فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال اول، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۱، صفحه ۱۳- ۲۸
تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۰۵/۲۱ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۰/۰۹

طراحی و بررسی مقایسه ای روش‌های مولکولی تشخیص سریع مقاومت به داروهای تزریقی ضد سل در سویه‌های کلینیکی میکوباکتریوم توبرکلوزیس

فاطمه صالحی: دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات کردستان، ایران، fatemeh.salehiarak@yahoo.com
بهاره رحیمیان ظریف: استادیار میکروب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات کردستان، ایران، bahareh_r_z@yahoo.com
اعظم احمدی: دانشجوی دکتری تخصصی ژنتیک مولکولی، مرکز تحقیقات سل و عفونی کودکان، دانشگاه علوم پزشکی اراک، ایران، ahmadia22@yahoo.com
مانا شجاع پور: دانشجوی دکتری تخصصی پزشکی مولکولی، مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، ایران، mana_shojapuor@yahoo.com
توکتم پولاد: دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات کردستان، ایران، t.poolad @yahoo.com
محمد ارجمند زادگان: استادیار باکتری شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، ایران، arjomandzadegan@arakmu.ac.irn *

چکیده

مقدمه: در این تحقیق، برای تشخیص سریع مقاومت به کانامایسین، آمیکاسین، کاپرئومایسین، چند روش مولکولی طراحی و مقایسه شدند.

مواد و روش‌ها: از میان ۱۲۰ سویه کلینیکی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، ۷۰ سویه برای بررسی موتاسیون‌های احتمالی انتخاب شدند. در روش PCR-RFLP از آنزیم *ajii* برای تشخیص سویه وحشی و از آنزیم *BstFNI* برای شناسایی سویه موتانت استفاده شد. علاوه بر این، در طراحی روش آلل اسپسیفیک هم‌زمان (mAs PCR) از سه پرایمر اختصاصی برای تعیین حالت‌های وحشی و نیز موتان کدون‌های ۱۴۰۱ و ۱۴۰۲ استفاده شد. تعدادی از سویه‌ها تعیین توالی (سکوئنس) شدند.

نتایج: در روش PCR-RFLP از میان ۷۰ سویه مورد بررسی، با آنزیم *BstFNI*، ۱۷ سویه موتان از میان ۲۴ سویه مقاوم فنوتیپی و ۴۴ سویه غیر موتان از ۴۶ سویه، حساس تشخیص داده شدند. حساسیت این روش ۷۰/۸۳ و ویژگی آن ۹۵/۶۵ درصد بود. آنزیم *ajii* از میان ۵۲ سویه مورد بررسی، ۱۲ سویه موتان از میان ۲۰ سویه مقاوم و ۲۹ سویه غیر موتان را از میان ۳۲ سویه حساس فنوتیپی تشخیص داد. حساسیت این روش ۶۰ و ویژگی آن ۹۰/۶۲ درصد بوده است. در روش آلل اسپسیفیک ۲۳ سویه بررسی شدند. این روش قادر به تشخیص ۳ سویه موتان از میان ۶ سویه مقاوم و ۱۲ سویه غیرموتان از میان ۱۷ سویه حساس فنوتیپی شد. حساسیت این روش ۵۰ و ویژگی آن ۷۰/۵۸ درصد بوده است. نتایج تعیین ترادف اثبات کننده صحت نتایج روش‌های مولکولی استفاده شده، بود.

بحث و نتیجه‌گیری: روش PCR-RFLP با آنزیم *BstFNI*، به عنوان یک روش سریع در تشخیص مقاومت مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به داروهای تزریقی خط دوم درمان سل پیشنهاد می‌شود.

واژه‌های کلیدی: کانامایسین، آمیکاسین، کاپرئومایسین، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، مقاومت دارویی، تشخیص، PCR-RFLP، MAS-PCR

* نویسنده مسؤول مکاتبات، مرکز تحقیقات سل و عفونی کودکان و گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، ایران mmatinam81@yahoo.com ، arjomandzadegan@arakmu.ac.irn

مقدمه

سل یک بیماری عفونی با ماهیت مزمن و بسیار مسری است که در بیشتر موارد ناشی از مایکوباکتریوم توبرکلوزیس است. شایع‌ترین محل درگیری آن ریه است، اما در یک سوم موارد سایر اعضا را نیز درگیر می‌کند (۱). این بیماری شایع‌ترین بیماری کشنده به علت یک میکروب در تمام جهان است و یک سوم جمعیت جهان آلوده به این میکروب هستند. در هر سال نزدیک به ۹ میلیون نفر مبتلا به سل می‌شوند. ۵ تا ۱۰ درصد کسانی که به میکروب سل آلوده اند مبتلا به این بیماری می‌شوند (۳) و در هر سال نزدیک به ۲ میلیون مرگ ناشی از این بیماری رخ می‌دهد (۲).

پس از سال ۱۹۸۰ افزایش شدیدی در سویه‌های مقاوم به درمان در تمامی جهان مشاهده شد. مقاومت به یک دارو از سال‌ها قبل شناخته شده بود ولی با افزایش شدید مقاومت‌ها متاسفانه تعداد زیادی از این مقاومت‌ها به شکل مقاومت چند دارویی (حداقل مقاومت به دو داروی خط اولی بیماری سل یعنی ریفامپین و ایزونیازید) مشاهده شده است. میزان بروز سل مقاوم به چند دارو به سرعت در حال افزایش است و بروز تخمینی آن در کل جهان ۴۶۰۰۰۰ مورد در سال ۲۰۰۵ گزارش شده است. این میزان در بسیاری از کشورهای درحال توسعه به علت کمبود امکانات آزمایشگاهی و تشخیصی مناسب کمتر از میزان واقعیت تخمین زده می‌شود. در سال ۲۰۱۰ میزان بروز کل موارد سل در ایران، ۲۰ مورد به ازای یک‌صد هزار نفر جمعیت ثبت و گزارش شده است. همسایگی ایران با دو کشور افغانستان و پاکستان که در زمره ۲۲ کشور مطرح دنیا در زمینه سل هستند و همچنین عراق و کشورهای تازه استقلال یافته (با شیوع بالای سل مقاوم به چند دارو) ضرورت توجه بیشتر ما را به این بیماری متذکر می‌کند (۳).

موضوع مهم در مورد بیماری سل چگونگی کنترل و پیشگیری از آن است (۴ و ۵). در حال حاضر گسترش سویه‌های با مقاومت گسترده و ظهور سویه‌های مقاوم به تمام داروها مشکلات اساسی در کنترل جهانی سل ایجاد کرده است. استفاده مناسب از داروهای ضد سل، برای درمان موثر سل مقاوم به چند دارو و پیشگیری از ایجاد سل با مقاومت گسترده ضروری است (۶).

سل با مقاومت گسترده، یک نوع کمابیش نادری از سل مقاوم به چند دارو است که تقریبا مقاوم به تمام داروهای استفاده شده در درمان سل از جمله دو داروی خط اول درمان و داروهای خط دوم مانند فلوروکینولون‌ها و حد اقل یکی از سه داروی تزریقی کانامایسین، آمیکاسین و کاپرئومایسین است (۷). در درمان این نوع از سل، آنتی بیوتیک‌های خط دوم درمان مانند آمینوگلیکوزیدها (کانامایسین و آمیکاسین) یا آنتی بیوتیک‌های پپتیدی (کاپرئومایسین) استفاده می‌شوند (۸).

آنتی بیوتیک‌های خط دوم درمان باکتریسیدال بوده و از طریق تداخل با این جایگاه‌های ریبوزوم، اثر خود را اعمال و از سنتز پروتئین ممانعت می‌نمایند (۵). درواقع کانامایسین و آمیکاسین به جز ۱۶S rDNA از زیر واحد ۳۰s متصل شده و با اتصال به این زیر واحد سبب اشتباه خواندن رمزهای ژنتیکی می‌شوند؛ بنابراین باعث افزایش سطوح پروتئین‌هایی با تاخوردگی اشتباه در سلول و در نهایت مرگ سلول می‌شود (۹، ۱۰ و ۱۳). مکانیسم فعالیت کاپرئومایسین در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به طور کامل مشخص نیست اما به نظر می‌رسد که از طریق تداخل در ترجمه و ممانعت از سنتز فنیل آلانین

در ریبوزوم‌های باکتریایی اثر خود را اعمال می‌کند (۱۱).

سویه‌های مقاوم به یک یا بیش از یک داروی تزریقی شامل موتاسیون‌هایی در نزدیکی انتهای ′۳ ژن *rrs* (۱۶S rDNA) شامل نواحی نوکلئوتیدی A1401G، C1402t،G1484t است (۱۲، ۱۶ و ۱۷).

روش‌های موجود برای تشخیص سریع این داروها بیشتر مبتنی بر تعیین ترادف کدون‌های اصلی مرتبط با مقاومت هستند. به تازگی کیت‌های تجاری دراین رابطه به بازار ارائه شدند که با توجه به هزینه بری بالا،.مقبولیت عام در آزمایشگاه‌های مرکزی پیدا نکردند.

دراین تحقیق، سه روش مختلف مولکولی In – House برای تشخیص جهش‌ها درکدون‌های ۱۴۰۱ و ۱۴۰۲ ژن *rrs* طراحی شده و با روش تعیین توالی مقایسه شده اند.

مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع توصیفی تحلیلی بوده و در مرکز تحقیقات سل و عفونی دانشگاه علوم پزشکی اراک انجام گرفته است.

سویه‌ها

صد و بیست سویه خلط مثبت و کشت مثبت با الگوهای مقاومت متنوع و سابقه شکست در درمان انتخاب شدند. از این میان تعداد ۵۲ سویه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس که به روش استاندارد طلایی کشت (proportion) مقاومت به سه داروی تزریقی کانامایسین، آمیکاسین و کاپرئومایسین در آن‌ها تعیین شده بود، استفاده شدند.

استخراج DNA

تعدادی از کلونی‌های رشد کرده مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بر روی محیط کشت لونشتاین جانسون برداشته و در ۲۷۰ میکرو لیتر بافر TAE-1X محتوی ۰/۰۷ گرم ، chelex 100 حل شد. سپس به شدت ورتکس شده و در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ دقیقه حرارت دهی انجام شد. دوباره ورتکس کرده و به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۴۰۰۰ سانتریفوژ شد. سپس، با دقت DNA موجود در فاز رویی جدا شده و دو بار دیگر سانتریفوژ تکرار می‌شود. در نهایت، سوپرناتانت محتوی DNA در فریزر نگه داری شد.

روش‌های مولکولی مورد استفاده

در این تحقیق، برای تعیین جهش در کدون‌های ۱۴۰۱ و ۱۴۰۲ ژن *rrs* روش‌های مولکولی زیر طراحی و استفاده شدند:

۱. PCR-RFLP با کمک آنزیم BstFNI
۲. PCR-RFLP با کمک آنزیم Ajii
۳. آلل اسپسیفیک
۴. تعیین توالی[1]

نتایج فنوتیپی به عنوان استاندارد طلایی مقاومت و روش تعیین توالی به عنوان استاندارد طلایی روش‌های مولکولی استفاده شدند. در روش آلل اسپسیفیک از پرایمرهای اختصاصی برای تعیین حالت وحشی ۱۴۰۱ و ۱۴۰۲ استفاده شد. در روش PCR-RFLP ازآنزیم *ajii* برای تعیین سویه‌های تیپ وحشی و از آنزیم *BstfNI* برای شناسایی سویه‌های موتانت استفاده به عمل آمد.

طراحی پرایمر

با توجه به جدید بودن روش‌های مولکولی مورد استفاده، پرایمرهای مورد نیاز طراحی شدند. بدین منظور پرایمرها با توجه به نوکلئوتیدهای هدف به گونه ای طراحی شدند که قادر به شناسایی هر نوع موتاسیون باشند. علاوه بر این، نکات اصلی در طراحی پرایمر شامل موارد زیر در نظر گرفته شده و با کاهش و افزایش نوکلئوتیدها بهترین ترادف‌ها انتخاب شدند: طول

پرایمر، درصد GC بین ۶۰ تا ۴۵، دلتا G پرایمر، جلوگیری از تشکیل ساختارهای سنجاق سری، ممانعت از انتهای چسبان، افزایش درصد C یا A در انتهای ۳ پرایمر، افزایش درصد A و T در ۳، پرهیز از (5')...GATC(3') و نیز (5')AC...GT(3') در ۳، تشابه درصد GC در F و R، انتخاب دمای ذوب بین ۶۵ تا ۷۰ درجه سانتی‌گراد و تشابه آن در هر دو پرایمر و در نهایت انتخاب دمای Annealing بر اساس دمای ذوب.

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده برای روش‌های مختلف مولکولی

روش	پرایمرها	توالی (به شکل '۳-'۵)	ΔG	GC درصد	وزن مولکولی گرم/مول	نقطه ذوب درجه سانتی‌گراد	طول	محصول (زوج باز)
روش PCR-RFLP و تعیین توالی	F-rrs	TCTCATGTTGCCAGCACGTAATG	۰/۳۹ تا ۱/۳۷+	۴۷/۸	۷۰۱۴/۶	۴۷/۸	۲۲	۴۲۲
	R-rrs	GAGGTGATCCAGCCGCAC	۰/۰۷ تا ۰/۸۸-	۶۶/۷	۵۵۰۹/۶	۵۸/۸		
آلل 1401	f1401	GCCTTGTACACACCGCCCGTCA	۰/۶۵ تا ۱/۲۵	۳۶/۶	۶۶۱۶/۳	۶۴/۲	۲۲	۱۵۱
	fm1401	GCCTTGTACACACCGCCCGTCG	۰/۳- تا ۰/۶۵	۶۸/۲	۶۶۳۲/۳	۶۵	۲۲	۱۵۱
	R-rrs	GAGGTGATCCAGCCGCAC	۰/۰۷- تا ۰/۸۸-	۶۶/۷	۵۵۰۹/۶	۵۸/۸		
آلل 1402	fm1402	GCCTTGTACACACCGCCCGTCAT	۰/۶۵ تا ۱/۲۵	۶۰/۹	۶۹۲۰/۶	۶۳/۹	۲۳	۱۵۱
	R-rrs	GAGGTGATCCAGCCGCAC	۰/۰۷- تا ۰/۸۸-	۶۶/۷	۵۵۰۹/۶	۵۸/۸		

انجام PCR-RFLP

به منظور بررسی وجود موتاسیون در ژن *rrs*، پرایمرهای اختصاصی F-rrs و R- rrs (جدول ۱) بدین منظور طراحی شده و برای تکثیر یک قطعه ۴۲۲bp استفاده شدند.

برنامه واکنش PCR به شکل زیر انجام شد. دناتوراسیون اولیه: ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۳ دقیقه، ۴۰ سیکل به شکل ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، ۵۶ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه و دمای پایانی ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۱۰ دقیقه محصولات PCR در ژل آگاروز یک درصد الکتروفورز شدند و برای اندازه گیری باندها از نشانگر مولکولی مناسب استفاده شد.

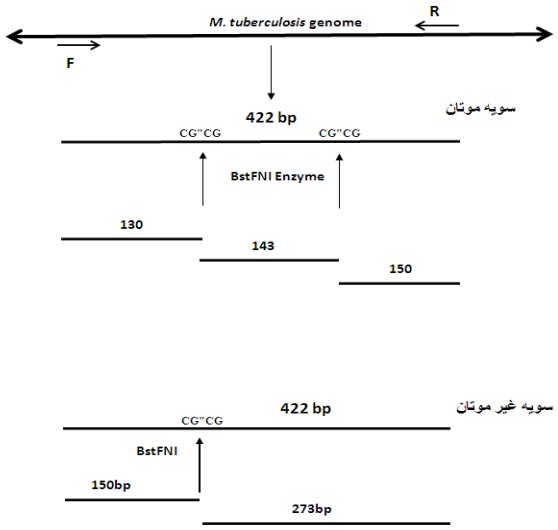
ترکیب مخلوط PCR شامل ۲ میکرولیتر بافر، ۵/. میکرولیتر MgCl2، ۲/۵ میکرولیتر جفت پرایمرهای اختصاصی، یک میکرولیتر مخلوط دزوکسی نوکلئوتیدهای چهارگانه، ۰/۶ میکرولیتر آنزیم Taq پلیمراز و مقداری آب مقطر استریل در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر بود.

برای تعیین جهش‌ها درکدون‌های ۱۴۰۱، ۱۴۰۲ ژن *rrs*، محصول PCR برای انجام برش آنزیمی به دو روش استفاده شد:

(الف) آنزیم *BstFNI*

آنزیم *BstFNI* دارای سایت برش، (5-CG''CG-3) است. باندهای مورد انتظار با کمک نرم افزار Genetix برای فراگمنت مورد نظر این آنزیم تعیین شدند. همان گونه که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، قطعات حاصل از برش محصول PCR، با کمک آنزیم *BstFNI*، در نمونه‌های غیر موتان ۲۷۳ و ۱۵۰ و در نمونه‌های موتان ۱۳۰و۱۴۳و۱۵۰ هستند (شکل ۱). محصولات حاصل از برش، با الکتروفورز روی ژل پلی‌آکریل آمید ۸ درصد و رنگ آمیزی نیترات نقره قابل مشاهده بودند.

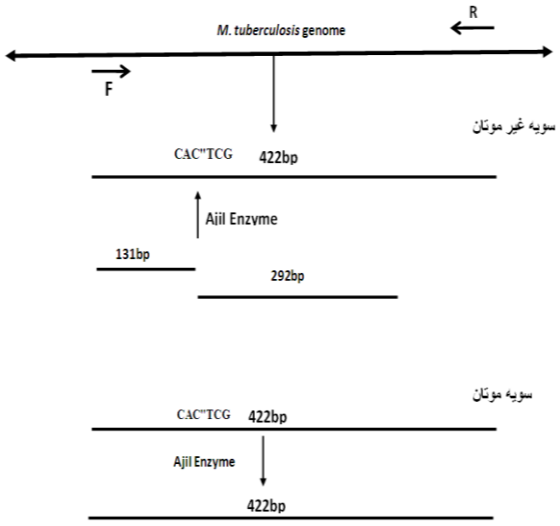
برای انجام واکنش هضم، مخلوط ۴ میکرولیتر محصول PCR، ۲ میکرولیتر بافر، ۱ واحد از آنزیم *BstFNI* و ۱۳ میکرولیتر آب مقطر تهیه و در دستگاه ترموسایکلر ابتدا به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و سپس به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه (برای غیرفعال شدن آنزیم) قرار داده شد.



شکل ۱- برش قطعه ۴۲۲bp را توسط آنزیم *BstFNI* نشان می‌دهد . قطعه ۴۲۲ bp طی هضم با این آنزیم در سویه‌های موتان قطعه ۱۳۰، ۱۴۳ و ۱۵۰ را تولید و در سویه‌های فاقد موتاسیون قطعات ۱۵۰ و ۲۷۳ را تولید می‌کند

(ب) برش با کمک آنزیم *Ajii*

آنزیم *ajii* دارای سایت برش (5-CAC"TCG-3) بوده و باندهای حاصل از برش در شکل ۲ قابل مشاهده هستند. قطعات حاصل از برش محصول PCR موجود توسط آنزیم *ajii* در نمونه‌های غیر موتان bp ۲۹۲ و bp ۱۳۱ و در نمونه‌های موتان bp ۴۲۲ است. ترکیب مخلوط واکنش، شبیه ترکیب به آنزیم *BstFNI* مربوط بود. محصولات حاصل از برش با الکتروفورز روی ژل پلی‌آکریل آمید ۸ درصد و رنگ آمیزی نیترات نقره بررسی شدند.



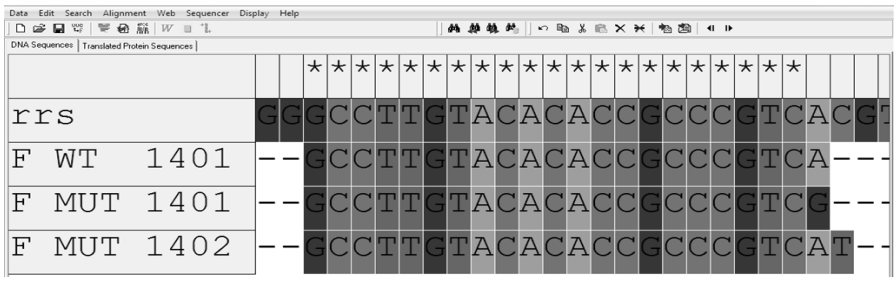
شکل ۲- برش قطعه ۴۲۲ bp را توسط آنزیم *ajii* نشان می‌دهد. قطعه ۴۲۲ bp طی هضم با این آنزیم در سویه‌های موتان قطعه bp ۴۲۲ را تولید و در سویه‌های فاقد موتاسیون قطعات bp ۱۳۱ و bp ۲۹۲ را تولید می‌کند.

روش آلل اسپسیفیک

برای روش آلل اسپسیفیک، ۳ گروه پرایمرهای اختصاصی طراحی شد. پرایمرهایی که به شکل فوروارد انتخاب شدند شامل F- ۱۴۰۱، F- M۱۴۰۱ و F- M۱۴۰۲ بودند. استفاده آن‌ها با پرایمر R، برای حالت وحشی باند داخلی ۱۵۷ را ایجاد نمود که درانجام آزمایش‌ها از آن‌ها استفاده شد.

برای تعیین جهش‌ها درکدون‌های ۱۴۰۱، ۱۴۰۲ ژن *rrs* برنامه pcr و مخلوط واکنش شبیه برنامه و ترکیب روش PCR-RFLP بود.

پرایمرهای داخلی استفاده شده با پرایمر R، ایجاد باند داخلی ۱۵۱ می‌کنند که در نهایت قطعات تکثیر شده روی ژل آگاروز یک درصد با Gel Red الکتروفورز شد. در مقابل نور UV حاصل از ترانس لومیناتور، بررسی شدند.



شکل ۳- نمایی ازطراحی پرایمرهای داخلی ژن *rrs* برای روش آلل اسپسیفیک با استفاده از نرم افزار mega

تعیین توالی ژن

برای ارزیابی روش تعیین موتاسیون با سایر روش‌های مولکولی، از تعیین توالی، به عنوان استاندارد طلایی استفاده شد. در این روش، قطعه مورد نظر محتوی کدون‌های موتان، با انجام PCR با پرایمرهای اختصاصی (ارائه شده در بند PCR-RFLP) تکثیر شد. محصول PCR، قطعه bp ۴۲۲ بود که پس از تخلیص برای تعیین توالی با دستگاه Applied Biosystem به شرکت انگلستان فرستاده شد.

نتایج

نتایج PCR

انجام PCR ژن *rrs* روی تمامی نمونه‌های مورد مطالعه، باند bp ۴۲۲ را ارائه نمود که نشان دهنده انتخاب صحیح پرایمرها و تعیین برنامه مناسب آمپلی فیکاسیون بود.

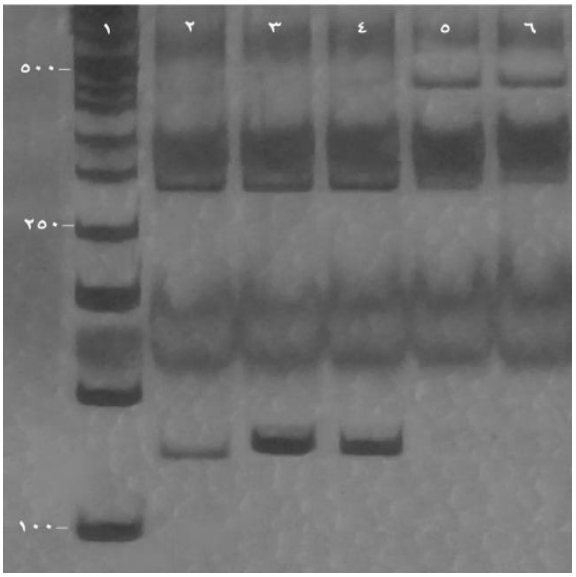
نتایج PCR-RFLP

(الف) برش با کمک آنزیم *ajii*

در این روش محصول برش آنزیمی به کمک PCR-RFLP همان گونه که با نرم افزار Genetix پیش‌بینی شده بود، برای سویه‌های موتان باند bp ۴۲۲ و برای سویه‌های غیر موتان باندهای bp ۱۳۱ و ۲۹۲bp را ایجاد نمود.

از ۱۲۰ سویه کلینیکی جدا شده از بیماران خلط مثبت و کشت مثبت، ۵۲ سویه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با الگوی مقاومت متنوع برای بررسی با آنزیم *ajii* انتخاب شدند. که از این میان ۲۰ سویه از نظر فنوتیپی مقاوم (۴ نمونه MDR، ۱۶ نمونه XDR) و ۳۲ سویه از نظر فنوتیپی حساس (۲۳ نمونه کاملا حساس و ۸ نمونه MDR و یک نمونه تک مقاومتی) به سه داروی تزریقی مذکور بوده اند.

نتیجه هضم قطعه bp ۴۲۲ حاصل از PCR ژن *rrs*، در نمونه‌های مختلف متفاوت بوده والگوهای متنوعی را نشان می‌دهد. نتایج این یافته‌ها در شکل ۴ نشان داده شده است.

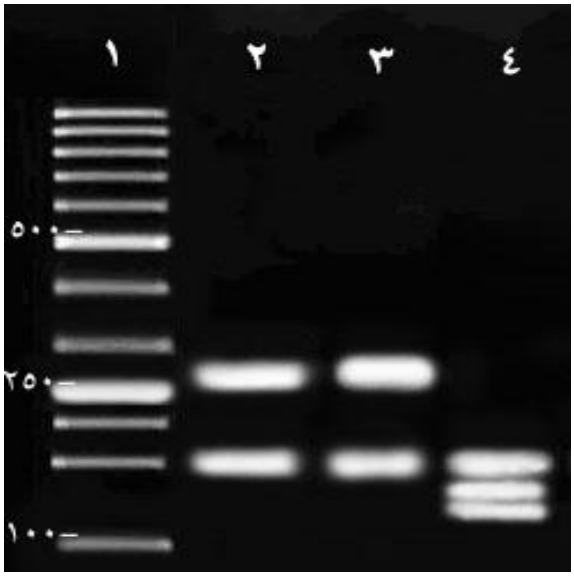


شکل ۴- الگوهای RFLP ژن *rrs* پس از برش توسط آنزیم *ajii* در نمونه‌های غیر موتان قطعات حاصل از برش محصول PCR با آنزیم *ajii*، bp ۱۳۱ و bp ۲۹۲ و در نمونه‌های موتان باند ۴۲۲bp مورد انتظار است. در شکل یاد شده نمونه‌های ۲، ۳ و۴ حساس بوده که دارای باندهای ۱۳۱ و ۲۹۲ هستند و نمونه‌های ۵ و۶ مقاوم فنوتیپی بوده که برای آن‌ها باند ۴۲۲ قابل انتظار است.

آنـزیم *ajii* بـه کمـک روش PCR-RFLP قـادر بـه تشخیص ۱۲ سویه موتان از میان ۲۰ سویه مقاوم فنـوتیپی شد. همچنین از میان ۳۲ سویه حساس فنوتیپی، ۲۹ سـویه غیـر موتـان توسـط ایـن آنـزیم تشـخیص داده شـدند. حساسیت این روش ۶۰ و ویژگی آن ۹۰/۶۲ درصد بوده است.

(ب) برش با کمک آنزیم *BstFNI*

نتیجه هضم قطعه bp ۴۲۲ توسـط *آنـزیم BstFNI* در نمونه‌های موتان و غیر موتان الگوهـای متفـاوتی را بـرای نمونه‌های مختلف نشان داد. تمامی سویه‌های غیـر موتـان باند bp ۲۷۳ و bp ۱۵۰ و سـویه‌هـای موتـان بانـد ۱۳۰ و ۱۴۳ و ۱۵۰ را نشان می‌دهند (شکل ۵).



شـکل ۵- الگوهـای RFLP ژن *rrs* پـس از بـرش توسـط آنـزیم *bstfni*، در نمونـه‌هـای غیـر موتـان بانـدهـای، ۲۷۳ و ۱۵۰ و در نمونه‌های موتان باندهای ۱۳۰ و ۱۴۳ و ۱۵۰ قابـل مشـاهده هسـتند. در شکل یاد شده نمونه‌های ۳ و ۲ حساس بوده که دارای باندهـای ۱۵۰ و ۲۷۳ هستند. نمونـه ۴ مقـاوم فنـوتیپی بـوده کـه بـرای آن‌هـا باندهای ۱۳۰ و ۱۴۳ و ۱۵۰ قابل انتظار است.

از ۷۰ سویه مایکوبـاکتریوم توبرکلـوزیس کـه بـرای بررسی با آنزیم *BstFNI* انتخاب شدند، ۲۴ سویه از نظـر فنوتیپی مقاوم و ۴۶ سویه از نظر فنـوتیپی حسـاس بـه سـه داروی تزریقی مذکور بوده اند.

آنزیم *BstFNI* به کمک روش PCR-RFLP قادر به تشخیص ۱۷ سویه موتان از میان ۲۴ سویه مقاوم فنـوتیپی شد. ایـن آنـزیم از میـان ۴۶ سـویه حسـاس فنـوتیپی، ۴۴ سـویه غیـر موتـان را تشـخیص نمـود. بـه عبـارت بهتـر، حساسیت این روش ۷۰/۸۳ و ویژگی آن ۹۵/۶۵ درصـد بود.

روش آلل اسپسیفیک

۲۳ سویه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس برای بررسی با روش آلل اسپسیفیک انتخاب شدند، کـه از ایـن میـان ۶ سـویه مقـاوم فنـوتیپی شـامل: ۲ نمونـه MDR، ۴ نمونـه XDR و۱۷ سویه حساس فنوتیپی (۱۲سویه کاملا حساس و ۳ نمونه MDR و یک نمونه تک مقاومتی) بوده‌اند.

با استفاده از روش آلل اسپسیفیک ۳ سـویه موتـان از میـان ۶ سـویه مقـاوم فنـوتیپی تشـخیص داده شـدند. همچنین، با کمک این روش ۱۲ سویه غیـر متـان از میـان ۱۷ سویه حساس فنوتیپی تشخیص داده شـدند حساسـیت ایـن روش ۵۰ و ویژگـی آن ۷۰/۵۸ درصـد بـوده اسـت. نتایج تعیین ترادف، اثبات کننده صحت نتایج روش‌هـای مولکولی مورد استفاده بود.

نتایج تعیین توالی

برای ارزیـابی صـحت نتـایج PCR-RFLP، از روش تعیین توالی به‌عنـوان اسـتاندارد طلایـی بخـش مولکـولی اسـتفاده شـد. انطبـاق کامـل (۱۰۰ درصـد) نتـایج تعیـین توالی با PCR-RFLP نشانگر دقت روش مـورد اسـتفاده از دیـدگاه مولکـولی بـود. تعیـین تـوالی در ژن *rrs*، در سویه‌های انتخاب شده به شـکل تصـادفی، انطبـاق کامـل نتـایج PCR-RFLP را بـا سـکونس نشـان داد و وجـود جهش در کدون‌های 1401,1402 این ژن را در تعـدادی از سویه‌های مورد مطالعه اثبات نمود.

بحث

در این تحقیق، ۴ روش مولکولی برای سویه‌هایی که فنوتیپی به روش proportion تعیین شدند اجرا و مقایسه شد. این روش‌ها به گونه ای انتخاب شدند که در استفاده عادی دارای کم‌ترین هزینه بری بوده و در عین حال از سرعت عمل و دقت مناسبی برخوردار باشند.

مقاومت‌های چند دارویی به علت کمبود امکانات آزمایشگاهی و تشخیصی مناسب و عدم درمان صحیح در کشورهای در حال توسعه، که بالاترین میزان آلودگی را دارند، رو به افزایش است. به علت گسترش روز افزون سل مقاوم به دارو و با توجه به متد درمانی سل، فراهم نمودن روش‌هایی برای تشخیص سریع حساسیت یا مقاومت سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به دارو امری ضروری به نظر می‌رسد.

اصولا روش PCR-RFLP بر مبنای شناسایی اختصاصی یک توالی خاص در ژنوم توسط آنزیم‌های مورد استفاده است. در این تحقیق، از دو نوع آنزیم استفاده شد. آنزیم *ajii* برای تعیین سویه‌های حساس (ترادف وحشی) و آنزیم *bstfni* برای تعیین حالت موتان (ترادف موتان که در سویه‌های مقاوم یافت می‌شود) با کمک نرم افزار Genetix انتخاب و شرایط واکنش طراحی شدند.

روش آلل اسپسیفیک به گونه ای طراحی شد که تنها قادر به شناسایی ترادف حساس (غیر موتان) باشد. به این ترتیب سویه‌های حساس تشکیل باند داخلی داده اما سویه‌های مقاوم قادر به تشکیل باند نیستند. این روش‌های مولکولی با روش تعیین توالی به عنوان استاندارد طلایی بخش مولکولی و نیز نتایج فنوتیپی به‌عنوان استاندارد طلایی مقاومت مقایسه شدند. نتایج این تحقیق، کارا بودن هر دو روش PCR-RFLP و امکان پذیر بودن استفاده از آن‌ها در روش‌های روتین آزمایشگاهی را نشان داد.

در مطالعه حاضر، آنزیم *BstFNI* از میان ۴۶ سویه حساس ۴۴ سویه فاقد موتاسیون را تشخیص داد. حساسیت این روش ۷۰/۸۳ و ویژگی آن ۹۵/۶۵ درصد بود. به عبارت بهتر، چنانچه در استفاده روتین، با کمک این روش اگر نمونه ای حساس تشخیص داده شود، می‌توان گفت که بیمار به دارو حساس است.

در این تحقیق، از دیدگاه مقاومت به داروهای تزریقی (آمیکاسین، کانامایسین و کاپرئومایسین) تنوع سویه‌های مورد استفاده درخور توجه بود. به این شکل که تمامی سویه‌های مقاوم به این داروها، بیشتر دارای مقاومت دارویی به سایر داروهای خط اول و دوم درمان به سل بودند.

از این میان دو سویه 665X و 15T از نظر فنوتیپی مقاوم به کانامایسین ولی حساس به آمیکاسین بودند. ویژگی این سویه‌ها در الگوی ژنتیکی مقاومت دارویی آن‌ها بود. در این نمونه‌ها فقدان موتاسیون در کدون ۱۴۰۱ و ۱۴۰۲ ژن *rrs* با روش PCR-RFLP اثبات شد و تعیین ترادف ژن این سویه‌ها نیز نبود موتاسیون را اثبات نمود. این مسئله با مطالعات تسوکامورا[۲] مطابقت دارد (۱۰).

علاوه بر این، همین دانشمند بیان می‌دارد که سویه‌های جدا شده از بیمارانی که با کانامایسین تحت درمان بوده اند به عنوان سویه‌های مقاوم به کانامایسین و کاپرئومایسین و حساس به ویومایسین تعیین شدند. مقاومت این سویه‌ها به کاپرئومایسین با سطح متفاوتی از مقاومت به کانامایسین همراه بوده است. سویه‌هایی که سطح پایینی از مقاومت به کانامایسین را دارند حساس به کاپرئومایسین بودند (فنوتیپی). این سویه‌ها (کانامایسین

مقاوم و کاپرئومایسین حساس) فاقد هرگونه جهش در ژن *rrs* بوده و سویه‌های مقاوم به کانامایسین و کاپرئومایسین دارای جهش در کدون ۱۴۰۱ و یا ۱۴۸۴ بودند (۱۰).

سویه 116x از نظر فنوتیپی مقاوم به آمیکاسین و کانامایسین و حساس به کاپرئومایسین بوده که رخداد موتاسیون در ژن*rrs* با روش PCR-RFLP در این سویه به اثبات رسید. سویه 554x از نظر فنوتیپی مقاوم به سه داروی تزریقی هستند. بررسی آن با آنزیم *ajii* عدم موتاسیون و با آنزیم *bstfni* وجود موتاسیون در آن را به اثبات رساند.

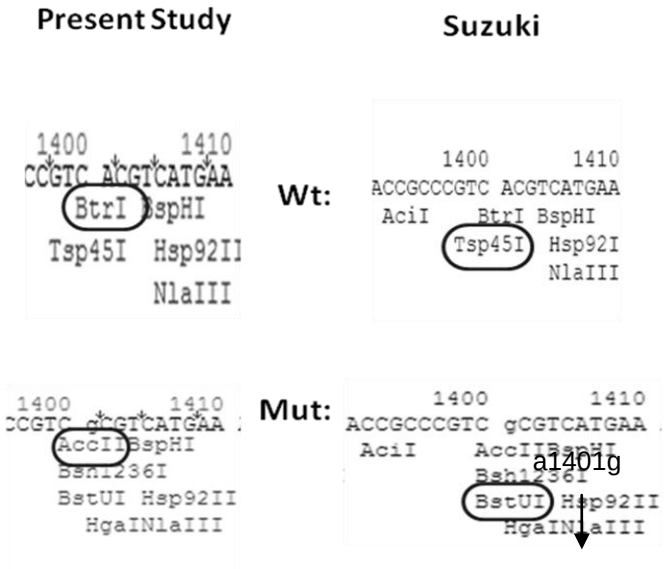
سویه‌های مقاوم به داروهای تزریقی در این تحقیق، دارای الگوهای متنوع مقاومت دارویی بودند. برای مثال سویه‌های کاملا حساس مانند 3n و 6n، سویه تک مقاومتی به استرپتومایسین مانند 9n، سویه‌های MDR مقاوم به کل داروهای خط اول مانند 5T، 1T، 2T، سویه‌های مقاوم به کل داروهای خط اول و دوم درمان که غیر XDR بوده مانند 27n، سویه‌های مقاوم به اکثر داروها 111x و 146x، سویه‌های حساس به داروهای تزریقی نیز دارای تنوعی از تمام حساس (pan sensitive)، سویه‌های MDR حساس به آمیکاسین و کانامایسین و سویه‌های دارای مقاومت به سایر داروها ولی حساس به داروهای تزریقی. در جدول شماره۲ تنوع مقاومت به دارو در نمونه‌های مورد مطالعه ارائه شده است.

در این مطالعه، سویه‌هایی با مقاومت متنوع به آنتی بیوتیک استفاده شدند. برای مثال، سویه‌هایی با مقاومت تک دارویی مثل 9n که مقاوم به استرپتومایسین بودند. ۲ دارویی، (18n,24n)که مقاوم به استرپتومایسین و ایزونیازید بوده تا نمونه‌های دارای مقاومت چندگانه به ۵ ۶ ، ۷ و ۸ دارو (1t، 3t، 26x، 12x، 99x) و داروهایی که به کل داروهای خط اول و دوم درمان مقاومند، مانند (2n,5n) .

پریسا طهماسبی و همکاران ۹۷ سویه مایکوکتریوم توبرکلوزیس را با استفاده از روش PCR-RFLP ارزیابی کردند که از این بین ۷ مورد مقاوم به آمیکاسین بوده و ۹۰ مورد حساس به این دارو بودند. این محققین از پرایمرهای 1539 *rrs* و 1096 *rrs* و آنزیم‌های اندونوکلئاز DdeI، TaiI استفاده کرده اند (۱۳ و ۱۷).

در مطالعه حاضر، پرایمرهای مورد نیاز با استفاده از نرم افزارهای Mega، Blast و Oligo و آنزیم‌های *Ajii* و *Bstfni* برای تعیین جهش در کدون‌های ۱۴۰۱ و ۱۴۰۲ ژن *rrs* توسط نرم افزار Genetix، طراحی شدند.

آنزیم *ajii* هر دو کدون ۱۴۰۱ و ۱۴۰۲ را بررسی نموده و برای حالت وحشی طراحی شده است. درحالی‌که آنزیم *Bstfni* صرفا حالت موتان کدون ۱۴۰۱ را شناسایی می‌کند. این مسئله بر اساس نتایج سایر محققین بوده که اکثر سویه‌های موتان بیشتر درکدون ۱۴۰۱ موتاسیون نشان می‌دهند. بنابراین، با هدف تسهیل روش، سرعت عمل و کاهش خطای پرسنل، روی این کدون تمرکز شد. هم پوشانی نتایج این دو آنزیم، باعث کاهش خطای آزمایش می‌شود.



شکل ۶- با استفاده از نرم افزار Genetix سایت‌های برش آنزیم *BtrI)AjiI* که برای برش حالت wild (وحشی) و آنزیم *BstFNI* (ACCII) که برای برش حالت موتان طراحی شده اند نشان داده شده است. *Bst*UI دارای سایت برش (CG^CG) است و رخداد موتاسیون در ۱۴۰۱ را بررسی می‌کند که با آنزیم *BstFNI* (*ACCII*) که برای برش حالت موتان در این تحقیق طراحی شده است، انطباق دارد.

آنزیم‌های انتخاب شده با توجه به این‌که تیپ دو هستند (آنزیم‌های تیپ دو دقیقا در ترادف انتخاب شده برش را انجام می‌دهند) بر آنزیم‌های تیپ برتری دارند. در مطالعه طهماسبی، فراوانی جهش‌های مربوط به مقاومت به آمیکاسین در کدون ۱۴۰۱ ژن *RRS* را بیشتر از سایر کدون‌ها اثبات نمود. همچنین در ۲۵ نمونه (۸۰/۳ درصد) مقاوم به آمیکاسین و در تمام نمونه‌های حساس به دارو جهشی مشاهده نشد. وی اشاره کرده است که در کدون‌های ۱۴۰۲ و ۱۴۸۴ در نمونه‌های مقاوم جهشی دیده نشد که این با نتایج این تحقیق مطابقت دارد (۱۳).

باتوجه به اختصاصی بودن جایگاه‌های برش پالیندروم ۶ نوکلئوتیدی آنزیم *AJII* می‌توان گفت که تغییر نوکلئوتیدی در هرکدام از نوکلئوتیدهای ۱۴۰۱ و ۱۴۰۲ به تغییر این سایت اختصاصی برای آنزیم مذکور منجر شده و در نتیجه به طور همزمان می‌توان هر دو نوع موتاسیون را تشخیص داد و ضرورتی به تفکیک رخداد موتاسیون در کدون‌های ۱۴۰۱ و ۱۴۰۲ نیست. بنابراین، آنزیم *AJII* که هر دو کدون ۱۴۰۱ و ۱۴۰۲ را بررسی می‌کند، برای استفاده عملیاتی می‌تواند کارا باشد. سوزوکی[۳] و سیرگل[۴]، نشان دادند که رخداد موتاسیون در هریک از کدون‌های ۱۴۰۱ و ۱۴۰۲ ژن *RRS* باعث مقاومت به داروهای تزریقی می‌شود (۱۵ و ۱۹). در این مطالعه جهش در۱۴۰۲ درهیچ یک از نمونه‌ها یافت نشد که با نتایج طهماسبی و سوزوکی، مطابقت دارد (۱۳ و ۱۷).

همانطور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود، حساسیت و ویژگی به دست آمده از آنزیم *bstfni* بهتر از آنزیم *ajii* است. بخصوص ویژگی ۹۵/۶۵ درصد آنزیم *bstfni* کمک زیادی به حذف موارد منفی کاذب در تشخیص مقاومت آنتی بیوتیکی می‌نماید.

جدول ۲- مقایسه حساسیت و ویژگی آنزیم *ajii* و *Bstfni*

آنزیم	تعداد سویه‌های مقاوم فنوتیپی	تعداد سویه‌های مقاوم ژنوتیپی با آنزیم	حساسیت (درصد)	ویژگی (درصد)
BSTFNI	۲۴	۱۷	۹۵/۶۵	۷۰/۸۳
AJII	۲۰	۱۲	۹۰/۶۲	۶۰

بررسی ترادف نوکلئوتیدی ژن *rrs* در سویه‌های کلینیکی مورد مطالعه به کمک نرم افزار Mega4 نشان داد که در برخی از سویه‌های مقاوم، جابجایی نوکلوتید گوانین به جای نوکلوتید آدنین در موقعیت ۱۴۰۱ و نوکلئوتید تیمین به جای نوکلئوتید سیتوزین در جایگاه ۱۴۰۲ دیده می‌شود . نوکلئوتید ۱۴۰۲ تمایل به اتصال به ۱۴۸۴ دارد و جهش در آن سبب عدم اتصال ۱۴۰۲ و ۱۴۸۴ با پیوند هیدروزنی می‌شود (۱۲). بر اساس مطالعه موس و همکاران و سوزوکی، بررسی توالی‌های نوکلئوتیدی مشابه در سایر باکتری‌ها مشخص کرد که جهش در کدون ۱۴۰۲ نقش کلیدی در ایجاد مقاومت در سویه‌های مقاوم به کانامایسین ایفا می‌کند. بنابراین، تبدیل c در موقعیت ۱۴۰۲ و g در موقعیت ۱۴۸۴ باعث تضعیف پیوند هیدروژنی می‌شود (۱۷ و ۱۸).

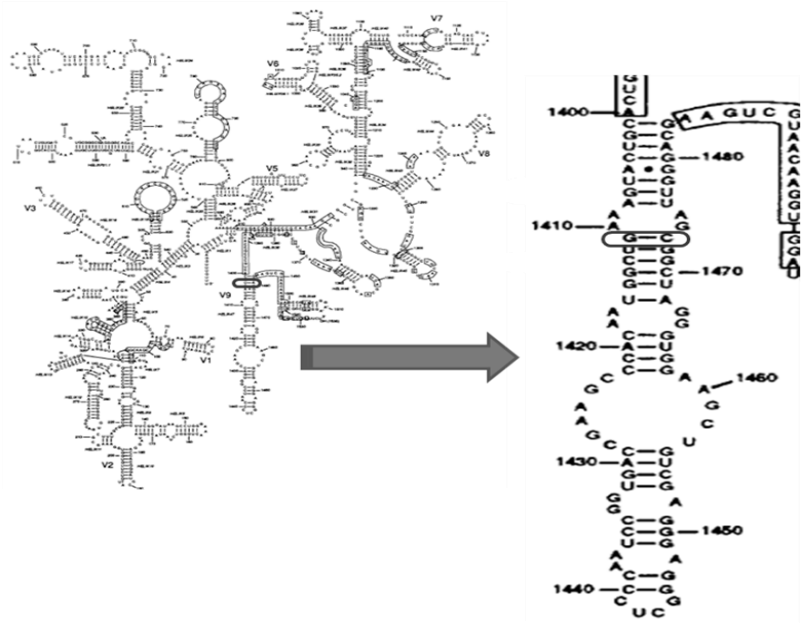
مولکول ۱۶S rrna که همراه با پروتئین‌های s در تشکیل زیر واحد کوچک ریبوزوم باکتریایی شرکت می‌کند و یکی از اجزای اصلی تشکیل دهنده این ساختار ماکرومولکولی است، در اصل تک رشته ای بوده و ساختارهای ثانویه ای که تشکیل می‌دهد در اثر اتصالات هیدروژنی نوکلئوتیدهای مختلف g≡ c,a=t است. بنابراین، در صورتی که در جایگاه‌های Turn و Loop های تشکیل دهنده ساختار ثانویه این مولکول تغییر ایجاد شود، این مولکول قادر به ایجاد پیوند با پروتئین‌های s نبوده و در نتیجه در ساختار زیر واحد کوچک ریبوزوم ایجاد اختلال می‌شود. و به عدم کارایی مولکول منجر می‌شود (شکل ۷).

ساختار ریبو نوکلئوتیدی پروتئین‌های ریبورزوم متشکل از زیرواحدهای کوچک و بزرگ است و تشکیل زیرواحدهای کوچک این ساختار ماکرومولکولی، مولکول‌های ۱۶S rrna و پروتئین‌های کوچک (small protein) نقش دارند که با اینترکشن‌هایی که با هم می‌دهند ساختار سه بعدی و فضایی خاصی برای جایگاه‌های p و a و اتصال mrna در موقعیت مناسب و ایجاد ساختار نخستین 30s و در نهایت اتصال به زیرواحد بزرگ ریبوزوم و تشکیل یک ریبونوکلئوتید پروتئین کامل به منظور آغاز فعالیت ترجمه را فراهم می‌کنند.

مطالب یاد شده بیانگر اهمیت وجود میان کنش‌هایی بین mrna های ریبوزومی و زیرواحدهای پروتئینی ریبوزوم است.

در ایجاد این میان کنش‌ها قطعات ساختار ثانویه rrna و ساختار سه بعدی پروتئین‌ها نقش دارند. تغییر نوکلئوتیدی در ۱۴۰۱ به تضعیف پیوندهای هیدروفوب – هیدروفوب بین ساختار پورینی باز موجود در موقعیت ۱۴۰۱ منجر شده و ریشه آمینواسیدهایی با زنجیره جانبی هیدروفوب خواهد شد و در نهایت تشکیل ساختار ریبونوکلئوپروتئینی را به مخاطره می‌اندازد.

تغییر نوکلئوتیدی در ۱۴۸۴ یا ۱۴۰۲ می‌تواند به تشکیل پیوندهای هیدروژنی بین g و c منجر شود و تشکیل ساختار را به نوعی به مخاطره اندازد.



شکل ۷- طرح شماتیک ساختار ثانویه 16S rrna در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و محل کدون ۱۴۰۱. همانگونه که مشاهده می‌شود، هر گونه موتاسیون در نوکلئوتیدهای این کدون باعث تغییر ساختار فضایی مولکول و غیر فعال شدن آن می‌شود.

در تحقیق حاضر، روش‌های مولکولی ساده و کاربردی برای اجرا به شکل روتین استفاده به عمل آمد. همان گونه که در جدول۳ مشاهده می‌شود، سایر محققین بیشتر از روش‌های کشت و تعیین توالی برای تشخیص مقاومت استفاده کرده اند که زمان‌بر بوده و هزینه آزمایش را افزایش می‌دهد.

جدول ۳- مطالعات انجام شده در سال‌های گذشته

مطالعات انجام شده	تعداد نمونه مقاوم (فنوتیپی)	روش **	ژنوتیپی*	درصد انطباق	حساسیت (درصد)	ویژگی (درصد)
(۱۹)	۲۶	mAs-pcr	۲۴	۹۲/۳۰	۹۲/۳	۹۹/۲
		DNA sequencing	۲۳	۸۸/۴۶	۹۵/۸	۹۸/۸
(۱۳)	۱۸۱	DNA sequencing	۱۶۲	۸۹/۵۰	-	-
(۲۰)	۱۵۰	DNA sequencing	۱۰۶	۷۰/۶۶	-	-
(۲۲)	۱۳۶	کشت و mAs-pcr	۳۲	۲۳/۵	۵۴/۵	۱۰۰
(۲۳)	۴۸	DNA sequencing	۳۷	۷۷	۷۹/۲	۱۰۰
(۲۱)	۲۶	DNA sequencing	۷	۲۶/۹۲	-	-
(۱۲)	۷۸	DNA sequencing	۶۹	۸۸/۴۶	۸۵/۹ تا ۹۴/۲	۱۰۰
(۱۸)	۱۶	DNA sequencing	۱۱	۶۸/۷۵	_	۸۷/۵
(۱۷)	۴۳		۲۹	۶۷/۴۴	۱۰۰	۶۷/۴۴

** روش مولکولی مورد استفاده برای تعیین موتاسیون در کدون‌های مرتبط با مقاومت

* تعداد نمونه‌هایی که با روش مولکولی، مقاومت آن‌ها اثبات شده است.

ویرال وادوای[۵] در سال ۲۰۱۲، به منظور تعیین عامل مقاومت به داروهای خط اول و دوم درمان سل، موتاسیون در کدون‌های (KatG315، rpoB531، GyrA94، rrs 1401) را در ۴۵۰ سویه، با استفاده از روش‌های کشت و mAs-pcr و تعیین توالی بررسی کرد. بررسی نمونه‌ها برای وجود موتاسیون در کدون ۱۴۰۱ ژن *rrs* با استفاده از روش mAs-pcr، حساسیت و ویژگی به ترتیب برابر۹۲/۳ و ۹۹/۲ درصدبود. تعیین توالی سویه‌های دارای موتاسیون، به ترتیب حساسیت و ویژگی ۹۵/۸ و ۹۸/۸ درصد را نشان داد (۱۹).

اونس و سگال[۶]، در سال ۲۰۱۰، ۲۸۸ سویه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس را با استفاده از روش کشت و mAs-pcr از نظر مقاومت به داروهای خط دوم درمان سل بررسی کرده اند. آن‌ها در این مطالعه حساسیت روش خود را ۵۴/۵ و ویژگی آن را ۱۰۰ درصد مشخص کرده اند (۲۲). درصد انطباق فنوتیپی با ژنوتیپی در روش آلل اسپسیفیک مورد استفاده در تحقیق حاضر، با نتایج این دانشمند مطابقت داشت.

سیرگل در سال ۲۰۱۱، ۳۱۰ نمونه را از نظر موتاسیون در کدون ۱۴۰۱ با استفاده از روش تعیین توالی بررسی کرد که از این بین، ۱۸۱ نمونه (۵۸ درصد) دارای موتاسیون بوده و از ۱۲۹ نمونه دیگر، ۴۲ درصد فاقد موتاسیون و ۶ درصد موتان گزارش شدند. با روش کشت ۱۸۱ نمونه مقاوم ژنوتیپی، فقط ۱۶۲ نمونه، از نظر فنوتیپی به آنتی بیوتیک‌های کانامایسین و کاپرئومایسین مقاومت نشان دادند (۱۴).

کانچان آجبانی[۷] در سال ۲۰۱۱، ۱۵۰ سویه XDR-TB را برای تعیین کدون‌های عامل موتاسیون در ژن‌های *RPOB*، *INHA*، *KATG*، *GYRA*، *GYRB*، *RRS* تعیین توالی کرد .که مشخص شد که ۷۱ درصد از سویه‌های مورد بررسی دارای موتاسیون در کدون ۱۴۰۱ ژن *RRS* بودند. در این بررسی ۱۰۶ نمونه (۷۱ درصد) دارای موتاسیون در کدون ۱۴۰۱ ژن *RRS* و ۴۲ سویه دارای موتاسیون در کدون ۱۴۸۴ و ۱۳ نمونه دارای موتاسیون در کدون ۱۴۸۴ ژن *RRS* و کدون ۲۰۵ ژن *TLYA* بودند و ۳ نمونه هم دارای موتاسیون در ژن *TLYA* به تنهایی بودند (۲۰).

A1401G، برای تشخیص مقاومت به کانامایسین و آمیکاسین ۱۰۰ درصد اختصاصی بوده، در حالی‌که برای تشخیص حساسیت این عدد ۸۵/۹ و ۹۴/۲ درصد است (۲۰). نتایج کار این محققین با نتایج تحقیق حاضر در خصوص ۱۴۰۱ مشابهت دارد.

جاوو پردیگاوو[۸] و همکاران، درسال ۲۰۰۵، ۲۶ سویه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس را از نظر موتاسیون در ژن‌های *RRS*، *TLYA* و *GYRA* ارزیابی کردند. تحلیل موتاسیونی این ژن‌ها نشان داد که ۲۵ سویه، حداقل جهش را در یکی از ژن‌های مورد نظر نشان دادند و فقط ۳ سویه به طور همزمان در دو ژن جهش را نشان دادند (۲۱).

سوزوکی[۹] در سال ۱۹۹۸، ۷۱ سویه حساس و ۴۳ سویه مقاوم فنوتیپی را با استفاده از روش PCR-RFLP و تعیین توالی ارزیابی کرد. پس از تعیین توالی این سویه‌ها، از ۴۳ سویه مقاوم فنوتیپی ۱۴ سویه (۳۲/۶۱ درصد) حساس ژنوتیپی و ۲۹ سویه دارای موتاسیون تشخیص داده شد. ۲۶ سویه (۶۰/۵ درصد) در ۱۴۰۱، یک سویه (۲/۳ درصد) در ۱۴۰۲ و ۲ سویه (۴/۷ درصد) در ۱۴۸۴ دارای موتاسیون بودند. در این مطالعه، اشاره شده است که موتاسیون در کدن‌های ۱۴۰۲ و ۱۴۸۴ نیز (علاوه بر ۱۴۰۱) باعث مقاومت به کانامایسین در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می‌شود. در سویه‌هایی

که از نظر فنوتیپی مقاوم به کانامایسین بودند، وجود موتاسیون در ژن *rrs* در ۶۷ درصد از سویه‌های مورد مطالعه یافت شد (۱۷).

سیلک فیوریگل[10] سال ۲۰۰۹، برای بررسی ۲۶ سویه مقاوم به افلوکساسین و ۴۸ سویه مقاوم به کاپرئومایسین و آمیکاسین و ۱۰ سویه (۵ سویه مقاوم به آمیکاسین و ۵ سویه مقاوم به کاپرئو مایسین) از نظر موتاسیون در ژن‌های (*tlyA*، *rrs*، *gyrA*، *gyrB*) از روش تعیین توالی استفاده کرده است (۴۹ سویه حساس به افلوکساسین و ۳۹ سویه حساس کاپرئومایسین و آمیکاسین هم به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند).۳۴ سویه از ۴۸ سویه مقاوم به کاپرئومایسین و آمیکاسین دارای موتاسیون در کدون ۱۴۰۱ ژن *rrs* بودند. در یکی از سویه‌های مقاوم به کاپرئومایسین جهش در کدون ۱۴۰۲ مشاهده شد. ۱۰ سویه هم فاقد هر گونه جهش در ژن‌های *tlyA* و *rrs* بودند، که ۵ سویه مربوط به سویه‌هایی که تنها به آمیکاسین مقاوم بودند مشاهده شد. ۳ سویه هم دارای جهش در ژن *tlyA* بودند. در بررسی ۳۹ سویه حساس به این دو دارو هیچ جهشی در ژن‌های *tlyA*، *rrs* مشاهده نشد. حساسیت و ویژگی روش آن‌ها برای تشخیص مقاومت به داروهای تزریقی خط دوم ۷۹/۲ و ویژگی آن ۱۰۰ درصد بوده است. در پایان، اشاره داشتند که بیشترین جهش در ژن *rrs*، به نوکلئوتید ۱۴۰۱ اطلاق شده است (۲۳).

با توجه به نتایج محققین یاد شده و نیز طهماسبی (۱۳) نتایج تحقیق حاضر با بررسی‌های این محققین در خصوص ارتباط مقاومت فنوتیپی بیشتر به موتاسیون در ۱۴۰۱ مطابقت دارد (۱۳).

در مطالعه آلانگادن[11] و همکاران در سال ۱۹۹۸، بیان شده است که موتاسیون در کدون ۱۴۰۱ ژن *rrs* باعث سطح بالایی از مقاومت به کانامایسین وآمیکاسین در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس را سبب می‌شود. در این مطالعه جابجایی a به g در ۱۳ سویه مورد مطالعه مشاهده شد که نیمی از این تعداد مقاوم به کاپرئومایسین نیز بودند (۱۶).

همان گونه که از جدول ۳ قابل استنباط است، انطباق کاملی بین نتایج روش‌های مولکولی سریع با نتایج آنتی بیوگرام به روش کشت وجود ندارد. این مسئله حتی هنگام استفاده از تعیین توالی نیز مشاهده می‌شود. بنابراین حضور مقاومت بدون تغییرات در ژن *rrs* نشان دهنده این است که اصولا روش‌های مولکولی درصد انطباق کاملی با روش‌های فنوتیپی ندارند که این مسئله به علت دخالت احتمالی مکانیسم‌های دیگراز جمله مقاومت ذاتی مایکوباکتریوم مرتبط با دیواره و یا ژن‌های دیگر (غیر از ژن *rrs*) است (۱۹).

نتیجه گیری

نتایج این تحقیق بر مبنای مقایسه سه روش مولکولی و نیز تعیین توالی نشان می دهد که روش PCR-RFLP طراحی شده با آنزیم *BstFNI*، برای اجرا در تشخیص روتین مقاومت می‌تواند به عنوان یک روش سریع و روتین در تشخیص مقاومت مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به داروهای تزریقی خط دوم درمان سل در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی استفاده شود .

تشخیص سریع و در دسترس سویه‌های مقاوم باکتری، درمان به موقع بیماران مبتلا، جلوگیری از افزایش هزینه بیماران مسلول،کمک به حذف سریع‌تر یک عامل انتشار بیماری به دنبال تشخیص به موقع یک بیماری مقاوم به دارو و درمان آن که از دیدگاه اپیدیمیولوژیک بسیار حائز اهمیت می‌باشد، از نتایج این تحقیق به شمار می‌رود.

تشکر و قدردانی

این پژوهش بخشی از طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی اراک است. بنابراین، بدین‌وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک تشکر و قدردانی می‌شود. همچنین از مرکز تحقیقات سل و عفونی کودکان دانشگاه علوم پزشکی اراک به علت پشتیبانی تجهیزات و امکانات و از کلیه همکارانی که ما را در این پژوهش یاری نموده اند صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

References

(1) Fair E, Hopewell P, Pai M, international standards for tuberculosis care :revisiting the cornerstones of tuberculosis care and control. *expert rer anti infect ther* 2007;5 (1): 5– 61.

(2) World Health Organization. 2007: Tuberculosis facts. Available at: http://www.WHO.int/tb/publications/2007/factsheet_2007.pdf . Accessed january 14, 2008

(3) Harries A, Dye C, Tuberculosis .*Ann Trop Med Parasitol* 2006; 100(5-6):415-31.

(4) Pineda-Garcia L, Ferrera A, Hoffner Se, DNA Fingerprinting Of Mycobacterium Tuberculosis Strains From Patients With Pulmonary Tuberculosis In Honduras. *J Clin Microbiol* 1997;35(9):2393-7.

(5) Caminero J, Pena M, Campos-Herrero M, Rodríguez J, García I, Cabrera P, et al. Epidemiological Evidence Of The Spread Of A Mycobacterium Tuberculosis Strain Of The Beijing Genotype On Gran Canaria Island. *Am J Respir Crit Care Med* 2001 164(1):1165-70.

(6) Calver A, Falmer A, Murray M, Strauss O, Streicher E, Hanekom M, et, al. Emergence of increased resistance and extensively drug-resistant tuberculosis despite treatment adherence, South africa. *emerg infect dis* 2010; 16: 264–71.

(7) Keshavjee S, Gelmanova I, Farmer P, Mishustin S, Strelis A, Andreev Y, et al. Treatment of extensively drug-resistant tuberculosis in Tomsk, Russia: a retrospective cohort study. *The Lancet* 2008; 372(9647):1403-9.

(8) Hopewell P, Pai M, Maher D, Uplekar M, Raviglione M. International standards for tuberculosis care. *Lancet Infect Dis.* 2006 ;6(11):710-25.

(9) Magnet S, Blanchard J. Molecular insights into aminoglycoside action and resistance, *Chem Rev* 2005; 105(2):477-98.

(10) Tsukamura, M. Cross-Resistance Relationships Between Capreomycin, Kanamycin, And Viomycin Resistances In Tubercle Bacilli From Patients. *Am Rev Respir Dis* 1969; 99(5):780-2.

(11) Trnka L, Smith D. Proteosynthetic activity of isolated ribosomes of Mycobacteria and its alteration by rifampicin and related tuberculostatic drugs. *Antibiot Chemother* 1970; 16:369-79.

(12) Jugheli L, Bzekalava N, De Rijk P, Fissette K, Portaels F, Rigouts L. High Level Of Cross-Resistance Between Kanamycin, Amikacin, And Capreomycin Among Mycobacterium Tuberculosis Isolates From Georgia And A Close Relation With Mutations In The *Rrs* Gene. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;

(13) Tahmasebi P, Sheikolslami F, Farnia P, Sadeghizadeh M, Ramazanzadeh R, Kazempoor M, et al. Detection of amikacin-resistance among MDR strains of Mycobacterium Tuberculosis by using PCR-RFLP Method. *j ardabil univ med Sci* 2011; 11(4): 345-53.

(14) Sirgel F. Tait M. Warren R. Streicher E. Böttger E. Van Helden P. et al. Mutations In The *Rrs* A1401g Gene And Phenotypic Resistance To Amikacin And Capreomycin In Mycobacterium Tuberculosis. *Microb Drug Resist*. 2012; 18(2):193-7.

(15) N Honoré, G Marchal, S T Cole Novel Mutation In 16s Rrna Associated With Streptomycin Dependence In Mycobacterium Tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39(3): 769–770.

(16) Alangaden G, Kreiswirth B, Aouad A, Khetarpal M, Igno F, Moghazeh S, et al. Mechanism Of Resistance To Amikacin And Kanamycin In Mycobacterium Tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42(5):1295-7.

(17) Suzuki Y, Katsukawa C, Tamaru A, Abe C, Makino M, Mizuguchi Y, et al. Detection Of Kanamycin-Resistant Mycobacterium Tuberculosis By Identifying Mutations In The 16s Rrna Gene. *J Clin Microbiol* 1998; 36(5):1220-5.

(18) Maus C, Plikaytis B, Shinnick T. Mutation of *tly*A confers capreomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*, *antimicrob agents chemother* 2005; 49: 571–577.

(19) Vadwai V, Shetty A, Rodrigues C, Multiplex Allele Specific Pcr For Rapid Detection Of Extensively Drug Resistant Tuberculosis. Tuberculosis. *Tuberculosis* 2012; 92(3):236-42.

(20) Ajbani K, Rodrigues C, Shenai S, Mehta A, Mutation Detection And Accurate Diagnosis Of Extensively Drug-Resistant Tuberculosis: Report From A Tertiary Care Center In India. *J Clin Microbiol* 2011;49(4):1588-90.

(21) Perdigão J, Macedo R, Malaquias A, Ferreira A, Brum L, Portugal I, Genetic Analysis Of Extensively Drug-Resistant Mycobacterium Tuberculosis Strains In Lisbon, Portugal, *J Antimicrob Chemother*. 2010; 65(2):224-7.

(22) Evans J, Segal H. Novel Multiplex Allele-Specific Pcr Assays For The Detection Of Resistance To Second-Line Drugs In Mycobacterium Tuberculosis, *J Antimicrob Chemother* 2010; 65(5):897-900.

(23) Feuerriegel S, Cox Hs, Zarkua N, Karimovich Ha, Braker K, Rüsch-Gerdes S, et al, Sequence Analyses Of Just Four Genes To Detect Extensively Drug-Resistant Mycobacterium Tuberculosis Strains In Multidrug-Resistant Tuberculosis Patients Undergoing Treatment, *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53(8):3353-6.

---

[1]. Sequencing
[2]. Tsukamura
[3]. Suzuki
[4]. Sirgel
[5]. Viral Vadwai
[6]. J. Evans and H Segal
[7]. Kanchan Ajbani
[8]. Joa˜O Perdiga˜O
[9]. Suzuki
[10]. Silke Feuerriegel
[11]. Alangaden

Designing and comparison study of rapid detection methods of resistance to injectable drugs in clinical strains of *Mycobacterium tuberculosis*

Fatemeh Salehi
M.Sc. student of Microbiology, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Kordestan, Iran, fatemeh.salehiarak@yahoo.com
Bahareh Rahimiyan Zarif
Assistant Professor of Microbiology, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Kordestan, Iran, bahareh_r_z@yahoo.com
Azam Ahmadi
Ph.D student of Molecular Genetics, Tuberculosis and Pediatric Infectious Research Center University of Medical Sciences, Arak, Iran, ahmadia22@yahoo.com
Mana Shojapour
Ph.D student of Molecular Medicine, Research Center of Molecular Medicine, University of Medical Sciences, Arak, Iran, mana_shojapuor@yahoo.com
Toktam Polad
M.Sc. student of Microbiology, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Kordestan, Iran, t.poolad @yahoo.com
Mohammad Arjomandzadegan *
Assistant Professor of Medical Bacteriology, University of Medical Sciences, Arak, Iran, arjomandzadegan@arakmu.ac.irn

Abstract

Introduction: In this study, some molecular methods were designed for rapid detection of resistance to kanamycin and amikacin.

Materials and methods: Among 120 clinical isolates of *mycobacterium tuberculosis*, 70 strains were selected for evaluation of possible mutations. A PCR-RFLP method was designed for detection of wild type (using enzyme *ajii*) and mutant from (*BstFNI* enzyme) of the isolates. Furthermore, allele specific method (as PCR) was designed for detection mutations in codons 1401 and 1402 gene *rrs*. Some selected isolates were sequenced.

Results: In PCR-RFLP method, among the 70 strains examined by *BstFNI* enzyme, could detect 17 mutant strains among 24 phenotypicaly resistant and 44 non-mutant isolates from 46 susceptible isolates. The sensitivity of this method was %70.83 and specificity was %95.65 on the other hand, 12 mutant from 20 resistant strains and 29 non-mutant strains from 32 susceptible strains were detected by *AjiI* enzyme. The sensitivity and specificity of this method was 60 and %90.62, respectively. In MAS PCR, 3 mutants from 6 resistant strains and 12 non-mutants from 17 resistant strains were detected. The sensitivity of this method was 50 and specificity was 70.58. Results of sequencing method confirmed the results of molecular methods.

Discussion and conclusion: PCR-RFLP method by *BstFNI* enzyme was the best method for rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* resistant to second-line injectable drugs and was recommended for routine use.

Key words: *Mycobacterium Tuberculosis*, Kanamycin and Amikacin, resistance, PCR-RFLP

* Corresponding Author, Tuberculosis and Pediatric Infectious Research Center And Department Of Microbiology, Arak University Of Medical Sciences, Iran, mmatinam81@yahoo.com, arjomandzadegan@arakmu.ac.irn
Received: August 11, 2012/ **Accepted:** December 29, 2012