بعدی باکتری منتقل شود و برنامه‌های کنترل و درمان سل را دچار اختلال کند (۳،۴،۷،۱۲).

نتیجه رسیدند که این بیماری ریشه‌کن شده است. سازمان ملل متحد پیش‌بینی کرد که می‌توان تا سال ۲۰۲۵ این بیماری را در سراسر جهان از بین برد. با این حال، در اواسط دهه ۱۹۸۰ تعداد بیش‌تری از مردم در سراسر جهان به بیماری سل مبتلا شدند تا جایی که در سال ۱۹۹۳ سازمان بهداشت جهانی اعلام کرد، سل در مرحله فوریت جهانی قرار گرفته است. این اولین بار بود که این سازمان بیماری‌ای را با این عنوان برچسب‌گذاری می‌کرد. توبرکلوزیس هنوز به‌عنوان یک معضل بهداشتی در دنیا مطرح است و کمابیش یک سوم از مردم دنیا به این باکتری آلوده است. تخمین زده می‌شود که بین سال‌های ۲۰۰۰ تا ۲۰۲۰ نزدیک به ۱ بیلیون به میکروب سل آلوده خواهند شد و ۲۰۰ میلیون از این جمعیت دچار بیماری شده و ۳۵ میلیون نفر در اثر این بیماری جان خود را از دست می‌دهند (۲،۳،۵،۷).

سالانه حدود ۲ میلیون نفر بر اثر ابتلا به این بیماری جان خود را از دست می‌دهند. عامل بیماری باکتری از گروه باسیل‌های میله‌ای به نام مایکوباکتریوم است که در دو گروه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و مایکوباکتریوم‌ای غیر توبرکلوزیس طبقه می‌گردند که نوع مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، انسان را به‌عنوان میزبان انتخاب و عامل بیماری سل می‌گردد و نوع غیر توبرکلوزیس به‌طور اتفاقی در انسان می‌تواند ایجاد بیماری نماید. مایکوباکتریوم‌ها، ارگانسیم‌های میله‌ای شکل، نازک و بدون تحرک متعلق به خانواده مایکوباکتریاسه و رده اکتینومیسیتال‌ها و کلاس اکتینومایسه هستند (۵،۶،۸) در حال حاضر تا ژانویه سال ۲۰۱۰ تعداد ۱۵۸ گونه مختلف در جنس مایکوباکتریوم شناسایی شده است (۱،۳،۹). این گونه‌ها طیف وسیعی از عفونت‌های موضعی تا بیماری‌های منتشر را در انسان و حیوانات ایجاد می‌کنند. اگرچه بعضی از گونه‌ها فقط در انسان عفونت ایجاد می‌کنند، سایر گونه‌ها از حیوانات گوناگونی جدا شده‌اند. هم‌چنین گونه‌های زیادی در آب و خاک یافت شده‌اند. این باکتری به‌خاطر ساختار ویژه ساختمانی، هم‌چنین شیوع دیرینه، گسترده‌گی بالا و تنوع زیر گونه، تکثیر طولانی مدت و خصوصیت‌های خاص در بین میلیون‌ها باکتری می‌توان اصطلاح پادشاه باکتری‌ها را برای آن به‌کار برد.

بیماری سل از دیر باز و عصر کهن تا به‌حال در زمره بیماری‌های آزار دهنده جمعیت‌های انسانی بوده و در مناطق جغرافیایی مختلف با گردش در بین جمعیت‌های انسانی باعث بیماری بوده و شیوع آن هم‌چنان بالاست و در ردیف اول

ادامه یافتن مقاومت دارویی سل یکی از خطرناک‌ترین و مهم‌ترین مسائلی است که کنترل جهانی این بیماری را با مشکل مواجه ساخته است. بیمارانی که با سویه‌های مقاوم به ایزونیازید و ریفامپیسین آلوده شده‌اند، که به‌عنوان سل مقاوم به چند دارو یا MDR شناخته می‌شوند، به‌طور عملی با خط نخست داروهای سل غیرقابل درمان هستند. در سال ۲۰۱۲، کمابیش ۴۵۰،۰۰۰ مورد جدید از سل MDR و ۱۷۰،۰۰۰ مورد مرگ ناشی از آن گزارش شده است. در مقیاس جهانی، سل MDR ۳/۸ درصد موارد جدید سل و ۲۰ درصد بیماران با سابقه درمان را شامل می‌گردد. بالاترین آمار سل MDR در کشورهای اروپای شرقی و آسیای میانه یافت می‌شود که سویه‌های مقاوم کمابیش به فراوانی انواع حساس به دارو وجود دارند. براساس گزارش سازمان بهداشت جهانی در سال ۲۰۱۳، در ایران حدود ۱۱-۶ درصد انواع سل MDR وجود دارد. در سال ۲۰۰۶، عبارت سل به‌شدت مقاوم یا XDR برای تعریف سویه‌های سل MDR که به فلوروکینولون‌ها و داروهای تزریقی خط دوم درمان مقاوم بودند، ابداع گردید. به‌طور تقریبی ۹/۶ درصد موارد سل MDR در سرتاسر جهان از نوع XDR هستند (۷،۱۳،۱۴).

روش‌های مختلفی تشخیص مایکوباکتریوم‌ها از روش مستقیم لام تا کشت و آنتی‌بیوگرام، روش‌های فنوتیپی همگی از روش‌هایی است که زمان‌بر بوده و امکان درمان سریع را پایین می‌آورد، لذا امکان بررسی تشخیص روش‌های مولکولی پیشرفته در بیمارانی که به داروهای رده اول و دوم مقاومت پیدا نموده‌اند از اهمیت بالایی برخوردار است. بررسی میکروسکوپی اسمیر خلط هنوز به‌عنوان اساس تشخیص بیماری سل در کشورهای در حال توسعه باقی‌مانده است. این روش به کیفیت و بار باکتری در خلط و آموزش صحیح تکنسین‌های آزمایشگاه وابسته است. حساسیت این روش پایین بوده و به‌طور معمول ۵۰٪ از موارد فعال بیماری سل را شناسایی می‌کند. کشت عامل بیماری سل بر روی محیط‌های جامد و مایع، نسبت به روش میکروسکوپی حساس‌تر است و اجازه بررسی حساسیت نسبت به داروها را نیز می‌دهد. هنگامی که یک گونه مایکوباکتریوم از نمونه‌های بالینی جداسازی می‌گردد، برای تشخیص قطعی باید گونه مورد شناسایی قرار گرفته و در صورت لزوم از لحاظ اپیدمیولوژیک مانند بررسی نحوه انتقال از یک بیمار به دیگری، عفونت جدید و یا عود بیماری مورد تجزیه و تحلیل مناسبی قرار گیرد. جداسازی و شناسایی دقیق گونه‌های بیماری‌زای مایکوباکتریوم از نمونه‌های بالینی مختلف فرآیندی بسیار طولانی، هزینه‌بر و

پیچیده است که علاوه بر نیاز به امکانات مناسب به افراد با تجربه در این زمینه نیازمند است (۸،۱۴).

لذا در نهایت با توجه به زمان‌بر بودن و مشکلات عدیده امکان به‌کارگیری روش‌های مولکولی در تشخیص بیماران و به‌خصوص بیمارانی که مقاوت دارویی دارند گامی مؤثر در درمان به‌موقع و کاهش مرگ و میر است. در این تحقیق بررسی و امکان به‌کارگیری روش تشخیص توالی‌یابی ژن مایکوباکتریوم در نمونه‌های مقاوم به دارو خط اول و دوم مورد ارزیابی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری از افراد مشکوک به سل مراجعه کننده به مراکز درمانی و نمونه‌های بالینی ارجاع شده به آزمایشگاه‌های (مسعود، اهواز، مرکزی تهران، زابل، گلستان) صورت گرفت که جهت بررسی‌های بیش‌تر تست‌های آنتی‌بیوگرام انجام شد. طی مدت مطالعه از تاریخ مهر ۱۳۹۶ تا اسفند ۱۳۹۹، ۲۸۹۵ نفر که در مجموع ۲۸۳ نمونه مثبت که ۶۰ نمونه مقاوم جدا گردید. برای نمونه‌ها رنگ‌آمیزی اسید فست انجام و روی محیط کشت لون اشتاین جانشون با روش پتروف کشت داده شدند.

تست آنتی‌بیوگرام

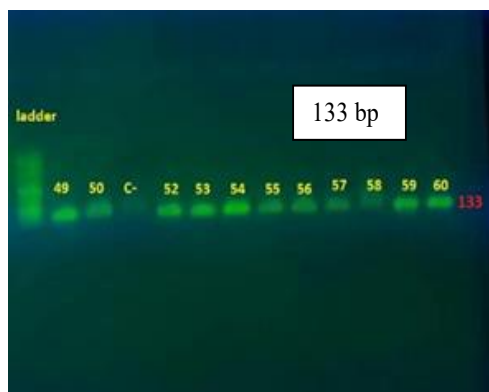
پس از آنکه باکتری‌ها در محیط لون اشتاین جانشون فاقد دارو کشت داده شدند و تست‌های افتراقی نیز انجام شد، ۲-۱ ماه بعد، تست آنتی‌بیوگرام برای باکتری‌های رشد نموده انجام می‌شود. این تست برای شناسایی وجود یا عدم وجود مقاومت دارویی و نیز نوع دارویی که نسبت به آن در باکتری توپر کلونیز مقاومت ایجاد شده است به کار می‌رود.

از محیط کشت‌هایی که باسیل روی آن رشد نموده بود به جهت بررسی حساسیت و مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها روی محیط دارویی رده اول (ریفامپین، ایزونیازید، استرپتومایسین، اتامیپوتول) و رده دوم دارویی (سیپروفلوکساسین، لووفلوکساسین، پارا آمینو سالیسیک اسید) کشت داده شدند. پس از ۶-۴ هفته محیط‌ها از لحاظ رشد باکتری‌ها بررسی گردیدند. نمونه‌هایی که در هر محیط حاوی دارو رشد نموده بودند و تعداد کلنی‌هایشان بیش از ۱ درصد تعداد کلنی‌های لوله‌های شاهد بود، نمونه‌های مقاوم به گزارش شدند.

استخراج DNA و انجام تست تأییدی مولکولی مایکوباکتریوم توپر کلونیز

کلیه ایزوله‌ها از نظر ژن IS6110 برای تأیید گونه‌های کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و افتراق از غیرتوبرکلوزیس همه انجام شد.

با کیت Roche انجام شد و سپس تأیید DNA های استخراج شده به وسیله نانودراپ و ژل الکتروفورز صورت گرفت. کلیه ایزوله‌ها از نظر ژن IS6110 برای تأیید گونه‌های کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و افتراق از غیرتوبرکلوزیس‌ها، مورد ارزیابی قرار گرفتند.



شکل ۱۰. مشاهده ژن IS6110 حاصل از PCR

katG R 5- gttgtccatttcgtcgagg-3

نحوه انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) جهت تکثیر ژن *gyrA*

یک بخش ۴۰۷bp از ژن *gyrA* را تکثیر می‌کند. برای بررسی و تکثیر مایکوباکتریوم از پرایمر ۲۰ بازی: یک قطعه 411bp از ژنوم مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در ژن *gyrA* را تکثیر می‌کند که توالی آن به صورت زیر است (۱۴).

gyrA F 5-acagacacgacgtgtccgcc-3

gyrA F 5-gtcgatttcctcagcatctcc-3

نحوه انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) جهت تکثیر ژن *rrs*

یک بخش ۵۱۶bp از ژن *rrs* را تکثیر می‌کند. برای بررسی و تکثیر مایکوباکتریوم از پرایمر ۲۰ بازی: یک قطعه 411bp از ژنوم مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در ژن *rrs* را تکثیر می‌کند که توالی آن به صورت زیر است.

Rrs F 5-gtccgagtggtgctcagg-3

rrs R 5-gtcaactcggaggaaggtgg-3

نتایج به دست آمده از PCR برای تشخیص ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک

نتایج PCR نشان می‌دهد که از ۶۰ نمونه جمع‌آوری شده ۵۴ نمونه مثبت (۹۰٪) از گروه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و ۶ نمونه منفی (۴۳٪) از گروه غیرتوبرکلوزیس گزارش شد. این ژن برای شناسایی دقیق کمپلکس TB روش مناسبی است.

انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) و توالی‌یابی ژن

نحوه انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) جهت تکثیر ژن *rpoB* برای انجام واکنش PCR به پرایمر نیاز است. برای بررسی و تکثیر مایکوباکتریوم از پرایمر ۲۰ بازی: یک قطعه 411bp از ژنوم مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در ژن *rpoB* را تکثیر می‌کند که توالی آن به صورت زیر است (۱۴):

rpoB- Forward: 5'-TACGGTCGGCGAGCTGATCC-3'

rpoB- Reverse: 5'-TACGGCGTTTCGATGAACC-3'

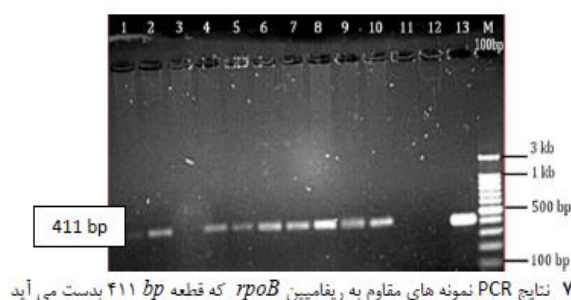
نحوه انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) جهت تکثیر ژن *KatG*

یک قطعه ۲۰۹bp از ژن *katG* را تکثیر می‌کند؛ که با برنامه زمانی و مواد مشخص شده قابل انجام می‌گردد و ژن مربوطه تکثیر می‌یابد. توالی طراحی شده برای تکثیر به این صورت است (۱۴):

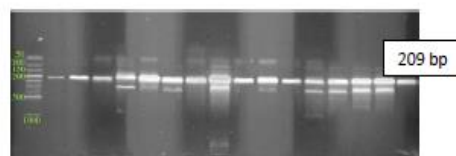
katG F 5-gaaacagcgcgctggtatcgt-3

الکتروفورز، محصول‌های تکثیر DNA، ژن‌های مقاوم به داروهای ضد سل در شکل ۲ نشان داده شده است.

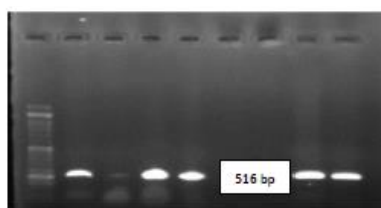
تمامی سویه‌های فنوتیپی *M. tuberculosis* به‌منظور شناسایی ژن‌های مقاوم مورد بررسی قرار گرفتند. برای این منظور از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز استفاده شد. نتایج



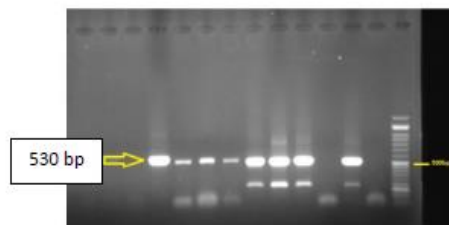
۷. نتایج PCR نمونه‌های مقاوم به ریفامپین *rpoB* که قطعه ۴۱۱ bp بدست می‌آید



نتایج PCR نمونه‌های مقاوم به ایزونیاژید که قطعه *KatG* ۲۰۹ بازی بدست می‌آید



تکثیر ژن *rrs* بر روی ژل که قطعه ۵۱۶bp بازی بدست می‌آید



تکثیر ژن *gyrA* بر روی ژل که قطعه ۵۳۰bp بازی بدست می‌آید

شکل ۲. نتایج الکتروفورز ژن‌های *rpoB*, *katG*, *rrs*, *gyrA*

در قطعه ۸۱ جفت باز طولانی ژن *rpoB* هستند که زیر واحد β RNA پلی‌مرز وابسته به DNA را کد می‌کند و در ناحیه کدکننده مقاومت به ریفامپیسین متمرکز می‌شود.

نتایج به‌دست آمده از توالی‌یابی ژن

ژن *rpoB*

مشخص شده است که ۱۲ عدد از ۵۴ نمونه از سویه‌های *M. tuberculosis* مقاوم به ریفامپین در معرض تغییرهای ژنتیکی

Codon	Nucleotide change	Amino acids Substitutions	Isolates
507	GGC→AGC	Gln→Ser	A1/3-6, A1/7-10, B2/4-6 C18/7-8, B5/6-7, B13/10 C17/1-2
521	CTG→TTG	Leu→Leu	B15/5, B13/1-5
523	GGG→GCG GGG→GGC GGG→GGA	Gly→Ala Gly→Gly Gly→Gly	C12/1-4, A2/4-6, C18/5-6

جدول ۱. فراوانی تغییرهای اسید آمینه و نوکلئوتید در کدون‌های مختلف سویه‌های *M. tuberculosis* ژن *rpoB* جدا شده از بیماران

آمد. جهش در ژن *katG* در کدون‌های زیر شناسایی شد: ۳۰۵، ۴۶۳، ۴۵۴، ۳۱۶، ۳۵۷، ۳۰۷، ۳۱۴، ۳۱۶، ۳۲۱، ۳۲۸، ۳۱۵، ۳۰۶ و ۳۰۹.

ژن *katG*

در سویه‌های مایکوباکتریوم مورد مطالعه ۲۷ عدد از ۵۴ نمونه از سویه‌های *M. tuberculosis* مقاوم به ایزونیاژید در معرض تغییرهای ژنتیکی در ژن *katG* کد کننده آنزیم کاتالاز پراکسیداز هستند و بیش‌ترین تغییرها در کدون ۳۱۵ (AGC→ACC) است. توالی‌یابی قطعه‌های ژن *katG* انجام شد. نتایج با کمک نرم‌افزار ALFwin DNAMAN به‌دست

Codon	Amount	Amino acid change	Nucleotide change	Isolate
1 Mutation				
315	11	Ser→ Thr	AGC→ACC	A1/2-1 A2/4-6 B2/1-3 B2/4-6 B13/1-5 C18/5-6
		Ser→ Asn	AGC→AAC	B4/1-6 D1/2-5 C12/1-4 C18/7-8
		Ser→ Gly	AGC→GGC	B15/4 B16/10
		Ser→ Arg	AGC→GGC	B16/8 B15/10
2 Mutations				
305,315	2	Gly→Ala, Ser→Thr	GGC→GCC, AGC→ACC	B5/8 B9/4-5
309,315	1	Gly→ Cys, Phe, Ala, Ser→ Thr	GGT→GTT, GTC, GCT, AGC→ACC	B13/10 C18/1-2
314,315	1	Thr→Asn, Ser→Thr	ACC→AAC, AGC→ACC	B22/1-4
311,315	1	Asn→Phe, Tyr, Ser→Thr	GAC→TTC, TA, AGC→ACC	B5/1-5 C17/1-2
315,316	1	Ser→ Thr, Arg, Gly→ Ser	AGC→ACC, AGG, GGC→AGC	C6/5
357,463	1	Asp→His, Arg→Leu	GAC→CAC, CGG→CTG	C6/9
357,454	1	Asp→ Asn, Glu→ Arg	GAC→AAC, GAG→CGA	C8/5-7
3 Mutations				
309,311, 315	1	Gly→ Ala, Asn→ Phe Ser→ Thr	GGT→GCT, GAC→TTC, AGC→ACC	B6/3-4
307,309, 315	1	Gly→Arg, Gly→Gly Ser →Thr	GGA→CGA, GGT→GGG AGC→ACC	D1/6-8
305,315, 321	1	Gly→ Ala, Ser→ Thr Trn→ Leu	GGC→ GCC, AGC→ ACC TGG→ TTG	B15/5

جدول ۲. فراوانی تغییرهای اسید آمینه و نوکلئوتید در کدون های مختلف سویه های *M. tuberculosis* ژن *katG* جدا شده از بیماران

ژن بودند، که موتاسیون ها مسبب ایجاد مقاومت به سیپروفلوکساسین بودند.

ژن *gyrA*

نتایج حاصل از سکانس ژن *gyrA* نشان داد که ۲۸ عدد از ۵۴ نمونه از سویه های *M. tuberculosis* دارای موتاسیون در این

POINT MUTATION	Amount	Amino acid substitution	isolates
G284C	11	S95T	A2/4-6, B2/1-3, B2/4-6 B5/9, B3/1-4, B5/6-7 B15/4, B9/1-3, B9/4-5 B15/5, B13/7
G61C	6	E21Q	B6/3-4, D1/9-10, B12/7, B12/5-6, B12/3-4, B11/7-8
A281G	2	387	B15/7, B13/1-5
G262T	3	-	B15/9, B15/8 B6/1-2
C84A	1	-	B15/10
T107A	1	D36Y	B16/8
G109C	1	-	B16/10
G118C	1	-	B13/8
A55G	1	-	C1/3-4
C57A	1	-	B5/1-5

جدول ۳. فراوانی تغییرات اسید آمینه و نوکلئوتید در کدون های مختلف سویه های *M. tuberculosis* ژن *gyrA* جدا شده از بیماران

در این ژن بودند، که برخی از موتاسیون ها مسبب ایجاد مقاومت به کانامایسین بودند.

ژن *rrs*

نتایج حاصل از سکانس ژن *rrs* نشان داد که ۲۵ عدد از ۵۴۰ نمونه از سویه های *M. tuberculosis* دارای موتاسیون

POINT MUTATION	Amount	Isolates
G1260A	4	C8/5-7, B6/1-2 C11/1-5, C17/1-2
A1278T	3	C17/3-4, D1/6-8 B22/1-4
A1279T	3	B13/10, B16/10 B16/8
C1300T	3	B15/10, B13/1-5 B12/7
G1321A	3	B12/5-6, B12/3-4 B15/5
C1445T	3	B9/4-5, B9/1-3, B15/4
G1167A	1	C12/1-4
A1401G	2	D1/2-5, B2/7-9
T1181A	1	B2/4-6
G1282A	1	B2/1-3
C1381T	1	A1/7-10

جدول ۴. جدایه های مختلف سویه های *M. tuberculosis* ژن *rrs* جدا شده از بیماران

بحث و نتیجه گیری

با توجه به این که اهمیت درمان بیماری سل و برنامه ریزی کنترل شیوع این بیماری از اولویت های برنامه های مراکز بهداشت در کشورها است، لذا شناسایی به موقع و دقیق بیماران به جهت درمان سریع از اهمیت بالایی برخوردار است. میکوباکتریوم توبرکلوزیس از باکتری هایی است که دیر رشد و با توجه به این امکان تطابق برای حیات در این باکتری بالاست و هم چنین ساختار ژنتیکی این باکتری طوری است که در مقابله با آنتی بیوتیک ها امکان ایجاد مقاومت بالایی دارد و حتی در صورت آسیب رسیدن به ژن های زیستی امکان جبران فعالیت برای این ژن های خانه نگه دار با ژن های دیگر در این باکتری بالاست و امکان ادامه حیات در جوار آنتی بیوتیک ها برای این باسیل بالاتر می رود و شاید همین یک دلیل محکم برای این باشد که قرن هاست گرفتاری به این بیماری معطل جدی است و نام پادشاه باکتری زینده مناسبی است که میکروبیولوژیست ها به مایکو باکتریوم داده اند.

همان طور که می دانیم داروهای درمانی برای بیماری سل براساس برنامه DOTS در خط اول درمان با ریفامپین و ایزونیازید شروع و با اتامبیوتول و استرپتوماکسین ادامه می یابد و در صورت استفاده نادرست از آنتی بیوتیک و هم چنین عوامل مختلف دیگر امکان به وجود آمدن مقاومت آنتی بیوتیکی بالا می رود و در این صورت باکتری با ایجاد جهش در ژن مربوطه و یا عوامل دیگر سلولی مقاومت به آنتی بیوتیک پیدا می نماید. در این گونه موارد استفاده از خط دوم داروهای درمانی در درمان مورد بهره برداری قرار می گیرد.

لذا تشخیص به موقع و دقیق مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به جهت درمان به موقع برای پزشکان و بیماران و همچنین مراکز بهداشتی بسیار مهم است.

امروزه در مراکز تشخیصی آزمایشگاهی مایکوباکتریوم ها و گونه های آن، استاندارد روش تشخیصی به این صورت است:

- ۱- گسترش لام ۲- کشت ۳- آنتی بیوگرام ۴- تست های فنوتیپی ۵- تست های مولکولی و ژنومیکس ۶- پروتئومیکس ۷- لیپیدومیکس (در حال فعال سازی)

به طور کلی در سیستم های بهداشتی کشورهای در حال توسعه و فقیر که به طور عمده بیماری سل در آن ها معضل بزرگی بوده و اندمیک است، تشخیص سل براساس علائم بالینی و در غالب موارد بررسی خلط بیمار از لحاظ حضور باسیل اسید فست (AFB) در رنگ آمیزی زیل نلسون است (۹،۱۳). در ایران نیز براساس دستورالعمل های موجود بیمار دارای علائم بالینی و اسمیر مثبت در برنامه مبارزه با سل وارد شده و درمان دارویی ضد سل شروع می گردد. به دلیل این که رنگ آمیزی اسید فست برای *M. tuberculosis* غیراختصاصی است (انواع مایکوباکتریوم های غیرسل نیز اسید فست هستند) و در موارد زیادی علائم کلینیکی و هم چنین یافته های رادیولوژیک بیماری سل با بیماری های ناشی از انواع غیرسل مشابقت بالایی دارد، بیماران دارای عفونت با گروه اخیر مایکوباکتریوم به اشتباه تحت درمان سل قرار می گیرند. هم چنین براساس تحقیقی که به تازگی روی حساسیت دارویی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس های اسمیر منفی صورت گرفته و نشان داده که برخی از مایکوباکتریوم توبرکلوزیس های اسمیر منفی دارای کشت مثبت هستند و در برخی از آن ها مقاومت دارویی هم دیده شده است

(۱۰۱۴). این به آن معناست که این بیماران مبتلا به سل هرچند که دارای اسمیر منفی هستند ولی اگر کشت این باکتری‌ها صورت می‌گرفت می‌توانست دارای سویه‌های مقاوم به دارو نیز باشد. در مواردی نیز نمونه‌ها کشت داده می‌شوند که بعد از مثبت شدن نمونه کشت، تعدادی زیادی از آزمایشگاه‌ها به دلیل فقدان دانش فنی و یا امکانات قادر به تعیین هویت اولیه ایزوله‌ها حتی براساس روش‌های ساده فنوتیپیک نیستند و چون بیماری سل غالب است، ایزوله جدا شده را *M. tuberculosis* در نظر می‌گیرند.

البته در آزمایشگاه‌هایی نیز شناسایی ایزوله‌های *M. tuberculosis* انجام شده و تعیین حساسیت دارویی نیز تعیین می‌گردد. ولی آنچه که مسلم است در مناطقی که تنها براساس نتیجه لام میکروسکوپی و یا علائم بالینی بیماری سل تشخیص و درمان داده می‌شود و یا در آزمایشگاه‌هایی که ایزوله‌های میکوباکتریومی جدا می‌شوند ولیکن به هر دلیلی تعیین هویت نمی‌شوند و یا این که ایزوله‌ها تعیین هویت می‌شوند ولیکن انواع غیرسلی میکوباکتریوم تعیین هویت نمی‌گردند و یا به آن اهمیت داده نمی‌شود، بیماران تحت درمان داروهای ضد سلی قرار می‌گیرند (۳، ۱۴). شناسایی گونه‌های مختلف میکوباکتریوم شامل *M. tuberculosis* و انواع غیرسلی براساس روش‌های مرسوم میکروبیولوژیک مبتنی بر ویژگی‌های فنوتیپیک یعنی استفاده از مروفولوژی کلنی، سرعت رشد، تولید پیگمان و انجام تست‌های متنوع آنزیماتیک و بیوشیمیایی است. به‌طور اصولی تعداد تست‌های بیوشیمیایی به ماهیت میکوباکتریوم مورد بررسی و فعالیت آنزیمی آن گونه بستگی دارد. بر این اساس گونه‌هایی که از لحاظ بیوشیمیایی فعالیت بالایی دارند با حداقل تست‌های بیوشیمیایی قابل دسته‌بندی و شناسایی هستند در حالی که گونه‌هایی که از لحاظ بیوشیمیایی فاقد فعالیت بوده یا کم‌تر فعال هستند نیاز به تعداد بیشتری از تست‌ها برای شناسایی هستند. همه محققین بر این اعتقاد هستند که تست‌های بیوشیمیایی علاوه بر هزینه‌بر بودن و نیاز به زمان طولانی، فاقد توانایی لازم در زمینه شناسایی کامل گونه‌های میکوباکتریوم هستند. این امر به‌ویژه زمانی اهمیت بالایی پیدا می‌کند که گونه‌های میکوباکتریوم به‌سرعت در حال افزایش هستند.

با توجه به دلایل مطرح شده که در مقالات و رفرنس‌های معتبر برای تشخیص میکوباکتریوم است در جمع‌بندی جداسازی میکوباکتریوم توپر کلوزیس از غیر توپر کلوزیس مهم است.

اهمیت روش‌های تشخیصی مولکولی بر پایه DNA برای شناسایی به‌موقع و هم‌چنین دقیق و در ضمن جداسازی ژنوتایپ‌های میکوباکتری به‌لحاظ گونه میکوباکتریوم توپر کلوزیس از غیر توپر کلوزیس برای مراکز درمانی و هم‌چنین پزشکان به‌جهت انجام درمان صحیح حائز اهمیت است. در مقالات گوناگون و گزارشات علمی از مراکز بیمارستانی ایران و جهان این موضوع که جایگاه تشخیص مولکولی برای بیماری سل تأکید فراوانی شده است. در این راستا نیز با تپلنجام روش تشخیصی مولکولی امکان هم‌زمان شناسایی مقاومت آنتی-بیوتیکی مهیا می‌گردد. در این تحقیق هم براساس شناسایی ژن‌های مربوطه به مقاومت آنتی-بیوتیکی از قبیل: *rpoB* ژن مرتبط با مقاومت به ریفامپین و گروه ریفامپیسین، *katG* ژن کنترل کننده آنتی-بیوتیک ایزونیاژید و *gyrA* و *rfs* ژن کنترلی برای آنتی-بیوتیک سیپروفلوکساسین و کانامایسین انجام تست مولکولی و توالی‌یابی براساس روش سنجر صورت گرفت. در این مطالعه با توجه به انجام روش آنتی-بیوگرام برای آنتی-بیوتیک‌های رده اول و دوم و جداسازی نمونه‌های مقاوم به آنتی-بیوتیک و انجام روش توالی‌یابی، جهش‌های مربوطه که باعث ایجاد مقاومت بودند، به‌دست آمد که در مقایسه با مطالعه‌های دیگر تأییدیه‌ای بر انجام کار شد.

در مقایسه روش‌های مولکولی PCR و شناسایی کلی میکوباکتریوم‌ها (سلی و غیرسلی) براساس توالی ژن *16SrRNA* به‌عنوان "استاندارد" در نظر گرفته می‌شود، زیرا در هر پروکاریوت وجود دارد و امکان بازسازی یک فیلوژنی جهانی را فراهم می‌کند. از نظر هزینه و زمان مطلوب نیست. بیزی و همکاران (۲۰۱۱) ادعا کرد که با احتساب هزینه مواد مصرفی، حقوق، و استهلاک دستگاه، شناسایی یک ایزوله باکتریایی توسط توالی‌یابی *16S rRNA* به‌طور تقریبی ۱۰۰ دلار آمریکا در آزمایشگاه آن‌ها هزینه داشت و نتایج پس از ۴۸ ساعت در دسترس بود.

لیکن دانشمندان مختلف برای تأییدیه مقاومت به آنتی-بیوتیک-ها مبادرت به شناسایی ارتباط هر ژن با آنتی-بیوتیک مربوطه نمودند و گزارش‌های مختلف داده شده است.

با این حال، اکثر روش‌های انگشت نگاری DNA از نظر فیلوژنتیکی هم‌بستگی ندارند و هیچ اطلاعاتی در مورد رابطه تکاملی بین گونه‌های مختلف ارائه نمی‌دهند. تکنیک‌های ژنومی مانند پلی‌مورفیسم طول قطعه تقویت‌شده (AFLP)، الکتروفورز ژل میدان پالسی (PFGE) و تایپینگ توالی چند

جایگاهی (MLST) برای زیرگروه بندی باکتری ها برای اهداف اپیدمیولوژیک استفاده می شوند. اگرچه تعیین توالی rDNA ۱۶S برای اختصاص جنس یا گونه به یک جدایه کافی است، در بیش تر موارد برای تایپ سازی دقیق، به عنوان مثال، مطالعه های اپیدمیولوژیک کافی نیست. PFGE را می توان برای تایپ با وضوح بالا استفاده کرد.

اما به طور کلی برای اختصاص جنس یا گونه به میکروارگانیسم ها نامناسب است ولیکن شناسایی دقیق مایکوباکتریوم مقاوم به آنتی بیوتیک به جهت بیماریابی می تواند از به کارگیری این روش های مولکولی و توالی یابی بهره بگیرد.

پیشرفت ها در روش های مولکولی، شناسایی ارزان، سریع و قابل اعتماد بسیاری از گونه های مایکوباکتریوم را با ابزارهای مولکولی تسهیل کرده است (کوک و همکاران، ۲۰۰۳؛ دیولدر و همکاران، ۲۰۰۵؛ هانس و همکاران، ۱۹۸۹؛ روسو و همکاران، ۲۰۰۶). البته لازم است محققین و پزشکان بدانند که محدودیت هایی در روش های مولکولی وجود دارد که دانستن آن ها بسیار مناسب است. روش های تشخیصی مولکولی تجاری تنها می توانند تعداد محدودی از مکان های جهش را شناسایی کنند. برای مثال، GeneXpert MTB/RIF (Cepheid) فقط جهش های *mpoB* مرتبط با مقاومت ریفامپین را تشخیص می دهد. GenoType MTBDRplus (Hain Lifescience) فقط می تواند جهش در ژن های مرتبط با مقاومت به ریفامپین (*rpoB*) و ایزونیازید (*inhA* و *katG*) را تشخیص دهد. Xpert MTB/XDR (Cepheid) می تواند برای تشخیص مقاومت به ایزونیازید، فلوروکینولون ها، اتیونامید، آمیکاسین، کانامایسین و کاپرومایسین در بزرگسالان با نتایج مثبت برای MTB در Xpert MTB/RIF یا Ultra (Cepheid) استفاده شود. با این حال، این کیت ها مقاومت ناهمگن را تشخیص نمی دهند و مترادف ها یا جهش های خاموش نیز ممکن است به اشتباه به عنوان مقاومت گزارش شوند. با توسعه فناوری توالی یابی، توالی یابی DNA به طور گسترده ای در مطالعه مقاومت دارویی MTB مورد استفاده قرار گرفته است که می تواند اطلاعات دقیقی در مورد چندین ژن مقاوم به دارو ارائه دهد. با این حال، محدودیت های زیادی در سنجش توالی وجود دارد، مانند توان عملیاتی کم توالی یابی Sanger، هزینه بالا و الزامات بالاتر برای تفسیر نتایج توالی یابی نسل بعدی (۱۴۵).

لیکن در این مطالعه با توجه به شناسایی آنتی بیوتیک های مختلف در رده اول و دوم درمان و همچنین جداسازی گونه-

های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از غیرتوبرکلوزیس در مقاومت به هر آنتی بیوتیک، جهش مربوطه در ارتباط با مقاومت مشخص شد که در اختصاصیت مناسب برای شناسایی دقیق بیماری سل و همزمان شناسایی نوع مقاومت بسیار دقیق مشخص شد. نتایج به دست آمده نمایاگر این خواهد بود که در زمان بسیار کم امکان تشخیص بیماری سل و نوع مقاومت آنتی بیوتیک میسر است که این موضوع در درمان صحیح و به موقع و همچنین ارائه برنامه کنترلی مناسب توسط مراکز بهداشتی مناسب است. چه بسا سیاست گذاری برنامه پیشگیری سل با انجام روش های دقیق تشخیصی و بیماریابی به موقع در انجام برنامه ریزی دقیق براساس جمعیت ها و نقاط جغرافیایی بهتر میسر می گردد.

1. Bull T.J. and Shanson D.C. (1992) Rapid misdiagnosis by *Mycobacterium avium* intracellulare masquerading as tuberculosis PCR/DNA probe tests. *The Lancet*. 340(8831):1360.
2. Salfinger M. and Pfyffer G.E. (1994) The new diagnostic mycobacteriology laboratory . *European Journal of Clinical Mycobacteriology and Infections diseases*. 13:961-979.
3. Moström, P., M. Gordon, C. Sola, M. Ridell, and N. Rastogi. 2002. A survey of methods used in molecular epidemiology of tuberculosis. *Clin. Microbiol. Infect.* 8:694-704.
4. Kohn (1986) Application of DNA probe test to the diagnosis of infection disease. *Am. Clin. Products. Rev.* 20-29.
5. Gandhi NR, Nunn P, Dheda K, Schaaf HS, Zignol M, van Soolingen D, et al. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a threat to global control of tuberculosis. *Lancet* (London, England). 2010;375(9728):1830-43.
6. Y. Zhang,* W. W. Yew † , Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. 2009.
7. Seifert M, Catanzaro D, Catanzaro A, Rodwell TC. Genetic mutations associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review. *PloS one*. 2015;10(3):e0119628-e.
8. Hazbon MH, Brimacombe M, Bobadilla del Valle M, Cavatore M, Guerrero MI, Varma-Basil M, et al. Population genetics study of isoniazid resistance mutations and evolution of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2006;50(8):2640-9.
9. Ramaswamy SV, Dou SJ, Rendon A, Yang Z, Cave MD, et al. (2004) Genotypic analysis of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Monterrey, Mexico. *J Med Microbiol* 53: 107-113.
- 10 Brandis G, Wrande M, Liljas L, Hughes D. Fitness compensatory mutations in rifampicin-resistant RNA polymerase. *Molecular microbiology*. 2012;85(1):142-51. [DOI:10.1111/j.1365-2958.2012.08099.x] [PMID]
11. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Matter L, Schopfer K, Bodmer T, et al. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *The Lancet*. 1993;341(8846):647-51.
12. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*. 1998;393(6685):537-44.
13. Grosset J. The sterilizing value of rifampicin and pyrazinamide in experimental short-course chemotherapy. *Bulletin of the International Union against Tuberculosis*. 1978;53(1):5.
14. Saeed Zaker Bostanabad et al, Identification of mutations in the *rpoB* encoding the RNA polymerase beta subunit in rifampicine-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from Iran.