بررسی مقاومت‌های دارویی در بیماران مبتلا به سل با استفاده از تکنیک Real Time PCR

محیا موسوی[۱]، هادی امراللهی[۲*]

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران
۲- بخش قارچ شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران
*مسئول مکاتبات: hadiamrollahi@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۰/۵ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۲/۱۱

چکیده

سل یک بیماری واگیردار بوده و عامل آن *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* است. مقاومت به دو داروی اصلی ایزونیازید و ریفامپین را مقاومت چند دارویی سل (MDR-TB) می‌نامند. این مطالعه به بررسی گونه آلوده کننده بیماران استان سمنان از طریق بررسی حضور یا عدم حضور قطعه *IS6110* در نمونه‌ها و هم‌چنین بررسی وجود مقاومت یا عدم وجود آن در نمونه‌ها نسبت به دو آنتی‌بیوتیک ریفامپین و ایزونیازید از طریق تکنیک Real Time PCR پرداخته است. نمونه‌های بزاق جمع‌اوری شده از بیماران مسلول در محیط کشت L-J کشت داده شدند و سپس استخراج DNA از باکتری‌ها با استفاده از تکنیک CTAB انجام شد و نمونه‌ها جهت تعیین مقاومت یا عدم مقاومت از طریق Real Time PCR مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین نمونه‌ها با استفاده از تکنیک PCR معمولی با استفاده از پرایمر اختصاصی IS6110 جهت تعیین توبرکلوزیس بودن یا نبودن مورد بررسی قرار گرفتند. از ۲۱ نمونه بالینی مورد مطالعه، ۱۷ مورد *مایکوباکتریوم توبر کلوزیس* و ٤ مورد غیرتوبرکلوزیس بودند همچنین تمامی نمونه‌ها حساس به آنتی‌بیوتیک تشخیص داده شدند. با کمک تکنیک تشخیصی Real Time PCR بررسی ژن‌های مربوط به مقاومت آنتی‌بیوتیکی در کوتاه‌ترین زمان ممکن (کمتر از یک روز) و با دقت و اختصاصیت بالا در همان بدو تشخیص بیماری انجام می‌پذیرد، در این تحقیق خوشبختانه تمامی نمونه‌های بالینی حساس به دو آنتی‌بیوتیک ریفامپین و ایزونیازید بودند که از علل احتمالی این امر می‌توان به کنترل موفق این بیماری توسط مراکز درمانی از طریق معاینات پی‌درپی بیماران و همچنین امار کم مهاجرین در این استان اشاره کرد.

کلمات کلیدی: ژن *RpoB*، ژن *KatG*، توالی *IS6110* ، Real Time PCR، MDR-TB، تکنیک CTAB.

مقدمه

سل (TB) یک بیماری واگیردار است که توسط باکتری *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* ایجاد می‌شود که اغلب در ریه‌ها تاثیر می‌گذارد [۱۲]. سل یک بیماری قابل درمان است. در اکثر موارد، بیماری سل حساس به دارو است و با یک دوره شش ماهه استاندارد از چهار داروی ضدمیکروبی قابل درمان است [۳]. باکتری که باعث بیماری سل می شود می‌تواند به داروهای ضد میکروبی که برای درمان این بیماری استفاده می‌شود؛ مقاوم شود. مقاومت چند دارویی سل (MDR-TB) یعنی مقاومت به دو دارو اصلی ایزونیازید و ریفامپین است، این دو از قوی ترین داروهای ضد سل هستند [۱۳]. در این تحقیق مقاومت به دو داروی ریفامپین و ایزونیازید مورد بررسی قرار گرفته است که از داروهای بسیار مهم و تاثیرگذار در درمان سل به شمار می‌روند. علت اصلی مقاومت به چند دارو سوء مدیریت درمان سل و انتقال فرد به فرد است. بیشتر افراد مبتلا به سل رژیم درمانی شش ماهه را دریافت می‌کنند که این بیماران، به حمایت و نظارت ارائه درمان نیاز دارند. استفاده نامناسب و یا نادرست از داروهای ضد میکروبی و یا استفاده از رژیم‌های بیهوده و بی‌اثر و یا قطع درمان زودرس می‌تواند در برابر داروها مقاومت ایجاد کند [۱۳]. داروهای استاندارد ضد سل برای دهه‌ها استفاده شده است و مقاومت به دارو در حال افزایش است. گونه های مقاوم به یک داروی ضد سل، سل مقاوم تک دارویی می باشد که در تمامی کشورها

یافت می‌شود. سل مقاوم به چند دارو (MDR-TB) یک فرم از سل مقاوم است که حداقل به دو داروی ایزونیازید و ریفامپین پاسخ نمی‌دهد، این دو دارو از قدرتمندترین داروهای خط اول (و یا استاندارد) ضد سل هستند. علت اصلی MDR- TB مصرف نامنظم داروهای ضد سل است [۷].

از ان جایی که اطلاع از نوع سویه *مایکوباکتریوم* الوده کننده بیماران می‌تواند در پیگیری منشا بیماری و نوع درمان تاثیرگذار باشد ما در این تحقیق از طریق تکنیک ملکولی Real Time PCR و با توجه به حضور انحصاری قطعه*IS6110* در نمونه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (٤)، به تعیین توبر کلوزیس بودن یا نبودن باکتری‌های آلوده کننده بیماران مبتلا در شهر سمنان پرداخته شد. تعداد کپی‌ها و مکان قرارگیری این توالی‌ها در سویه‌های مختلف متفاوت می باشد و به همین دلیل از *IS6110* به عنوان یک ابزار دقیق در مطالعات اپیدمیولوژیکی به منظور تشخیص سویه‌ها استفاده می‌شود [۹].

از عوامل کلیدی در کنترل سل، تشخیص سریع عامل ایجاد بیماری و ردیابی منشا عفونت می‌باشد و این ردیابی نیاز به تعیین سویه‌های مایکوباکتریوم دارد که از روش‌های رایج ازمایشگاهی امکان‌پذیر نمی‌باشد. استفاده از تکنیک Real Time PCR این امکان را فراهم می‌آورد که در مدتی کوتاه و با دقت بسیار بالا بتوان سویه‌های مایکوباکتریوم الوده کننده بیماران را تشخیص داده و راه درمانی مناسب را در پیش گرفت [۱]. تا کنون در استان سمنان تست تشخیصی ملکولی جهت تعیین مقاومت یا عدم مقاومت بیماران مسلول نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های ضد سل انجام نشده است در صورتی که با کمک تکنیک تشخیصی Real Time PCR بررسی ژن‌های مربوط به مقاومت آنتی‌بیوتیکی در کوتاه‌ترین زمان ممکن (کمتر از یک روز) و با دقت و اختصاصیت بالا در همان بدو تشخیص بیماری انجام می‌پذیرد. امروزه از این تکنیک به عنوان روشی دقیق و سریع برای تشخیص انواع مختلف میکروارگانیسم‌ها از جمله مایکوباکتریوم استفاده می‌شود [۲، ١٤].

مواد و روش کار

در این بررسی از نمونه خلط بیماران که بین سل‌های ۹۱ تا ۹۳ از شهرستان‌های سمنان و مهدیشهر جمع آوری شده بود استفاده شد. نمونه‌های خلط پس از جمع‌آوری شدن و شناسایی (از طریق تکنیک رنگ‌آمیزی با متیلن بلو و مشاهده باکتری زیر میکروسکوپ) توسط مرکز سل استان سمنان و تایید مثبت بودن نمونه‌های در دسترس برای کشت مجدد و بررسی‌های ملکولی مورد بررسی قرار گرفت.۲۲ نمونه از کشت‌های مثبت جمع اوری شده از بیماران در محیط لوین اشتاین جنسون کشت داده شدند و جهت نگه داری و رشد باکتری‌ها به مدت هشت هفته در انکیباتور ۳۷ درجه نگهداری شدند. جهت استخراج DNA از نمونه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از تکنیک CTAB استفاده شد.

در مرحله اول به منظور اطمینان از توالی صحیح پرایمرها و هم چنین بهینه سازی شرایط برای مرحله Real Time PCR تمامی نمونه‌ها با هر سه پرایمر *IS6110*، *KatG*، *RpoB* مورد بررسی قرار گرفتند. در جدول زیر مواد مورد نیاز و مقادیر مربوط بهPCR نمونه‌ها آورده شده است.

مواد و وسایل لازم **برای انجام واکنش** Real Time PCR:

مقادیر مربوطه برای انجام واکنش Real Time PCR پس از بهینه شدن دمای انلینگ و حجم مناسب از DNA برای هر دو پرایمر ژن *KatG* و *RpoB* در جدول زیر آمده است. حجم نهایی هر لوله با اضافه کردن ملزومات Real Time PCR به ۲۰ میکرولیتر رسید.

جدول ۱- مقادیر مربوط به PCR نمونه‌ها

DNA Master Mix	۱۰ µl
Template DNA	3 µl
Forward Primer	1 µl
Reverse Primer	1 µl
H2O	5 µl

جدول ۲- مقادیر مربوط به Real Time PCR

SYBR Premix Taq	10 µl
Forward primer	1 µl
Reverse primer	1 µl
Template DNA(70ng/µl)	0/2-1 µl
H2O	7 µl

جدول ۳- توالی پرایمرهای مورد استفاده برای شناسایی سویه توبرکلوزیس و سویه های مقاوم به ریفامپین و ایزونیازید

ژن مورد نظر	توالی پرایمر	اندازه محصول
IS6110	GCCGGTCGAACTCGAGGCTG CCGACCGCTCCGACCGACGGT	bp ۱۲۳
KatG	GAAACAGCGGCGCTGATCGT GTTGTCCCATTTCGTCGGGG	bp ۱۵۸

جدول ٤- برنامه PCR

Stage	Temprature	Time	Cycle Number
Initial	95	3 min	
Denaturation	95	1 min	۳۰
Annealing	60	30 s	
Extention	72	30 s	
Final Extension	۷۲	5 min	

جدول ۵- برنامه Real Time PCR برای ژن *katG*

Cycle	Cycle Point
Hold at 95°c, 0 min 30 secs	
Cycling (40 repeats)	Step 1 at 95°c, hold 5 secs
	Step 2at 60°c, hold 30 secs, acquiring to Cycling A
Hold 24 at 95°c, 0 min 15 secs	
Hold 3 at 60°c, 0 min 30 secs	
Hold 24 at 95°c, 0 min 15 secs	
Melt (55-88°c) , hold secs on the 1st step, hold 5 secs on next steps, Melt A([Green][1][1])	

جدول ٦- برنامه Real Time PCR برای ژن *RpoB*

Cycle	Cycle point
Hold at 95°c, 0 min 30 secs	
Cycling (40 repeats)	Step 1 at 95°c, hold 5 secs
	Step 2 at 60°c, hold 30 secs, acquiring to Cycling A
Hold 24 at 95°c, 0 min 15 secs	
Hold 3 at 60°c, 0 min 30 secs	
Hold 24 @ 95°c, 0 min 15 secs	
Melt (55-88°c) , hold secs on the 1st step, hold 5 secs on next steps, Melt A([Green][1][1])	

نتایج

در این مطالعه ۲۱ نمونه کشت مثبت مایکوباکتریوم از بیماران مسلول مراجعه‌کننده به آزمایشگاه سل مرکز بهداشت دانشگاه علوم پزشکی سمنان؛ طی سال‌های۱۳۹۲ و سه ماه اول سال ۱۳۹۳ مورد بررسی قرار گرفته است. این بیماران که نمونه خلط آن‌ها مورد بررسی قرار گرفته است طی آزمایشات تشخیصی از نظر آلودگی به مایکوباکتریوم همگی اسمیر و کشت مثبت بوده‌اند.

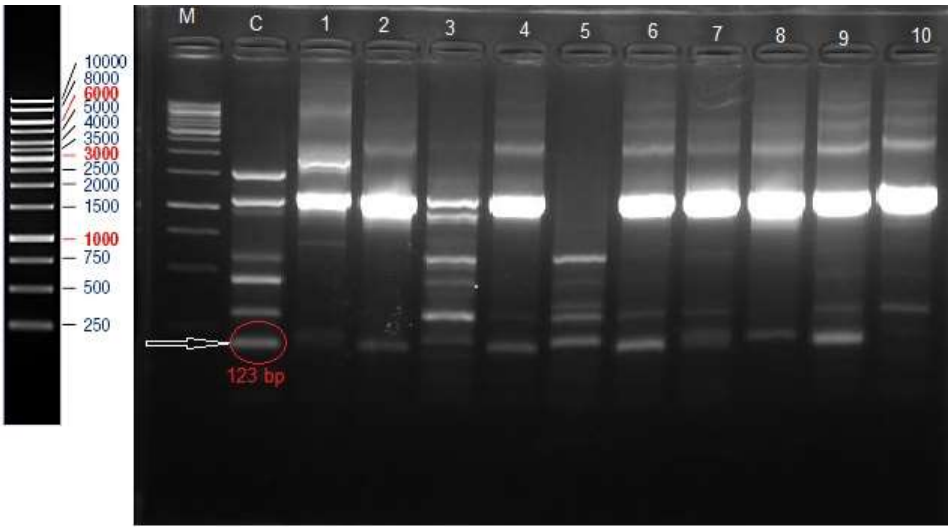
PCR ژن *IS6110*: ۲۱ نمونه *مایکوباکتریوم* با استفاده از پرایمر اختصاصی قطعه *IS6110* مورد بررسی قرار گرفتند. شکل ۱ نتایج حاصل از PCR نمونه‌های DNA مایکوباکتریوم‌ها را روی ژل آگارز نشان می‌دهد.

بهینه‌سازی ژن *kat* G و *rpoB* با استفاده از تکنیک PCR: شکل ۲ نتایج حاصل از PCR نمونه‌های DNA استخراج شده در حضور پرایمرهای ژن‌های *katG* و*rpoB* را نشان می‌دهند. شکل ۵ تأییدی بر حضور ژن های *katG* و *rpoB* در نمونه‌های مورد بررسی می‌باشد و با نمونه کنترل مثبت که مطمین بودیم حاوی هر دو ژن نامبرده می‌باشد مقایسه شد، پس از چندین بار PCR دمای انلینگ (Annealing) دقیق پرایمرها جهت ادامه کار در Real Time PCR مشخص شد که برای ژن *KatG* ٦٠ درجه و برای ژن *rpoB* ۵۵ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد. محصول PCR ژن *rpoB* قطعه‌ای با توالی ۱۵۸ جفت باز است که تمامی نمونه‌ها با این پرایمر هیبرید شده و توالی مورد نظر را تکثیرشد، در نتیجه در الکتروفورز ژل آگارز باند مربوطه قابل مشاهده بود. نمونه‌های ٦ تا ۹ نماینده‌ای از ۲۱ نمونه‌ای هستند که همگی دارای قطعه ژن *rpoB* بودند و هم‌چنین نمونه‌های ۲ تا ۵ هم نماینده‌ای از تمامی ۲۱ نمونه‌ای هستند که حاوی ژن *KatG* با طول ۲۰۹ جفت باز بودند.

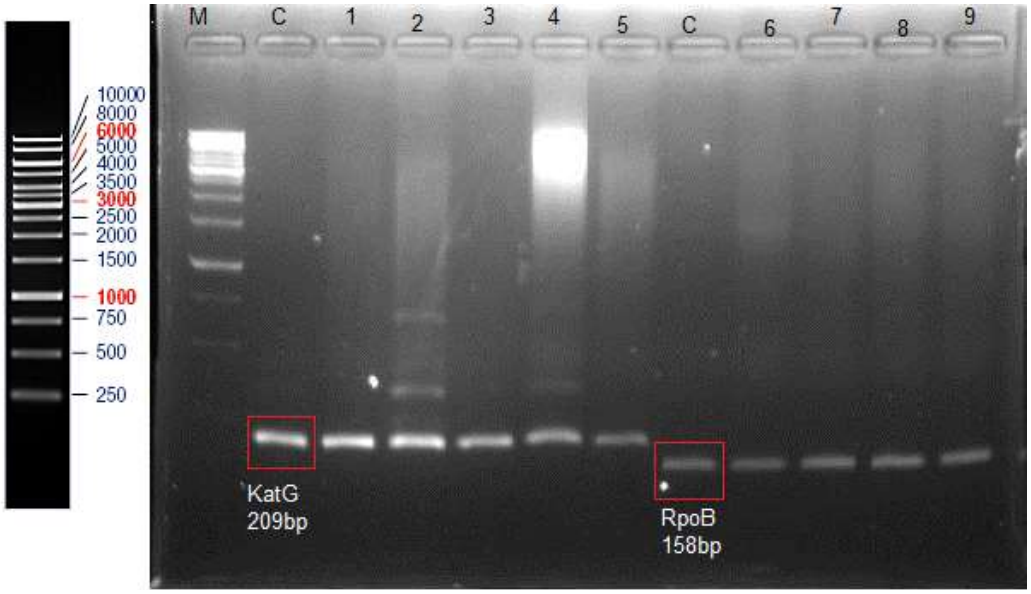
Real Time PCR ژن *katG*: نمودار ۱ نتایج حاصل از Real Time PCR بر روی نرم افزار متصل به دستگاه به‌صورت منحنی ذوب نمونه‌ها را نشان می‌دهد و در هر لحظه ثبت داده‌های حاصل از هر مرحله تکثیر ژن به صورت نموداری روی صفحه کامپیوتر مشاهده می‌شود. از آن‌جایی که هدف از این مطالعه بررسی مقاومت‌های دارویی در نمونه‌های مایکوباکتریوم با استفاده از تکنیک آنالیز منحنی ذوب و مقایسه آن با منحنی حاصل از نمونه استاندارد می‌باشد پاسخ نهایی به سوال اصلی این تحقیق، بصورت نتایج Real Time PCR بر اساس دو نمودار که نشان‌دهنده تغییرات فلورسانس در واحد زمان در هر لحظه از تغییر در دمای دستگاه می‌باشد که نمودار ۱ تغییرات جذب فلورسانس مربوط به ژن *kat*G را نشان می‌دهد و نمودار ۵ تغییرات جذب فلورسانس را برای برای ژن*rpo*B نشان می‌دهد. وجود الگوی منحنی ذوب مشابه در تمامی نمونه‌ها و مقایسه آن با الگوی منحنی ذوب نمونه استاندارد (منحنی صورتی رنگ) که دارای ژن katG به‌صورت وحشی و حساس به آنتی‌بیوتیک ایزونیازید می‌باشد نشان می‌دهد که تمامی نمونه‌های

مورد بررسی نیز حساس به آنتی‌بیوتیک ایزونیازید می‌باشند.

Real Time PCR ژن *RpoB*: نمودار ۲ منحنی ذوب مربوط به ژن *rpoB* در نمونه های بالینی را نشان می‌دهد. این نمودار که مشابه نمودار ٤ می‌باشد منحنی ذوب نمونه‌های مایکوباکتریوم و همچنین سوش کنترل مثبت H37rv را نشان می‌دهد. در این‌جا نیز مشاهده می‌شود که منحنی دمای ذوب نمونه استاندارد کنترل مثبت ۵۸ درجه است و تمامی نمونه‌های بالینی که به رنگ‌های قرمز، آبی، زرد و بنفش نشان داده شده‌اند از الگویی مشابه با کنترل مثبت پیروی می‌کنند پس نتیجه می‌گیریم تمامی نمونه‌ها حساس به آنتی‌بیوتیک ریفامپین بوده‌اند.

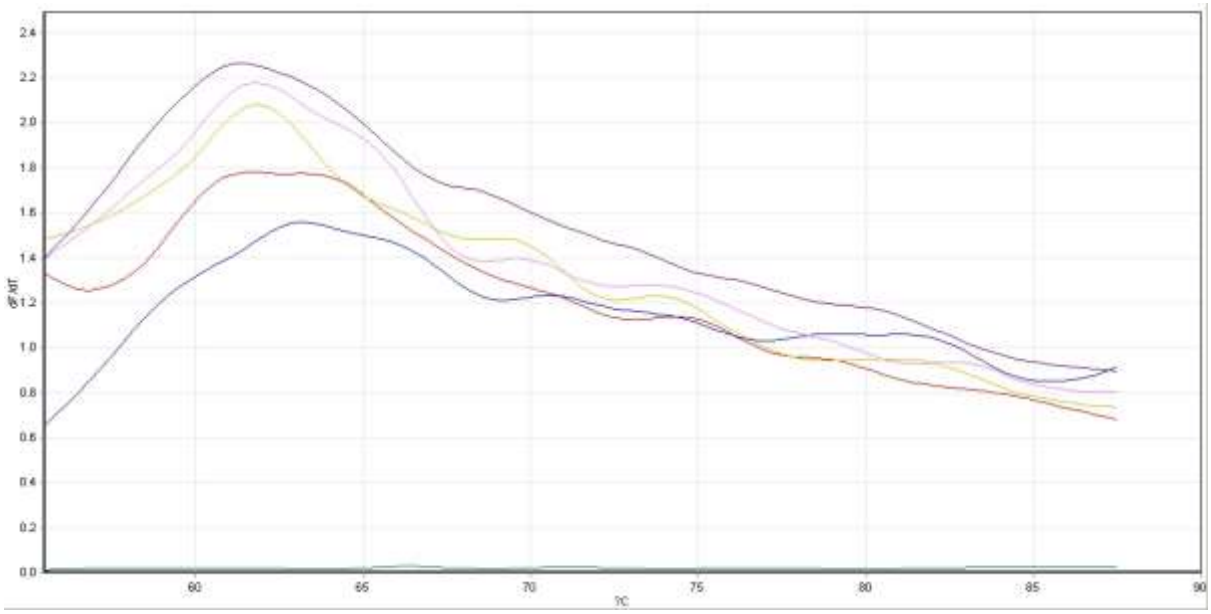


شکل ۱ـ نتایج حاصل از PCR نمونه‌های DNA *مایکوباکتریوم*. حرف M مارکر 1kb، حرف C کنترل مثبت مایکوباکتریوم توبرکلوزیس سوش H37rv تهیه شده از مرکز سل موسسه انستیتو پاستور ، نمونه‌های ۱ تا ۹ باند مشاهده می شود توبرکلوزیس هستند و نمونه ۱۰ باند مشاهده نمی‌شود غیرتوبرکلوزیس است. دایره قرمز رنگ باند مربوط به ژن *IS6110* با اندازه bp۱۲۳ در سوش استاندارد را نشان می‌دهد.

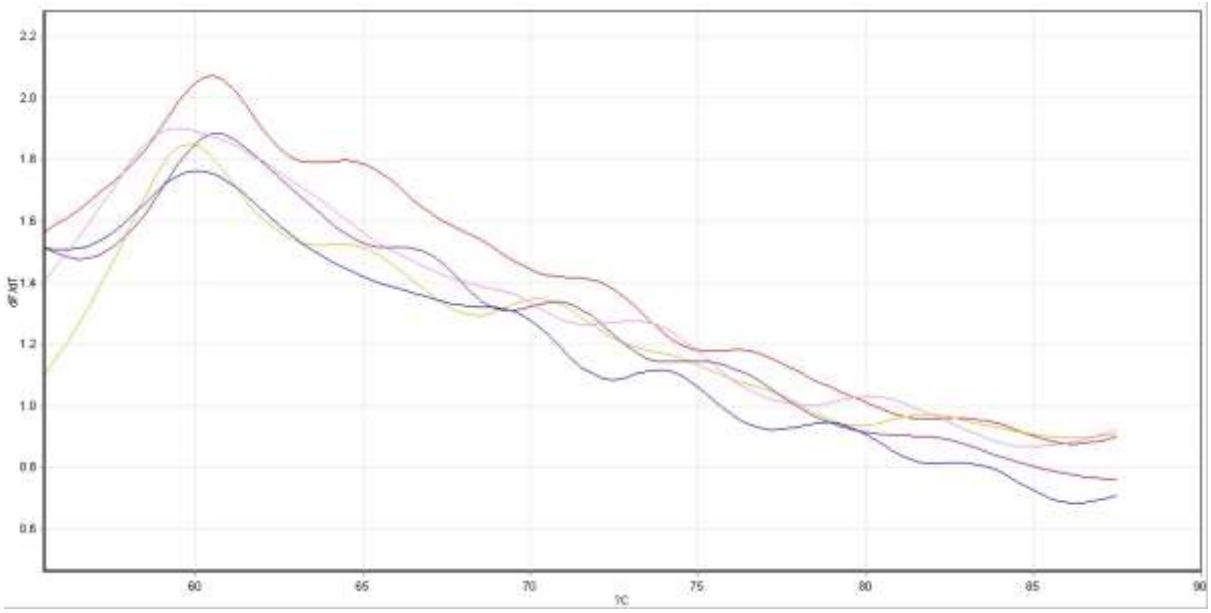


شکل۲ـ نتایج PCR ژن های *KatG* و *rpoB*. حرف M مارکر 1kb، حرف C کنترل مثبت مایکوباکتریوم توبرکلوزیس سوش H37rv تهیه شده از مرکز سل موسسه انستیتو پاستور، نمونه‌های ۱تا ۵ نمونه‌های مایکوباکتریوم PCR شده با پرایمر ژن *KatG* .مربع قرمز سمت چپ نمونه استاندارد که حساس به آنتی‌بیوتیک ایزونیازید و دارای ژن *katG* فاقد جهش است.نمونه‌های ٦تا۹ نمونه‌های مایکوباکتریوم

PCR شده با پرایمرژن *rpoB* می‌باشند . مربع قرمز راست نمونه استاندارد که حساس به آنتی‌بیوتیک ریفامپین و دارای ژن *rpoB* فاقد جهش می باشد.



نمودار ۱ـ منحنی ذوب نمونه‌های *مایکوباکتریوم* در حضور پرایمر *katG*. خط افق دمای ذوب بر حسب درجه سانتی‌گراد و خط عمود شدت فلورسانس جذب شده در واحد زمان را نشان می‌دهد. منحنی سبز که دقیقا روی محور افق قراردارد: کنترل منفی: اب مقطر است. منحنی صورتی: کنترل مثبت(سوش H37Rv) است. منحنی‌های قرمز،ابی ،زرد و بنفش نمونه‌های مایکوباکتریوم را نشان می‌دهد. (این گزارشات توسط نرم افزار Rotor gene سری ٦٠٠٠ تهیه شده است.)



نمودار ۲ـ منحنی ذوب ژن *RpoB* در نمونه‌ها ی مایکوباکتریوم. خط افق دمای ذوب بر حسب درجه سانتی‌گراد و خط عمود شدت فلورسانس جذب شده در واحد زمان را نشان می‌دهد. منحنی سبز که دقیقا روی محور افق قراردارد: کنترل منفی: اب مقطر است. منحنی صورتی :کنترل مثبت(سوش H37Rv) است و منحنی های قرمز،ابی ،زرد و بنفش نمونه‌های مایکوباکتریوم را نشان می‌دهد. (این گزارشات توسط نرم افزار Rotor gene سری ٦٠٠٠ تهیه شده است.)

بحث

در این مطالعه میانگین سنی افراد مبتلا ۵۰ سال می‌باشد. از نظر نژاد، بیشتر مبتلایان ایرانی بوده و تنها ۳۳٪ از مبتلایان، افغانی می باشند. با توجه به این‌که اکثر مبتلایان به سل مقاوم در کشور را مهاجرین از سایر کشورها (افغانستان و پاکستان) و هم‌چنین مهاجرین داخلی از سایر استان‌ها (زابلی‌ها)، تشکیل می‌دهند [۱۰، ۱۱]. استان سمنان به نسبت سایر استان‌ها (نظیر مازندران و سیستان و بلوچستان) به جهت موقعیت جغرافیایی مهاجران کمتری دارد پس انتظار می‌رفت که مبتلایان به سل مقاوم در این مطالعه کمتر از سایر مطالعات باشد و نتایج صحه‌ای بر این فرضیه گذاشت به طوری که تمامی ۲۱ نمونه مورد بررسی حساس به دو آنتی‌بیوتیک ریفامپین و ایزونیازید تشخیص داده شدند. شکل ٤ نشان‌دهنده نتایج حاصل از conventional PCR نمونه‌های DNA استخراج شده از کشت‌های مثبت مایکوباکتریوم می‌باشد که بر روی ژل آگارز run شده‌اند، به‌عنوان کنترل مثبت از سوش H37rv مایکوباکتریوم توبرکلوزیس استفاده شد که این سوش حساس به آنتی‌بیوتیک و دارای ژن IS6110 می‌باشد که در PCR نیز قطعه ۱۲۳جفت بازی موجود در این سوش توسط پرایمر شناسایی و تکثیر شده است که در شکل با باندی قابل مشاهده است. تمامی نمونه‌ها با این کنترل مثبت مقایسه گردید و ۸۰٪ نمونه‌ها دارای باند و ۲۰٪ آن‌ها فاقد باند در ناحیه ۱۲۳ جفت بازی بودند. جاوید و همکاران [٦] بر روی ۱۰۸ نمونه کشت مثبت مایکوباکتریوم جمع‌آوری شده از مسلولین استان گلستان با استفاده از پرایمر اختصاصی ژن IS6110 آزمایش PCR معمولی را انجام دادند و با توجه به اینکه مشاهده باند در ژل الکتروفورز دال بر حضور این قطعه اختصاصی در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس دارد به این نتیجه رسیدند که از ۱۰۸ نمونه مورد بررسی ۸۷ مورد توبرکلوزیس و ۲۱ مورد غیرتوبرکلوزیس بودند [٦]. در این تحقیق نیز با استفاده از تکنیک مشابه، از ۲۱ نمونه مایکوباکتریوم، ۱۷ مورد توبرکلوزیس و ٤ مورد غیرتوبرکلوزیس تشخیص داده شد. هم‌چنین در این تحقیق بیشترین گروه سنی مبتلایان مربوط به سنین بالای ٦۰ سال گزارش شده بود که تا حدودی با داده های سنی مطالعه ما (بالای ۵۰ سال سن) مطابقت داشت. از آن‌جایی که SYBR Green نمی تواند بین محصولات مختلف تفاوتی قائل باشد می‌توان با استفاده از آنالیز منحنی ذوب تنوع محصولات را در فرآیند PCRمشخص کرد. بعد از اینکه PCR به پایان رسید دستگاه قادر است نمودار ذوب هر نمونه را رسم کند. این کار بوسیلهٔ اندازه‌گیری تغییرات فلورسانس در دماهای مختلف صورت می‌گیرد. نرم‌افزار، سرعت تغییرات را به صورت RFU (Relative Fluorescence Unite) در محور yو دمای دستگاه را در محور x نشان می‌دهد [۸].

پیک نمودار٤ که مربوط به بیشترین تغییرات فلورسانس در واحد زمان است در دمای ٦٤ درجه برای تمامی نمونه‌ها دیده می‌شود، همین امر نشان‌دهنده این است که قطعه ژن مورد نظر پس از اتصال به پرایمر در دمای ٦٤ شروع به تکثیر کرده و در واقع اتصال پرایمر که منجر به اتصال سایبرگرین به منطقه مورد نظر و ساطع شدن نور فلورسانس می‌شود در این دما رخ داده و نمونه‌های مایکوباکتریوم نیز دقیقا الگویی مشابه با منحنی ذوب نمونه استاندارد را که دارای ژن katG بصورت وحشی (فاقد جهش) می‌باشند پس نتیجه می‌گیریم که تمامی نمونه‌های مورد بررسی از مایکوباکتریوم‌های آلوده کننده بیماران مسلول مراجعه کننده به آزمایشگاه سل مرکز بهداست دانشگاه علوم پزشکی سمنان، حساس به آنتی-بیوتیک ایزونیازید و فاقد جهش در منطقه bp ۲۰۹ از ژن katG می‌باشند زیرا وجود کوچکترین جهش در سطح نوکلئوتیدی می‌تواند دمای ذوب و پیک فلورسانس نمونه را تغییر دهد.

نمودار ۵ نیز دقیقا مشابه نمودار ٤ منحنی ذوب نمونه‌های مایکوباکتریوم و سوش استاندارد را که به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته می‌شوند را نشان می‌دهد. بر طبق تفاسیری که در بالا ذکر شد این نمودار نیز الگوی مشابهی

را میان منحنی‌های ذوب مایکوباکتریوم‌ها و منحنی ذوب نمونه استاندارد نشان می‌دهد. از آن‌جایی که سوش استاندارد کنترل مثبت دارای ژن وحشی (فاقد جهش) rpoB می‌باشد و حساس به آنتی‌بیوتیک ریفامپین است، پس نتیجه می‌گیریم که تمامی نمونه‌های مورد بررسی از مایکوباکتریوم‌های آلوده کننده بیماران مسلول مراجعه کننده به آزمایشگاه سل مرکز بهداست دانشگاه علوم پزشکی سمنان حساس به آنتی‌بیوتیک ریفامپین و فاقد جهش در منطقه bp ۱۵۸ از ژنrpoB بوده‌اند و به درمان با این دارو پاسخ مثبت داده‌اند.

تکنیک Real Time PCR این توانائی را دارد که به طور قابل توجهی الگوهای رایج را برای ردیابی *مایکوباکتریوم* از هفته‌ها به ساعت‌ها تغییر دهد و تشخیصی حساس‌تر و اختصاصی‌تر داشته باشد. ردیابی موارد مقاوم به داروهای ضدسل برای مدیریت و بهبود مؤثر بیمارن ضروری است. همچنین این تکنیک قابلیت ردیابی ژن‌های جهش یافته مسئول مقاومت دارویی را در عرض چند ساعت از نمونه‌های بیماران دارد. بنابراین زمان مورد نیاز برای ردیابی نمونه مقاوم به دارو نسبت به روش‌های رایج که دو هفته زمان‌بر بود، بسیار کاهش می‌یابد. ژن‌های *rpoB* و *katG* اغلب از هدف‌های معمول برای مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در روش‌های Real Time PCR هستند و جهش‌های مقاومت به ریفامپین و ایزونیازید به ترتیب در این ژن‌ها به خوبی شناسایی شده‌اند [۵]. مهم‌ترین ژن‌های هدف دیگر مثل kasA، ahpC، oxyR و inhA برای برآورد مقاومت به ایزونیازید هنوز تا حدی بحث‌برانگیز هستند. بنابراین همه ژن‌های درگیر در مقاومت دارویی به خوبی تعیین مشخصات نشده‌اند و بنابراین روش‌های PCR توسعه یافته و روش‌های مبتنی بر کشت‌های سنتی با حساسیت بالا هنوز مورد نیاز است.

نتیجه‌گیری

نمونه‌های بالینی مایکوباکتریوم کشت داده شده از بزاق جمع‌آوری شده از بیماران مسلول مراجعه‌کننده به آزمایشکاه سل مرکز بهداشت دانشگاه علوم پزشکی سمنان، تا کنون از نظر نوع گونه مورد بررسی قرار نگرفته بودند و فقط بر اساس علائم بیمار، اسکن قفسه سینه، مشاهده باکتری زیر میکروسکوپ و کشت مثبت از ابتلای بیماران به بیماری سل اطمینان حاصل شده بود. در این تحقیق با بررسی نمونه‌های DNA استخراج شده از مایکوباکتریوم‌ها با تکنیک Conventional PCR نوع گونه مایکوباکتریوم‌ها مشخص شد. در رابطه با تعیین سوش-های نمونه‌های مایکوباکتریوم آلوده‌کننده بیماران مسلول، از آنجایی که وجود یا عدم وجود قطعه*IS6110* در نمونه‌های استخراج شده دال بر *توبرکلوزیس* بودن یا نبودن نمونه‌ها می‌باشد [٦]، در این تحقیق با مشاهده ۱۷ باند در ژل آگارز نتیجه گرفته شد که قطعه *IS6110* در ۱۷ نمونه DNA استخراج شده وجود داشته و توسط پرایمر این قطعه تکثیر شده و در ژل آگارز خود را نشان داده است پس از میان ۲۱ نمونه مورد بررسی ۱۷ نمونه از مایکوباکتریوم‌ها، توبرکلوزیس بودند. اما اگر باندی مشاهده نشود یعنی نمونه مورد نظر فاقد این شاخص بوده و در نتیجه توسط پرایمر مورد نظر شناسایی و تکثیر نشده است که ٤ مورد از ۲۱ نمونه مورد بررسی فاقد باند و بنابراین غیرتوبرکلوزیس تشخیص داده شدند. در مجموع، ۸۰ درصد نمونه‌ها مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و ۲۰ درصد مایکوباکتریوم غیرتوبرکلوزیس تشخیص داده شد.

تمامی ۲۱ نمونه بالینی توسط تکنیک Real Time PCR و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن‌های *KatG* و *RpoB* که به ترتیب وجود جهش در این ژن‌ها منجر به بروز مقاومت دارویی در باکتری نسبت به دو آنتی‌بیوتیک ایزونیازید و ریفامپین می‌شود، مورد بررسی قرار گرفتند. آنالیز نتایج این تکنیک بر پایه مقایسه منحنی‌های ذوب صورت گرفت. نمونه استاندارد مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (سوش H37rv) هر دو ژن *KatG* و *RpoB* را به صورت وحشی (فاقد جهش) دارا می‌باشد که همین امر منجر به حساسیت این باکتری به هر دو آنتی‌بیوتیک ایزونیازید و ریفامپین می شود. پس از انکه تمامی نمونه‌ها

به صورت جداگانه توسط Real Time PCR مورد بررسی قرارگرفتند نتایج حاصل از منحنی های ذوب این نمونه‌ها در حضور پرایمرهای نام برده شده مقایسه شد با منحنی ذوب نمونه استاندارد و مشخص شد که از الگویی مشابه تبعیت می‌کنند. این تشابه الگوی رفتاری در منحنی ذوب به معنای عدم وجود جهش در ژن های *KatG* و *RpoB* در نمونه‌های مورد بررسی است پس نتیجه گرفته شد که تمامی نمونه‌های بالینی فاقد هرگونه جهش و در نتیجه حساس به دو آنتی‌بیوتیک ایزونیازید و ریفامپین بودند.

منابع

1. An J.Y., Fan Z.M., Gao S.S., Zhuang Z.H., Qin Y.R., Li J.L., (2005), Loss of heterozygosity in multistage carcinogenesis of esophageal carcinoma at high-incidence area in Henan Province, China. *World Journal of Gastroenterology*, 11(14): 2055-2060.

2. Broccolo F., Scarpellini P., Locatelli G., Zingale A., Brambilla A.M., Cichero P. (2003), Rapid diagnosis of mycobacterial infections and quantitation of Mycobacterium tuberculosis load by two real-time calibrated PCR assays. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(10): 4565-4572.

3. Chan E.D., Iseman M.D. (2002), Current medical treatment for tuberculosis. *British Medical Journal*, 325(7375): 1282-1286.

4. Coros A., DeConno E., Derbyshire K.M. (2008), IS6110, a Mycobacterium tuberculosis complex-specific insertion sequence, is also present in the genome of Mycobacterium smegmatis, suggestive of lateral gene transfer among mycobacterial species. *Journal of Bacteriology*, 190(9): 3408-3410.

5. Espy M.J., Uhl J.R., Sloan L.M., Buckwalter S.P., Jones M.F., Vetter E.A. (2006), Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(1):165-256.

6. Javid S.N., Ghaemi E.A., Amirmozaffari N., Rafiee S., Moradi A., Dadgar T. (2009), Detection of Isoniazid and Rifampin Resistant Strain of Mycobacterium Tuberculosis Isolated from patients in Golestan province (North of Iran). *Medical Laboratory Journal*, 3(1):1-8.

7. Lewis J.M., Sloan D.J. (2015), The role of delamanid in the treatment of drug-resistant tuberculosis. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 11:779-791.

8. Matroodi S., Motallebi M., Zamani M., Moradyar M. (2013), Designing a new chitinase with more chitin binding and antifungal activity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(8):1517-1523.

9. McEvoy C.R., Falmer A.A., Gey van Pittius N.C., Victor T.C., van Helden P.D., Warren R.M. (2007), The role of IS6110 in the evolution of Mycobacterium tuberculosis. *Tuberculosis*, 87(5): 393-404.

10. Mirhaghani L., Nasehi M. (2009), National guidelines for TB control. 1st ed. Tehran: Andishmand Press; 222 pp

11. Mohamadi Azni S., Mansourian A.A., Nokandeh Z. (2008), Epidemiological study of tuberculosis in Damghan city (Iran) during 2003-2007. *Koomesh*, 9(4): 315-320.

12. Raviglione M.C., Snider D.E.Jr., Kochi A. (1995), Global epidemiology of tuberculosis. Morbidity and mortality of a worldwide epidemic. *Jama*, 273(3):220-226.

13. Sia I.G., Wieland M.L. (2011), Current Concepts in the Management of Tuberculosis. *Mayo Clinic Proceedings*, 86(4): 348-361.

14. Singh A., Kashyap V.K. (2012), Specific and Rapid Detection of Mycobacterium tuberculosis Complex in Clinical Samples by Polymerase Chain Reaction. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2012:1-5.