مقاله اصلی

نفس سال ۷، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۹، صفحات ۳۰ تا ۳۶

بررسی ژن مولد پیلی در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس حساس و مقاوم به دارو

زهرا نصیرزاده[۱]، پریسا فرنیا[۲*]، جمیله نوروزی[۱]، پوپک فرنیا[۳]، علی اکبر ولایتی[۲]

۱) گروه میکروب شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شمال تهران، تهران، ایران

۲) مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی، پژوهشکده سل و بیماری‌های ریوی، مرکز آموزشی، پژوهشی و درمانی سل و بیماری‌های ریوی بیمارستان دکتر مسیح دانشوری، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی، تهران، ایران

۳) گروه بیوتکنولوژی، دانشکده فن‌آوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

چکیده:

مایکوباکتریوم سل (M. tuberculosis) مسئول تعداد زیادی از مرگ و میر انسان است به دلیل توانایی آن سال‌ها در میزبان باقی می‌ماند بدون اینکه بیماری ایجاد کند. Pili در Mycobacterium tuberculosis (Mtp) واسطه تعامل بین پاتوژن و سلول‌های هدف خاص میزبان است و به عنوان عواملی که نقش اساسی در پاتوژنز باکتری دارند، مشاهده می‌شود. دراین مطالعه، ما ژن تولید کننده پیلی (Mtp) را در بین سویه‌های حساس و مقاوم جدا شده از نمونه‌های بالینی بررسی کردیم تا درک بهتری از زیست شناسی M. tuberculosis داشته باشیم.

ما از برخی روش‌های مبتنی بر PCR استفاده کرده‌ایم از جمله: PCR IS6110، Multiplex-PCR به عنوان روش‌های سریع مولکولی. 100 نمونه بیمار با استفاده از روش PCR IS6110 تشخیص داده شد، سپس جداسازی مقاومت چند دارویی و سویه‌های حساس و مقاوم انجام شد.

با انجام PCR، باند bp۲۶۳ برای ژن Mtp مشاهده شد. و ثابت شد که ژن Mtp در سویه‌های مایکوباکتریوم حساس و مقاوم به دارو به صورت محافظت شده وجود دارد. و این مطالعه به عنوان هدف اصلی برای مداخله درمانی و توسعه تست‌های تشخیصی مورد توجه است.

واژگان کلیدی: پیلی، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، مقاومت دارویی

* **نویسنده مسئول:**

دکتر پریسا فرنیا، مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی، پژوهشکده سل و بیماریهای ریوی، بیمارستان دکترمسیح دانشوری، دارآباد، تهران، ایران، پست الکترونیک: pfarnia@hotmail.com

مقدمه:

سل یکی از کشنده ترین بیماری بشر است که ناشی از *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* (M.tuberculosis)[1] است ، که مسئول تعداد زیادی از مرگ و میر انسان در طول تاریخ است (۱). علیرغم پیشرفت چشمگیر علوم پزشکی و ارتقا نسبی سبک زندگی ، سل هنوز هم به عنوان یک مشکل بهداشت عمومی باقی مانده است. در مناطق مختلف جهان، این باکتری ها توزیع زیادی ایجاد می‌کنند به گونه ای که سالانه نه میلیون انسان به سل آلوده می شوند و نسبتاً دو میلیون نفر از آنها بیمار می شوند (۲). با توجه به اهمیت این پاتوژن در وضعیت سلامت جهانی ، مبارزه با آن و جلوگیری از آن ضروری است. از آنجا که پیشگیری همیشه مهمترین گام در مبارزه با بیماری است و هزینه های کمتری به افراد تحمیل می شود، کاوش در روشهایی که منجر به اقدامات پیشگیرانه می شود از ارزش فوق‌العاده ای برخوردار است. در نتیجه، از ظهور سویه های مقاوم به دارو و سایر مواردی که ممکن است توسط این عوامل بیماری زا ایجاد شود ، جلوگیری می شود. بررسی انجام شده توسط سازمان بهداشت جهانی و اتحادیه بین المللی علیه سل و ریه در ۳۵ سایت جغرافیایی نشان داد که سل مقاوم به دارو در همه جا وجود دارد(۴-۳). به تازگی نواحی جدیدی با شیوع بالای سل مقاوم به چند دارو MDR[2] در کشورهای پرجمعیتی مثل چین و ایران شناسایی شده است. در ایران بین موارد جدید ابتلا به سل شیوع مقاومت به حداقل یک دارو به ۵ درصد میرسد و شیوع مقاومت چند دارویی در بین موارد قبلا درمان شده به ۴۸/۲ درصد می‌رسد (۵).

مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به عنوان یک باکتری بیماری زا دارای ضمائم چسبنده به نام پیلی است که به طور مستقیم یا غیرمستقیم در تعامل بین پاتوژن و سلولهای هدف میزبان خاص ایجاد می شود(۶-۷). پیلی[3] (Pili) ساختارهای رشته‌ای مستقیم یا انعطاف پذیری هستند که چندین ژن برای بیوسنتز آنها مورد نیاز است.چسبندگی و تجمع باکتریایی در سطوح مخاطی ؛ تشکیل بیوفیلم و همچنین آگلوتیناسیون گلبول های قرمز انسان و حیوانات ، موارد بسیاری از فعالیت های بیولوژیکی در ارتباط با پیلی است (۶). مشابه بسیاری از میکروارگانیسم های دیگر ، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس قادر به تولید بیش از یک نوع pili است که ما در اینجا به یک ژن از آن به نام Mtp[4] میپردازیم. این ژن (Mtp) با وزن مولکولی ۳۶۱ جفت باز از زیرواحد های پروتئینی ۴ کیلو دالتون تشکیل شده است. در اصل ، پیلی برای اتصال باکتریها به سلولهای اپیتلیال لازم است ، بنابراین Mtp نقش مهمی در شروع و پیشرفت سل دارند(۸-۹). مطالعه حاضر با هدف بررسی ژن تولید کنند پیلی Mtp در بین سویه های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس حساس و مقاوم به دارو جدا شده از نمونه های بالینی انجام شد.

مواد و روش‌ها:

جامعه آماری این مطالعه شامل ۱۰۰ بیمار مراجعه کننده بیه بیمارستان مسیح دانشوری، مرکز آزمایشگاه رفرانس سل کشوری، می باشد.

جمع اوری نمونه و تعیین هویت:

نمونه خلط ۱۰۰ بیمار مراجعه کننده، که سل آنها توسط متخصص تشخیص داده شده بود ، جمع آوری شد. از روش پتروف (۱۹ ، ۲۰) برای ضدعفونی باکتریها استفاده شد و محیط Lowenstein-Jensen ، محیط کشت نمونه های آلوده بود(۱۹ ، ۲۰). سپس استخراج DNA و همچنین PCR IS6110 با استفاده از کیت Qiagen، (Hilden، آلمان) با توجه به ساختار سازنده، برای شناسایی سویه M. tuberculosis انجام شد.

جداسازی سویه های حساس و مقاوم به دارو:

تست حساسیت داروهای ضد سل به خط اول برای تشخیص سویه های حساس ، مقاوم به چند دارو (MDR-TB)در برابر دارو انجام شد. به این ترتیب، ریفامپین و ایزونیازید به عنوان اولین داروهای ضد سل تعریف شدند .تست حساسیت به این داروها به ترتیب با استفاده از Multiplex-PCR برای تشخیص ژن rpoB و همچنین ژن inhA و katG در سویه‌های مقاوم به ریفامپین و ایزونیازید انجام شد (جدول۱).

شناسایی ژن مولد پیلی *Mtp*:

[1] M. tuberculosis
[2] Multi drug resistant
3 Pili
٤Mtp

جدول ۱ - لیست آغازگرهای مورد استفاده برای آزمایش حساسیت داروها توسط PCR، Multiplex-PCR

Drug	Gene	Primer	Sequence of prime	Lengthof product
Rifampin	rpoB516	rpoB516	5' CAGCTGAGCCAATTCATGGA 3'	218 bp
	rpoB526	rpoB526	5' CTGTCGGGGTTGACCCA 3'	185 bp
	rpoB531	rpoB531	5' CACAAGCGCCGACTGTC 3'	170 bp
	RIRm	RIRm	3' TTGACCCGCGCGTACAC 5'	
Isoniazid	katG315	katG5R	5' ATACGACCTCGATGCCGC 3'	292 bp
		katGOF	3' GCAGATGGGGCTGATCTACG 5'	
	mabA-inhA:-15	inhAP15	5' GCGCGGTCAGTTCCACA 3'	270 bp
		inhAPF2	3' CACCCCGACAACCTATCG 5'	

جدول ۲ - پرایمر طراحی شده برای ژن پیلی (Mtp).

Gene	Primer
Mtp	F: 5' ATGTACCGGTTCGCGTGC 3' R: 5' TCAAGCACGGGACCTTCG 3'

برای ارزیابی این ژن آغازگرهای اختصاصی آن بر اساس ژنوم نوکلئوتید مرجع H37Rv ، طراحی شد . استخراج DNAاز باسیل های حساس و مقاوم به دارو همچنین PCR با استفاده از کیتهای Qiagen، Hilden)، آلمان) با توجه به ساختار سازنده ، برای تقویت ژن *Mtp* در ایزوله های حساس و مقاوم به دارو انجام شد. واکنش PCR با پرایمر طراحی شده مناسب ژن مورد نظر انجام شد (جدول ۲). برنامه طراحی شده برای واکنش PCR به این ترتیب است: دناتوراسیون اولیه: ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۳ دقیقه، ۴۰ سیکل به شکل ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، ۵۲ 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.

آنالیز آماری:

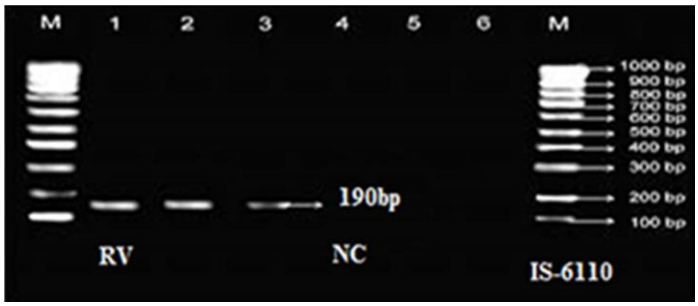
آزمون دقیق فیشر برای تجزیه و تحلیل آماری استفاده شد SPSS v.22 (SPSS Inc., Chicago, USA) همچنین مجذور کای برای پارامترهای مورد مطالعه انجام شد و مقادیر $P<0.05$ از نظر آماری معنی دار تلقی شد.

یافته‌ها:

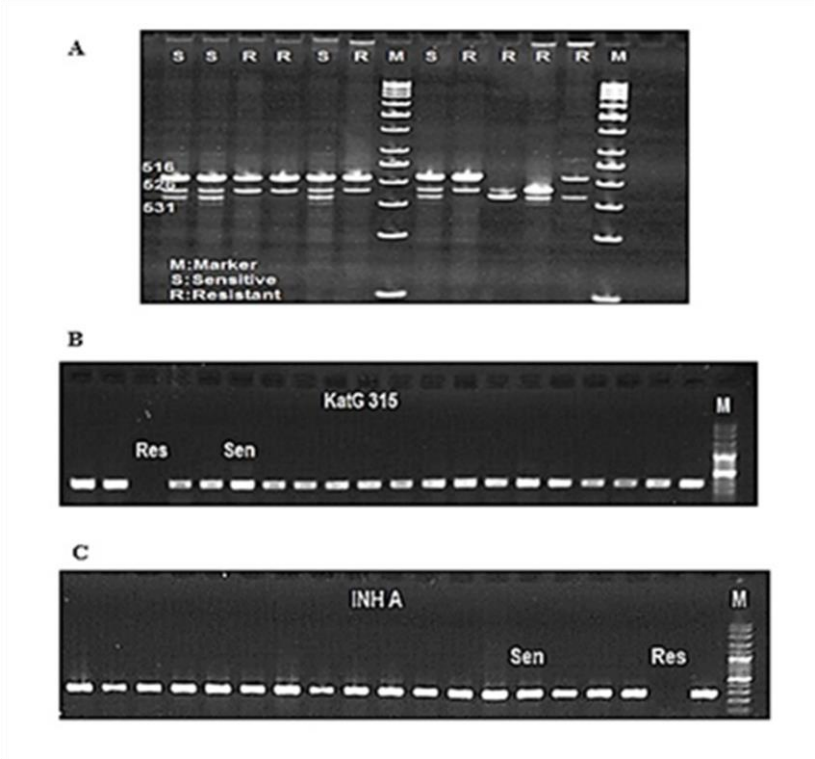
در مجموع ۱۰۰ بیمار مبتلا به سل در مطالعه حاضر شرکت کردند ، که ۶۴ (۶۴٪) مرد و ۳۶ (۳۶٪) بیمار زن و ۶۸(۶۸٪) نمونه حساس به دارو و ۳۲(۳۲٪) نمونه مقاوم به دارو بودند. با استفاده از روش PCR نمونه خلط بیماران بر اساس ژن IS6110 ، یک قطعه ۱۹۰ جفت باز ویژه کمپلکس M. tuberculosis تکثیر شد .سپس مشاهده این قطعه بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد، سویه های M. tuberculosis را در این نمونه ها تأیید کرد. برای تمام آزمایشات مولکولی، سویه M. tuberculosis H37RV به عنوان سویه مرجع در نظر گرفته شد .نتایج PCR IS6110 در شکل ۱ نشان داده شده است.

جهش های rpoB ، inhA وkatG در رابطه با مقاومت دارویی ضد سل خط اول:

مقاومت در برابر ریفامپین و ایزونیازید (به عنوان اولین داروهای ضد سل) با استفاده از Multiplex-PCR مورد آزمایش قرار گرفت و پس از الکتروفورز روی ژل مشاهده شد. سویه هایی که الگوی قطعه ۲۱۸ ، ۱۸۵ و ۱۷۰ جفت باز ژن rpoB را روی ژل ۸ درصد پلی آکریل آمید نشان دادند ، حساس به ریفامپین شناخته شدند.در حالی که، سویه‌های دارای ژن جهش rpoB به ریفامپین مقاوم بودند ، بنابراین، این الگو را نشان نمی‌دهند (شکل۲ A). در بین نمونه ها ۶۸٪ حساس و ۳۲٪ مقاوم به دارو بودند. در میان سویه های حساس ، هیچ جهشی در ناحیه پروموتر inhA mabA- inhA و کدون ۳۱۵



شکل ۱ – محصولات PCR IS6110 روی ژل آگارز ۱.۵٪. سویه های M. tuberculosis قطعه ۱۹۰ جفت باز تولید کردند. خطوط ۱: H37Rv به عنوان شاهد استاندارد، ۲ و ۳: سویه های M. tuberculosis ، ۴: کنترل منفی، ۵ و ۶: غیر M.tuberculosis

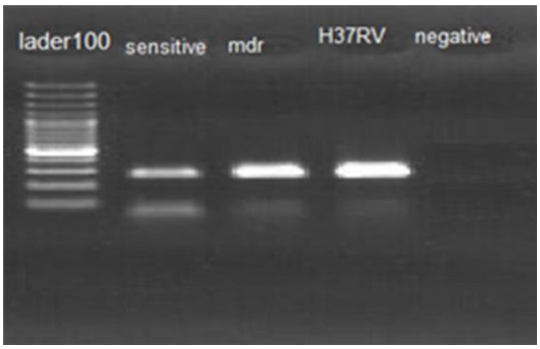


شکل ۲ – محصولات Multiplex-PCR روی ژل پلی آکریل آمید ۸٪ A). حساسیت به ریفامپین: الگوی قطعات ۲۱۸ ، ۱۸۵ و ۱۷۰ جفت باز در رابطه با ۵۱۶ ، ۵۲۶ و ۵۳۱ کدون rpoB ، به ترتیب. سویه های مقاوم در این کدون‌ها جهش داشتن B&C). حساسیت به ایزونیازید: الگوی ۲۷۰ و ۲۹۲ جفت باز قطعات مرتبط با inhA و katG ، به ترتیب. سویه‌های مقاوم در این ژن‌ها جهش داشتند.

ژن katG مشاهده نشد ، که نشان دهنده حساسیت به ایزونیازید توسط الگوهای قطعه ۲۷۰ و ۲۹۲ جفت باز ، به ترتیب روی ۸٪ ژل پلی آکریل آمید است. در حالی که ، سویه های مقاوم به دلیل جهش در این مناطق این الگوها را روی ژل نشان ندادند (شکل ۲ B&C).

بیان ژن مولد پیلی Mtp:

برای تعیین حضور ژن *Mtp* در سویه های *M. tuberculosis*، روش PCR انجام شد. وجود *Mtp* در ایزوله های حساس و مقاوم با شماره باند ۲۶۳ جفت باز روی ژل آگارز ۱.۵٪ مشاهده شد (شکل ۳).



شکل ۳ - مشاهده باند bp۲۶۳ در نمونه‌های حساس و مقاوم به دارو با وجود نمونه استاندارد H37RV

بحث و نتیجه‌گیری:

پیشرفت اخیر در فناوری ، دانش ما را در مورد نتایج مختلف عفونت با *M. tuberculosis* افزایش داده است. با این حال ، ما باید یک راه طولانی برای یادگیری و درک در مورد ساختار و عملکرد pili در بیماری سل ، بدست بیاوریم.

بیماران سرطانی ، به ویژه بیماران مبتلا به بیماری های خون ، در معرض خطر ابتلا به سل هستند و ویژگی های بالینی آنها معمولاً بسیار تهاجمی است که ممکن است به صورت عفونت های سیستمیک ظاهر شود.که در تأخیر تشخیص و افزایش میزان مرگ و میر نقش دارد(۱۱-۱۰).

پیشرفت در تکنیک های مولکولی منجر به سرعت بخشیدن به آزمایش تشخیصی *M. tuberculosis* می شود. پشتیبانی از شناسایی رژیم های درمانی موثر برای بیماران مبتلا به DR-TB و جلوگیری از شیوع باسیل های DR ضروریست.

ما از برخی روشهای معمولی مبتنی بر PCR استفاده کرده ایم از جمله PCR IS6110 : ، Multiplex-PCR، به عنوان روشهای سریع مولکولی.عفونت M. tuberculosisدر ۱۰۰ بیمار ، که در مطالعه ما شرکت داشتند ، با استفاده از روش PCR بر اساس ژن IS6110برای تایید سویه های M. tuberculosis تشخیص داده شد. برای خط اول DST ، حساسیت به ریفامپین و ایزونیازید در نظر گرفته شد و نتایج Multiplex-PCRنشان داد که فرکانس ۱۰۰٪ مقاومت نشان می دهد تمام سویه ها MDR-TB هستند (شکل ۲). سویه های MDR-TB مقاوم در برابر هر یک از سه داروی تزریقی (آمیکاسین ، کانامایسین یا کاپرومایسین) تعریف می شوند.

در مطالعه حاضر ما بررسی بیان ژن تولید کننده پیلی درایزوله های *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* حساس و مقاوم به دارو را انجام دادیم. تمام جدایه های بالینی باسیل سل وجود ژن *Mtp* را نشان دادند (شکل ۳)، نشان می‌دهد که سویه های حساس و MDR ژن مولد پیلی را دارند که تحت شرایط این ژن بیان می‌شود.

تحقیقات دیگر، انجام شده توسط گروه ما در سال ۲۰۱۲، وجود pili در سویه‌های TDR-TB با استفاده از تصاویر AFM را نشان داد. همچنین ارتباط سلول به سلول از طریق پیوند پیلی مشاهده شد (۱۲). پیشنهاد، مطالعه امکان تبادل پروتئین یا DNA توسط پیلی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس را نشان می‌دهد. این نتایج را می‌توان برای مطالعات بیشتر در نظر گرفت تا تغییرات مورفولوژیکی و مولکولی سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس را برای کنترل مناسب بیماری‌زایی آنها در نظر گرفت.

منابع:

1) Burgos MV. Molecular epidemiology of tuberculosis.Eur Respir J 2002; 20: 54-65.
2) Frieden TR, Sterling TR, Munsiff SS, Watt CJ, Dye C (2003) *Lancet* 362:887–899.
3) Mansoori SD, Arami S, Mirabolhasani Z, Farnia P,Velayati A. The pattern of drug resistance among newly diagnosed and old cases of pulmonary tuberculosis in NRITLD. Arch Iranian Med 2003; 6(4): 255-60.
4) Microb Drug Resist, 14 (2008), pp. 273-279
5) F. Doustdar, A.D. Khosravi, P. Farnia, M.R. Masjedi, A.A. VelayatiMolecular analysis of isoniazid resistance in different genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Iran

6) Klemm P, Schembri M. Bacterial adhesins: structure and function. Int J Med Microbiol. 2000;290:27-35.
7) Ramsugit S, Pillay B, Pillay M. Evaluation of the role of Mycobacterium tuberculosis pili (MTP) as an adhesin, invasin, and cytokine inducer of epithelial cells. The Brazilian Journal of Infectious Diseases. 2016;20(2):160-5.
8) Alteri, Christopher. "Novel pili of Mycobacterium tuberculosis." (2005).
9) Klemm P, Schembri M. Bacterial adhesins: structure and function. Int J Med Microbiol. 2000;290:27-35.
10) Cordonnier C, Martino R, Trabasso P, Held T, Akan H, Ward M, et al. Mycobacterial infection: a difficult and late diagnosis in stem cell transplant recipients. Clinical infectious diseases. 2004;38(9):1229-36.
11) .Meintjes G, Lawn SD, Scano F, Maartens G, French MA, Worodria W, et al. Tuberculosis-associated immune reconstitution inflammatory syndrome: case definitions for use in resource-limited settings. The Lancet infectious diseases. 2008;8(8):516-23.
12) .Velayati AA, Farnia P, Masjedi MR. Pili in totally drug resistant Mycobacterium Tuberculosis (TDR-TB). International Journal of mycobacteriology. 2012;1(2):57.

Nafas, Vol. 7, No. 2, Summer 2020, Pages: 30-36

Original Article

Assessment of Pili Gene in Susceptible and Drug-Resistant Mycobacterium Tuberculosis

Zahra Nasirzade[1], Parissa Farnia[2*], Jamile Nowruzi[1], Poopak Farnia[3], Ali Akbar Velayati[2]

1) Department of Microbiology, Faculty of basic Science, Islamic Azad University, Tehran North Branch, Tehran, Iran
2) Mycobacteriology Research Center (MRC), National Research Institute of Tuberculosis and Lung Disease (NRITLD), Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3) Department of Biotechnology, School of Advanced Technology in Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract:
Mycobacterium tuberculosis (M. tuberculosis) is responsible for a large number of human deaths because of its ability to remain in the host for many years without causing disease. Recently, new areas with high prevalence of MDR-resistant TB have been identified in populous countries. Pili in M. tuberculosis mediates the interaction between the pathogen and the host-specific target cells and is seen as a factor in the pathogenesis of the bacterium. In this study, we examined producing gene of (Mtp) among susceptible and resistant strains isolated from clinical specimens to better understand the biology of M. tuberculosis.
We have used some PCR-based methods, including: ISR10 PCR, Multiplex-PCR as fast molecular methods. 100 patient samples were identified by IS6110 PCR method, then isolation of multidrug resistance and sensitive and resistant strains was performed.
Dedicated band electrophoresis showed 263 bp for the Mtp gene. The results of the present study show that this gene is present in all considered strains.
The pili gene is protected in Mycobacterium and is present in all susceptible and drug-resistant strains.
Keywords: Pili, Mycobacterium tuberculosis, Drug resistsnt

[*] **Corresponding Author:**
Parissa Farnia, PhD. Mycobacteriology Research Center, NRITLD/WHO, Shahid Beheshti University (Medical Campus), Tehran, Email: pfarnia@hotmail.com