NCMBJ
Research article

New Cell Mol Biotech
j.13/49 , 2023

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 Montazeri[1], Abbas Akhavansepahy[1],Alireza Ghasempour[2], Ahmad Majd[1], Saeed Zaker Bostan Abad[3]

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

مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی مولکولی
دوره ۱۳ - شماره۴۹ - زمستان ۱۴۰۱
NCMBJ
مقاله پژوهشی

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 سپهی[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 واحدپرند. تهران. ایران

سابقه و هدف :تشخیص بیماری سل مقاوم به دارو با توجه‌به اهمیت کنترل بیماری سل از ارزش بالایی برخوردار است. شناسایی و معرفی روش تشخیصی سریع و اختصاصی برای عامل بیماری سل، مایکوباکتریوم تبوبر کلوزیس دارای اهمیت بسزایی است. هدف از این مطالعه تشخیص مولکولی وجود *مایکوباکتریوم* تربرکلوزیس مقاوم به دارو های 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 مقاوم‌به دارو برای اخذ توالی و شناسایی جهش مربوطه در ژن‌های *katG, rpoB, rrsL, gyrA* صورت گرفت.

یافته ها :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 توجه‌به 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 به‌موقع را مهیا می‌سازد.

واژگان کلیدی: مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، مقاومت دارویی، بیماران سلی، 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 ریوی و یا غیر ریوی بروز نماید. نخستین بار ماهیت بیماری سل، به‌وسیله 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، به‌عنوان 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. به‌دنبال کشف کخ، تولید واکسن‌ها و درمان دارویی سل، کم‌کم دانشمندان به این

نویسنده مسئول:
گروه زیست شناسی. دانشکده علوم زیستی. دانشگاه آزاد اسلامی واحدپرند.
پست الکترونیکی : saeedzaker20@yahoo.com
تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۸/۱۲
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۱۹

نتیجه رسیدند که این بیماری ریشه‌کن شده است. سازمان ملل متحد پیش‌بینی کرد که می‌توان تا سال ۲۰۲۵ این بیماری را در سراسر جهان ازبین برد. بااین‌حال، 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 می-گردند که نوع مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، انسان را به‌عنوان میزبان انتخاب و عامل بماری سل می‌گردد و نوع غیر توبرکلوزیس به‌طور اتفاقی در انسان می‌تواند ایجاد بیماری نماید. مایکوباکتریوم‌ها، ارگانیسم‌های میله‌ای شکل، نازک و بدون تحرک متعلق‌به خانواده مایکوباکتریاسه و رده اکتینومیستال‌ها 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، گستردگی 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 بیماری-های 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 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، ایزونیازید 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 مقاوم‌به 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).

ادامه یافتن مقاومت دارویی سل یکی از خطیرترین 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 مقاوم‌به 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 سویه-های 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 سویه-های 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 روش-هایی است که زمان‌بر بوده و امکان درمان سریع را پایین می-آورد، 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، نسبت‌به روش میکروسکوپی حساس‌تر است و اجازه بررسی حساسیت نسبت‌به داروها را نیز می‌دهد. هنگامی‌که 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 علاوه‌بر 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 به-خصوص بیمارانی که مقاوت دارویی دارند گامی مؤثر در درمان به‌موقع و کاهش مرگ ومیر است. در این تحقیق بررسی و امکان به‌کارگیری روش تشخیص توالی‌یابی ژن مایکوباکتریوم در نمونه‌های مقاوم‌به 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 آنت‌بیوگرام 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 جانسون با روش پتروف کشت داده شدند.

تست آنتی‌بیوگرام

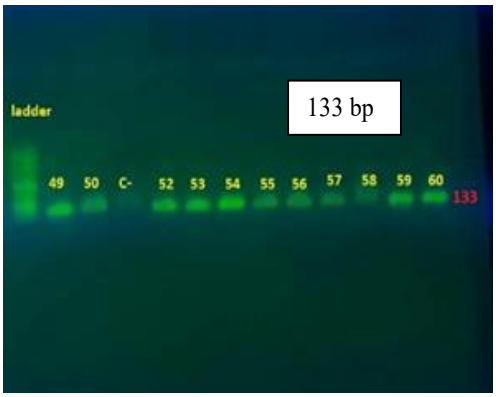
پس از آنکه باکتری‌ها در محیط لون اشتاین جانسون فاقد دارو کشت داده شدند و تست‌های افتراقی نیز انجام شد، ۲-۱ ماه بعد، تست آنتی‌بیوگرام برای باکتری‌های رشد نموده انجام می-شود. این تست برای شناسایی وجود یا عدم وجود مقاومت دارویی و نیز نوع دارویی که نسبت‌به آن در باکتری توبرکلوزیس مقاومت ایجاد شده است به‌کار می‌رود.

از محیط کشت‌هایی که باسیل روی آن رشد نموده بود به‌جهت بررسی حساسیت و مقاومت‌به آنتی‌بیوتیک‌ها روی محیط دارویی رده اول (ریفامپین، ایزونیازید، استرپتومایسین، اتامبیوتول) و رده دوم دارویی (سیپروفلوکساسین، لووفلوکساسین، پارا آمینو سالسیلیک 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 مقاوم‌به گزارش شدند.

استخراج DNA و انجام تست تأییدی مولکولی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس

با کیت Roche انجام شد و سپس تأیید DNA های استخراج شده به‌وسیله 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.

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



شکل ۱. مشاهده ژن IS6110 حاصل از PCR

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 به‌صورت 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 I; 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-gaaacagcggcgctggatcgt-3

katG R 5- gttgtcccatttcgtcgggg-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 به‌صورت زیر است (۱۴).

gyrA F 5-acagacacgacgttgccgcc-3

gyrA F 5-gtcgatttccctcagcatctcc-3

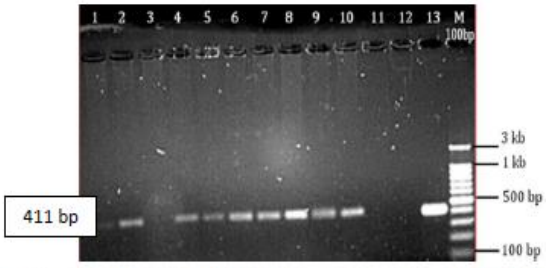
نحوه انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) جهت تکثیر ژن *rrs*

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 به‌صورت زیر است.

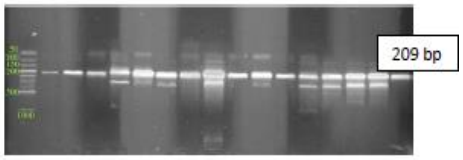
Rrs F 5-gtccgagtgttgcctcagg-3
rrs R 5-gtcaactcggaggaaggtgg-3

نتایج به‌دست آمده از PCR برای تشخیص ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک

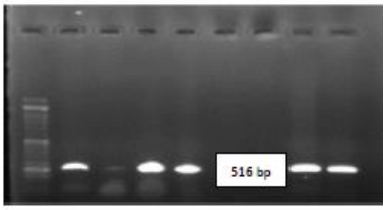
تمامی سویه‌های فنوتیپی *M. tuberculosis* به‌منظور شناسایی ژن‌های مقاوم مورد بررسی قرار گرفتند. برای این منظور از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز استفاده شد. نتایج الکتروفورز، محصول‌های تکثیر DNA، ژن‌های مقاوم‌به داروهای ضد سل در شکل ۲ نشان داده شده است.



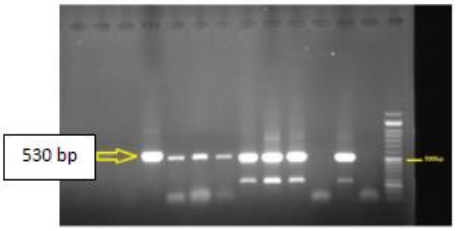
۷ نتایج PCR نمونه های مقاوم به ریفامپین *rpoB* که قطعه ۴۱۱ *bp* بدست می آید



نتایج PCR نمونه های مقاوم به ایزونیازید که قطعه *KatG* ۲۰۹ بازی بدست می آید



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



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

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

نتایج به‌دست آمده از توالی‌یابی ژن

ژن *rpoB*

مشخص شده است که ۱۲ عدد از ۵۴ نمونه از سویه‌های *M. tuberculosis* مقاوم‌به ریفامپین در معرض تغییرهای ژنتیکی در قطعه ۸۱ جفت باز طولانی ژن *rpoB* هستند که زیرواحد ß RNA پلی‌مراز وابسته به DNA را کد می‌کند و در ناحیه کدکننده مقاومت‌به ریفامپیسین متمرکز می‌شود.

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	Leo→Leo	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

ژن *katG*

در سویه‌های مایکوباکتریوم مورد مطالعه ۲۷ عدد از ۵۴ نمونه از سویه‌های *M. tuberculosis* مقاوم‌به ایزونیازید 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 آمد. جهش در ژن *katG* در کدون‌های زیر شناسایی شد: ۳۰۵، ۳۰۶، ۳۰۷،۳۱۴،۳۱۶،۳۲۱،۳۲۸،۳۱۵، ۳۱۶،۳۵۷، ۴۵۴، ۴۶۳ و ۳۰۹.

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 Trp→ Leu	GGC→ GCC, AGC→ ACC TGG→ TTG	B15/5

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

ژن *gyrA*

نتایج حاصل از سکانس ژن *gyrA* نشان داد که ۲۸ عدد از ۵۴ نمونه از سویه‌های *M. tuberculosis* دارای موتاسیون در این ژن بودند، که موتاسیون‌ها مسبب ایجاد مقاومت‌به سیپروفلوکساسین بودند.

POINT MUTATION	Amount	Amino acid substitiosion	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 کدون‌های مختلف سویه‌های *M. tuberculosis* ژن *gyrA* جدا شده از بیماران

ژن rrs

نتایج حاصل از سکانس ژن *rrs* نشان داد که ۲۵ عدد از ۵۴۰ نمونه از سویه‌های *M. tuberculosis* دارای موتاسیون در این ژن بودند، که برخی از موتاسیون‌ها مسبب ایجاد مقاومت‌به کانامایسین بودند.

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. جدایه‌های مختلف سویه‌های *M. tuberculosis* ژن *rrs* جدا شده از بیماران

بحث و نتیجه‌گیری

با توجه‌به این که اهمیت درمان بیماری سل و برنامه‌ریزی کنترل شیوع این بیماری از اولویت‌های برنامه‌های مراکز بهداشت در کشورها است، لذا شناسایی به‌موقع و دقیق بیماران به‌جهت درمان سریع از اهمیت بالایی برخوردار است. مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از باکتری‌هایی لست که دیر رشد و با توجه‌به این امکان تطابق برای حیات در این باکتری بالاست و هم‌چنین ساختار ژنتیکی این باکتری طوری است که در مقابله با آنتی‌بیوتیک‌ها امکان ایجاد مقاومت بالایی دارد و حتی در صورت آسیب رسیدن به ژن‌های زیستی امکان جبران فعالیت برای این ژن‌های خانه نگه دار با ژن‌های دیگر در این باکتری بالاست و امکان ادامه حیات در جوار آنتی‌بیوتیک‌ها برای این باسیل بالاتر می‌رود و شاید همین یک دلیل محکم برای این باشد که قرن‌هاست گرفتاری به این بیماری معظل جدی است و نام پادشاه باکتری زیبنده مناسبی است که میکروبیولوژیست-ها به مایکو باکتریوم داده‌اند.

همان‌طور که می‌دانیم داروهای درمانی برای بیماری سل براساس برنامه DOTS در خط اول درمان با ریفامپین و ایزونیازید شروع و با اتامبیوتول و استرپتومایسین ادامه می‌یابد و در صورت استفاده نادرست از آنتی‌بیوتیک و هم‌چنین عوامل مختلف دیگر امکان به‌وجود آمدن مقاومت آنتی‌بیوتیکی بالا می‌رود و در این صورت باکتری با ایجاد جهش در ژن مربوطه و یا عوامل دیگر سلولی مقاومت به آنتی‌بیوتیک پیدا می‌نماید. در این گونه موارد استفاده از خط دوم داروهای درمانی در درمان مورد بهره‌برداری قرار می‌گیرد.

لذا تشخیص به‌موقع و دقیق مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به‌جهت درمان به‌موقع برای پزشکان و بیماران و هم‌چنین مراکز بهداشتی بسیار مهم است.

امروزه در مراکز تشخیصی آزمایشگاهی مایکوباکتریوم‌ها و گونه‌های آن، استاندارد روش تشخیصی به این صورت است:
۱- گسترش لام ۲- کشت ۳- آنتی بیوگرام ۴- تست‌های فنوتیپی ۵- تست‌های مولکولی و ژنومیکس ۶- پروتئومیکس ۷- لیپیدومیکس(در حال فعال سازی)

به‌طور کلی در سیستم‌های بهداشتی کشورهای در حال توسعه و فقیر که به‌طور عمده بیماری سل در آن‌ها 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 رنگ‌آمیزی زیل نلسون است (۹،۱۳). در ایران نیز براساس دستورالعمل‌های موجود بیمار دارای علائم بالینی و اسمیر مثبت در برنامه مبارزه با سل وارد شده و درمان دارویی ضد سل شروع می‌گردد. به‌دلیل این‌که رنگ‌آمیزی اسید فست برای *M. tuberculosis* غیراختصاصی است (انواع مایکوباکتریوم‌های غیرسلی نیز اسید فست هستند) و در موارد زیادی علائم کلینیکی و هم‌چنین یافته‌های رادیولوژیک بیماری سل با بیماری‌های ناشی از انواع غیرسلی مشابهت بالایی دارد، بیماران دارای عفونت با گروه اخیر مایکوباکتریوم به اشتباه تحت درمان سل قرار می‌گیرند. هم‌چنین براساس تحقیقی که به‌تازگی روی حساسیت دارویی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس‌های اسمیر منفی صورت گرفته و نشان داده که برخی از مایکوباکتریوم توبرکلوزیس‌های اسمیر منفی دارای کشت مثبت هستند و در برخی از آن‌ها مقاومت دارویی هم دیده شده است

(۱،۱۴). 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 مقاوم‌به دارو نیز باشد. در مواردی نیز نمونه‌ها کشت داده می‌شوند که بعد از مثبت شدن نمونه کشت، تعدادی زیادی از آزمایشگاه‌ها به‌دلیل 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 مایکوباکتریومی جدا می‌شوند ولیکن به‌هر دلیلی تعیین هویت نمی‌شوند و یا این‌که ایزوله‌ها تعیین هویت می‌شوند ولیکن انواع غیرسلی مایکوباکتریوم تعیین هویت نمی‌گردند و یا به آن اهمیت داده نمی‌شود، بیماران تحت درمان داروهای ضد سلی قرار می‌گیرند (۳،۱۴). شناسایی گونه‌های مختلف مایکوباکتریوم شامل *M. tuberculosis* و انواع غیرسلی براساس روش‌های مرسوم میکروبیولوژیک مبتنی‌بر 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 مایکوباکتریوم مورد بررسی و فعالیت آنزیمی آن گونه بستگی دارد. بر این اساس گونه‌هایی که از لحاظ بیوشمیایی فعالیت بالایی دارند با حداقل تست‌های بیوشیمیایی قابل دسته‌بندی و شناسایی هستند در حالی‌که 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 علاوه‌بر هزینه‌بر بودن و نیاز به زمان طولانی، فاقد توانایی لازم در زمینه شناسایی کامل گونه‌های مایکوباکتریوم هستند. این امر به‌ویژه زمانی اهمیت بالایی پیدا می‌کند که گونه‌های مایکوباکتریوم به‌سرعت در حال افزایش هستند.

با توجه‌به دلایل مطرح شده که در مقالات و رفرنس‌های معتبر برای تشخیص مایکوباکتریوم است در جمع‌بندی جداسازی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از غیرتوبرکلوزیس مهم است.

اهمیت روش‌های تشخیصی مولکولی بر پایه DNA برای شناسایی به‌موقع و هم‌چنین دقیق و در ضمن جداسازی ژنوتایپ‌های مایکوباکتری به‌لحاظ گونه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از غیر توبرکلوزیس 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 آنتی‌بیوتیکی مهیا می‌گردد. در این تحقیق هم براساس شناسایی ژن‌های مربوطه به مقاومت آنتی‌بیوتیکی از قبیل: rpoB ژن مرتبط با مقاومت به ریفامپین و گروه ریفامپیسین، katG زن کنترل کننده آنتی‌بیوتیک ایزونیازید و gyrA و rrs ژن کنترلی برای آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین و کانامایسین انجام تست مولکولی و توالی‌یابی براساس روش سنجر صورت گرفت. در این مطالعه با توجه‌به انجام روش آنتی‌بیوگرام برای آنتی‌بیوتیک‌های رده اول و دوم و جداسازی نمونه‌های مقاوم‌به آنتی‌بیوتیک 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 مایکوباکتریوم‌ها (سلی و غیرسلی) براساس توالی ژن ۱۶SrRNA 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. بیزینی و همکاران (۲۰۱۱) ادعا کرد که با احتساب هزینه مواد مصرفی، حقوق، و استهلاک دستگاه، شناسایی یک ایزوله باکتریایی توسط توالی‌یابی ۱۶S 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 آنتی‌بیوتیک‌ها مبادرت‌به شناسایی ارتباط هر ژن با آنتی‌بیوتیک 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 زیرگروه‌بندی باکتری‌ها برای اهداف اپیدمیولوژیک استفاده می‌شوند. اگرچه تعیین توالی rDNA ۱۶S برای اختصاص جنس یا گونه به یک جدایه کافی است، در بیش‌تر موارد برای تایپ سازی دقیق، به‌عنوان مثال، مطالعه-های اپیدمیولوژیک کافی نیست. PFGE را می‌توان برای تایپ با وضوح بالا استفاده کرد.

اما به‌طور کلی برای اختصاص جنس یا گونه به میکروارگانیسم-ها نامناسب است ولیکن شناسایی دقیق مایکوباکتریوم مقاوم‌به آنتی‌بیوتیک به‌جهت بیماریابی می‌تواند از به‌کارگیری این روش‌های مولکولی و توالی‌یابی بهره بگیرد.

پیشرفت‌ها در روش‌های مولکولی، شناسایی ارزان، سریع و قابل اعتماد بسیاری از گونه‌های 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 محدودیت‌هایی در روش‌های مولکولی وجود دارد که دانستن آن‌ها بسیار مناسب است. روش‌های تشخیصی مولکولی تجاری تنها می‌توانند تعداد محدودی از مکان‌های جهش را شناسایی کنند. برای مثال، GeneXpert MTB/RIF (Cepheid) فقط جهش‌های *rpoB* مرتبط با مقاومت ریفامپین را تشخیص می‌دهد. GenoType MTBDRplus (Hain Lifescience) فقط می‌تواند جهش در ژن‌های مرتبط با مقاومت به ریفامپین (rpoB) و ایزونیازید (inhA و katG) را تشخیص دهد. Xpert MTB/XDR (Cepheid) می‌تواند برای تشخیص مقاومت به ایزونیازید، فلوروکینولون‌ها، 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 کیت‌ها مقاومت ناهمگن را تشخیص نمی‌دهند و مترادف‌ها یا جهش‌های خاموش نیز ممکن است به اشتباه به-عنوان مقاومت گزارش شوند. با توسعه فناوری توالی‌یابی، توالی-یابی DNA به‌طور گسترده‌ای در مطالعه مقاومت دارویی MTB مورد استفاده قرار گرفته است که می‌تواند اطلاعات دقیقی در مورد چندین ژن مقاوم‌به دارو ارائه دهد. با این حال، محدودیت‌های زیادی در سنجش توالی وجود دارد، مانند توان عملیاتی کم توالی‌یابی Sanger، هزینه بالا و الزامات بالاتر برای تفسیر نتایج توالی‌یابی نسل بعدی (۱۴۵).

لیکن در این مطالعه با توجه‌به شناسایی آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در رده اول و دوم درمان و هم‌چنین جداسازی گونه-های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از غیرتوبرکلوزیس در مقاومت به هر آنتی‌بیوتیک، 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 به‌دست آمده نمایاگر این خواهد بود که در زمان بسیار کم امکان تشخیص بیماری سل و نوع مقاومت آنتی‌بیوتیک میسر است که این موضوع در درمان صحیح و به-موقع و هم‌چنینی ارائه برنامه کنترلی مناسب توسط مراکز بهداشتی مناسب است. چه‌بسا سیاست‌گذاری برنامه پیشگیری سل با انجام روش‌های دقیق تشخیصی و بیماریابی به‌موقع در انجام برنامه‌ریزی دقیق براساس جمعیت‌ها و نقاط جغرافیایی بهتر میسر می‌گردد.

منابع

1. Bull T.J. and Shanson D.C. (1992) Rapid misdiagnosis by Mycobacerium avium intracellulare masquerading as tuberberculosis PCR/DNAprobe 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 diseses. 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. Fitnesscompensatory 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.