

### Research Paper



## Investigating Phenotypic and Genotypic Resistance to Pyrazinamide Antibiotic in Multidrug-resistant (MDR) Mycobacterium Tuberculosis Isolates in Khuzestan Province from 2017 to 2022


Mohammad Hashemzadeh<sup>1,2,3</sup>, \*Aram Asareh Zadegan Dezfuli<sup>1,2,3</sup> , \*Mohammad Moinikhah<sup>1,2</sup>, Farid Yousefi<sup>2,4</sup>

1. Student Research Committee, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.
2. Infectious and Tropical Diseases Research Center, Health Research Institute, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.
3. Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.
4. Department of Infectious Diseases, Imam Teaching Hospital, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences Ahvaz, Iran.

Use your device to scan  
and read the article online



**Citation** Hashemzadeh M, Asareh Zadegan Dezfuli A, Moinikhah M, Yousefi F. [Investigating Phenotypic and Genotypic Resistance to Pyrazinamide Antibiotic in Multidrug-resistant (MDR) Mycobacterium Tuberculosis Isolates in Khuzestan Province from 2017 to 2022 (Persian)]. *Jundishapur Scientific Medical Journal*. 2024; 23(1):44-60. 10.32592/JSMJ.23.1.44

 <https://doi.org/10.32592/JSMJ.23.1.44>

### ABSTRACT

**Background and Objectives** Pyrazinamide is one of the effective drugs for treating tuberculosis. Inclusion of this drug in the treatment regimen shortens the duration of tuberculosis treatment. The mutation in *pncA* gene causes loss of pyrazinamidase activity, the most important resistance mechanism in *Mycobacterium tuberculosis* isolates. Therefore, the purpose of this study is to investigate the phenotypic and genotypic resistance to pyrazinamide antibiotic in multidrug-resistant (MDR) *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Khuzestan province between 2017 and 2022.

**Subjects and Methods** This study was conducted on 40 isolates of *Mycobacterium tuberculosis* in Ahvaz TB Regional Laboratory. Drug sensitivity of the isolates was determined by the relative method in the antibiotic pyrazinamide in the isolates. Then, the frequency of *pncA* gene mutations related to pyrazinamide resistance in MDR isolates was determined using sequencing.

**Results** According to the results of the drug sensitivity to rifampin and isoniazid antibiotics, there were 25 isolates, of which 16 strains were resistant to two drugs, namely isoniazid and rifampin (MDR-TB), and 9 were single-drug resistant isolates (8 isolates resistant to rifampin and 1 isolate resistant to Isoniazid). Of the 17 samples that had the *pncA* gene and were resistant to pyrazinamide, 13 had mutations in the *pncA* gene while 4 did not have any mutations. The most common mutation was a non-synonymous mutation in which the amino acid Val had changed to Phe.

**Conclusion** According to the results of this study, there is a high frequency of resistance to pyrazinamide in MDR strains. Also, there is a high percentage of single-resistance mutations in the *pncA* gene, while there is lower prevalence of mutations in the *panD* and *rpsA* genes, which provide quick and accurate information about the sensitivity to pyrazinamide for MDR-TB and mono-resistant isolates. Therefore, the best method for detecting resistance to pyrazinamide is sequencing and whole *pncA* DNA sequence to confirm pyrazinamide resistance instead of the usual methods covering mutated hotspots.

**Keywords** *Mycobacterium tuberculosis*, Tuberculosis disease, Pyrazinamide, antibiotic resistance, Multi-drug resistant tuberculosis

Received: 08 Jan 2024  
Accepted: 06 Mar 2024  
Available Online: 20 May 2024

#### \* Corresponding Author:

Aram Asareh Zadegan Dezfuli

Address: Department of Microbiology, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.

Tel: +98 9163032873

E-Mail: [aramasareh836@yahoo.com](mailto:aramasareh836@yahoo.com)

Mohammad Moinikhah

Address: Department of Microbiology, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.

Tel: 09039454335

E-Mail: [mohammadmoinikhah@gmail.com](mailto:mohammadmoinikhah@gmail.com)

## Extended Abstract

### Introduction

**T**uberculosis is still one of the top 10 causes of death worldwide. According to the report of the World Health Organization in 2022, ten million people in the world will be infected with tuberculosis, and 1.6 million will die as a result of this disease. Mycobacterium tuberculosis complex causes the vast majority of human tuberculosis cases worldwide and infects about one-third of the world's population

Pyrazinamide is a prodrug converted to pyrazinoic acid (POA) by pyrazinamidase in the cytoplasm. Pyrazinoic acid, which is the active form of pyrazinamide, accumulates in the cytoplasm and is pushed out by an unknown efflux pump. In the acidic environment outside the bacillus, pyrazinoic acid is protonated and re-enters the mycobacteria, which will lead to acidification of the cytoplasm. It has been confirmed that binding of pyrazinoic acid to RpsA interferes with the formation of the RpsA-tmRNA complex. Mechanisms of resistance to this drug may be due to mutations in *M. tuberculosis* drug-resistant genes that encode key enzymes or transcription factors, overexpression of *M. tuberculosis* efflux pumps, and high expression of the two-component system in *M. tuberculosis* that regulates the intracellular and extracellular environment in bacteria. Pyrazinamide has various functions in the Mycobacterium tuberculosis complex, including acidification of the cytoplasm, disruption of membrane energetics and transport function, inhibition of the protein degradation pathway through RpsA in translation as well as ClpC proteinase, and energy production through PanD. However, the mutation in the *pncA* gene causes the loss of pyrazinamidase activity, which is the most important resistance mechanism in 70-97% of cases in Mycobacterium tuberculosis complex isolates (8). According to the prevalence of tuberculosis in Khuzestan province and based on a survey, there is limited information about the resistance of MDR strains of Mycobacterium tuberculosis to pyrazinamide in Khuzestan province. Therefore, the purpose of this study is to investigate the phenotypic and genotypic resistance to pyrazinamide antibiotic in multi-drug resistant (MDR) Mycobacterium tuberculosis isolates in Khuzestan province from 2017 to 2022.

### Methods

The resistant strains of Mycobacterium tuberculosis were examined in terms of mutations in the *pncA* gene associated with resistance to pyrazinamide. MDR-TB strains resistant to pyrazinamide were identified in this study, and they were multiplied to determine the type and frequency of mutations. PCR was performed for all isolates that were phenotypically resistant and for sensitive isolates that were randomly selected.

### Results

#### Drug sensitivity test

In total, 40 samples of Mycobacterium tuberculosis isolated from leprosy patients were evaluated in this research, and a drug sensitivity test was performed for them against rifampin and isoniazid antibiotics. After performing an antibiogram, samples resistant to these antibiotics were determined. Of the 25 isolates identified, 16 strains were resistant to two drugs, namely isoniazid and rifampin (MDR-TB), and 9 were single-drug resistant isolates (8 isolates resistant to rifampin and 1 isolate resistant to isoniazid) which were obtained and used for further work.

At this stage, resistant isolates of Mycobacterium tuberculosis complex were examined for mutations in the *pncA* gene related to pyrazinamide resistance. *pncA* gene-specific base pair fragments and specific primers were evaluated using the temperature program under amplification and mutations related to drug resistance after sequencing by Sanger method. After PCR, the product was electrophoresed, and the desired band was extracted and sent to Bioneer South Korea for sequencing to confirm the strains containing the above gene. Then, the results were analyzed using Chromas and Blast software in NCBI.

Out of the 17 samples that had the *pncA* gene and were resistant to pyrazinamide, 10 isolates were resistant to isoniazid and rifampin antibiotics (MDR), and 7 isolates were mono-resistant, out of these 7 mono-resistant isolates, 2 required ISO and 5 were resistant to rifampin. After PCR and confirmation of the *pncA* gene, 17 isolates having this gene were determined, and the sequence and mutation analysis were evaluated. The results of sequencing using n BLAST software showed that 13 isolates had mutations in the *pncA* gene, and 4 isolates did not have any mutations. The most common mutation was a non-synonymous mutation in which Val amino acid had been converted to Phe.

### Conclusion

The results of this study showed that according to the frequency of resistance to pyrazinamide in MDR strains, single resistance and also the high percentage of mutation in the *pncA* gene showed that it is worrying.

### Ethical Considerations

#### Compliance with ethical guidelines

This study is a research project approved by the Student Research Committee of Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, with the code of ethics 1402.488 IRAJUMS.REC. is. In this study, all ethical standards, including hiding the name and identity of the

patients and keeping the secrets of the patients, have been observed. Also, because this study was retrospective, it was done only on archive Mycobacterium tuberculosis isolates at the TB reference center of Khuzestan province during the period of 2015 to 2015, and no identity and secrets of the patient were revealed and it is only a research plan.

### **Funding**

The Student Research Committee of the Faculty of Medicine of Ahvaz University of Medical Sciences is thanked for creating the context for this research with the code 02s76.

### **Authors contributions**

The research was designed by Mohammad Hashemzadeh. Conducting experiments is designed by Aram Zadegan Dezfuli. Data collection and experimental work were done by Mohammad Moeinikhah and Farid Yousefi. The first draft was reviewed by Aram Zadegan Dezfuli.

### **Conflicts of interest**

The authors declare that they have no competing interests.

### **Acknowledgements**

The Student Research Committee of the Faculty of Medicine of Ahvaz University of Medical Sciences is thanked for creating the context for this research with the code 02s76.

## مقاله پژوهشی

## بررسی مقاومت فنوتیپی و ژنوتیپی به آنتی‌بیوتیک پیرازینامید در ایزوله‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به چند دارو (MDR) در استان خوزستان در بازه زمانی ۱۴۰۱-۱۳۹۵

محمد هاشم‌زاده<sup>۱،۲،۳\*</sup>، آرام عصاره زادگان دزفولی<sup>۱،۲،۳</sup> ID، محمد معینی‌خواه<sup>۱،۳</sup>، فرید یوسفی<sup>۴،۵</sup>

۱. کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران.
۲. مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری، پژوهشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران.
۳. گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اهواز، اهواز، ایران.
۴. گروه بیماری‌های عفونی، بیمارستان آموزشی امام، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران.

Use your device to scan and read the article online



**Citation** Hashemzadeh M, Asareh Zadehan Dezfuli A, Moinikhah M, Yousefi F. [Investigating Phenotypic and Genotypic Resistance to Pyrazinamide Antibiotic in Multidrug-resistant (MDR) Mycobacterium Tuberculosis Isolates in Khuzestan Province from 2017 to 2022 (Persian)]. *Jundishapur Scientific Medical Journal*. 2024; 23(1):44-60. 10.32592/JSMJ.23.1.44

<https://doi.org/10.32592/JSMJ.23.1.44>

### چکیده



زمینه و هدف پیرازینامید یکی از داروهای موثر بر درمان بیماری سل است. استفاده این دارو در رژیم درمانی باعث کوتاه شدن مدت زمان درمان سل می‌شود. وجود جهش در ژن *pncA* موجب از بین رفتن فعالیت پیرازینامیداز می‌شود که مهم‌ترین مکانیسم مقاومت در ایزوله‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس است. بنابراین هدف از انجام این مطالعه بررسی مقاومت فنوتیپی و ژنوتیپی به آنتی‌بیوتیک پیرازینامید در ایزوله‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به چند دارو (MDR) در استان خوزستان در بازه زمانی ۱۴۰۱-۱۳۹۵ می‌باشد.

روش بررسی این مطالعه بر روی ۴۰ ایزوله‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در آزمایشگاه منطقه‌ای سل اهواز انجام شد. تعیین حساسیت دارویی ایزوله‌ها به روش نسبی در آنتی‌بیوتیک پیرازینامید در ایزوله‌ها انجام گرفت. سپس تعیین فراوانی موتاسیون‌های ژن *pncA* مرتبط با مقاومت پیرازینامید در ایزوله‌های MDR با استفاده از تعیین توالی انجام گرفت.

یافته‌ها در نتایج تست حساسیت دارویی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های ریفامپین و ایزونیاژید تعداد ۲۵ ایزوله که ۱۶ سویه آن مقاوم به دو داروی ایزونیاژید و ریفامپین (MDR-TB) و ۹ ایزوله مقاوم تک دارویی (۸ ایزوله مقاوم به ریفامپین و ۱ ایزوله مقاوم به ایزونیاژید) به دست آمد. از ۱۷ نمونه ای که دارای ژن *pncA* و مقاوم به پیرازینامید بودند ۱۳ ایزوله دارای موتاسیون در ژن *pncA* و ۴ ایزوله فاقد هر گونه موتاسیون بودند. شایع‌ترین موتاسیون، جهش‌های غیر متشابه، Non synonymous بود که در آن اسید آمینه‌ی Val به Phe تبدیل شده است.

نتیجه‌گیری نتایج این مطالعه نشان داد با توجه به فراوانی مقاومت به پیرازینامید در سویه‌های MDR، تک مقاومتی و همچنین درصد بالای جهش در ژن *pncA* و شیوع کمتر جهش در ژن‌های *pand* و *rpsA*، که اطلاعات سریع و دقیقی در مورد حساسیت به پیرازینامید برای ایزوله‌های MDR-TB و تک مقاومتی فراهم می‌کند، بهترین روش تشخیص مقاومت به پیرازینامید توالی‌یابی و سکانس DNA کل *pncA* برای تایید مقاومت به پیرازینامید به جای روش‌های معمول با پوشش نقاط داغ (hotspots) جهش یافته موثرتر است.

کلیدواژه‌ها مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، بیماری سل، پیرازینامید، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، سل مقاوم به چند دارو

تاریخ دریافت: ۱۸ دی ۱۴۰۲

تاریخ پذیرش: ۱۶ اسفند ۱۴۰۲

تاریخ انتشار: ۳۱ اردیبهشت ۱۴۰۳

نویسنده مسئول:

آرام عصاره‌زادگان دزفولی

نشانی: کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران.

تلفن: ۰۹۱۶۳۰۳۲۸۷۳

رایانامه: [aramasareh836@yahoo.com](mailto:aramasareh836@yahoo.com)

محمد معینی‌خواه

نشانی: کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران.

تلفن: ۰۹۰۳۹۴۵۲۳۳۵

رایانامه: [mohammadmoinikhah@gmail.com](mailto:mohammadmoinikhah@gmail.com)

# جندی شاپور

## مقدمه

بیماران را تسریع ببخشند [۶]. پیرازینامید یک پیش دارو بوده و در سیتوپلاسم توسط پیرازینامیداز به پیرازینوئیک اسید (POA) (Pyrazinonic acid) تبدیل می‌شود. پیرازینوئیک اسید که فرم فعال پیرازینامید است در سیتوپلاسم جمع شده و توسط یک افلاکس پمپ ناشناخته به بیرون رانده می‌شود. در محیط اسیدی خارج از باسیل، پیرازینوئیک اسید پروتون دار شده و مجدداً وارد مایکوباکتری‌ها می‌شود و سیتوپلاسم را اسیدی می‌کند. تایید شده که با اتصال پیرازینوئیک اسید به RpsA در تشکیل کمپلکس RpsA-tmRNA اختلال ایجاد می‌شود [۷]. مکانیسم‌های مقاومت به این دارو ممکن است به دلیل جهش در ژن‌های مقاوم به داروی کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس که آنزیم‌های کلیدی یا فاکتورهای رونویسی را رمزگذاری می‌کنند، بیان بیش از حد پمپ‌های افلاکس در کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، بیان بالایی از سیستم دوجزئی در کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس که سازگاری با محیط داخل سلولی و خارج سلولی را در باکتری تنظیم می‌کند، باشد. پیرازینامید عملکردهای مختلفی در کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس دارد، از جمله اسیدی کردن سیتوپلاسم، اختلال در انرژی غشایی و عملکرد حمل و نقل، مهار مسیر تخریب پروتئین از طریق RpsA در ترجمه و همچنین پروتئیناز ClpC، و تولید انرژی از طریق PanD. با این وجود جهش در ژن *pnca* موجب از بین رفتن فعالیت پیرازینامیداز می‌شود که مهمترین مکانیسم مقاومت در ۷۰ تا ۹۷٪ موارد در ایزوله‌های کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس است [۸].

با توجه به میزان شیوع بیماری سل در استان خوزستان و از آن‌جا که بر اساس بررسی انجام شده، اطلاعات محدودی در خصوص مقاومت سوبه‌های MDR مایکوباکتریوم توبرکلوزیس نسبت به داروی پیرازینامید در استان خوزستان وجود دارد بنابراین هدف از انجام این مطالعه بررسی مقاومت فنوتیپی نسبت به آنتی بیوتیک پیرازینامید در ایزوله‌های MDR-TB شود و همچنین وجود بررسی جهش در ایزوله‌های مقاوم به پیرازینامید با اتفاده از روش‌های مولکولی می‌باشد.

## روش بررسی

### جامعه مورد مطالعه، نمونه‌گیری

در این تحقیق بر روی ایزوله‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس موجود و شناسایی شده در آزمایشگاه مرجع منطقه‌ای سل اهواز در بازه زمانی سال ۱۴۰۱-۱۳۹۵ مطالعه انجام شد. در زمان نگارش این طرح و بر اساس اطلاعات مأخوذه از آزمایشگاه رفرانس سل اهواز، در مجموع ۴۰ نمونه در بازه زمانی مذکور جمع‌آوری و وارد مطالعه شدند. جمعیت مورد مطالعه بیمارانی بودند که در تست‌های فنوتیپی و مولکولی بیماری سل (MDR)

بیماری سل (*tuberculosis*) در حال حاضر هنوز یکی ۱۰ علت برتر مرگ در سراسر جهان محسوب می‌شود. براساس گزارش سازمان بهداشت جهانی در سال ۲۰۲۲، ده میلیون نفر از مردم جهان به بیماری سل مبتلا شدند و ۱/۶ میلیون نفر در اثر این بیماری جان سپردند [۱]. کمپلکس مایکو باکتریوم توبرکلوزیس (*Mycobacterium tuberculosis complex*) مسبب اکثریت قریب به اتفاق موارد سل انسانی در سراسر جهان است و حدود یک سوم از جمعیت جهان را عفونی می‌کند [۲]. در سال ۱۴۰۰ در ایران میزان بروز کل اشکال سل (اعم از ریوی و خارج ریوی) ۱۰/۸۸ مورد در یکصد هزار نفر جمعیت و تعداد مبتلایان ۸۸۱۹ نفر بود. استان خوزستان با میزان بروز ۱۶/۶۵ مورد در یکصد هزار نفر جمعیت، بوده است. با معرفی داروهای ایزونیاژید (Isoniazid)، ریفامپین (Rifampin)، پیرازینامید (Pyrazinamide) و اتامبوتول (Ethambutol) افت سریع و پیوسته در بروز جهانی سل به وقوع پیوست [۳]. در سال ۲۰۲۲، از بیماران مبتلا شده به سل ۵۵۸۰۰۰ نفر به درمان با ریفامپین مقاوم بودند که ۸۲٪ از آنها سل مقاوم به چند دارو (MDR-TB) (Multidrug-resistant tuberculosis) (یعنی مقاوم به ریفامپین و ایزونیاژید) داشتند و ۸/۵٪ از موارد MDR-TB به Extensively drug-resistant tuberculosis (XDR-TB) مبتلا بودند. در سراسر جهان، ۳/۵٪ از موارد جدید و ۱۸٪ از موارد درمان مجدد دچار MDR-TB هستند [۱].

بروز مقاومت‌های دارویی در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می‌تواند به دلیل نفوذپذیری پایین دیواره سلولی به دلیل ماهیت غنی از لیپید و تعداد کم پورین‌ها، غیرفعال کردن دارو، تغییر هدف دارویی و وجود افلاکس پمپ‌های دارویی باشد [۴]. افلاکس پمپ‌ها مسئول مکانیسم مقاومت دارویی ذاتی و اکتسابی در سلول‌های پروکاریوتی هستند که به صورت فعال در انتقال داروهای مانند داروهای ضد سلی از سیتوپلاسم به محیط بیرون سلول نقش دارند [۵]. سیستم‌های افلاکس در کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به پنج خانواده‌ی (ATP-binding cassette) MFS, ABC (major facilitator superfamily), (toxic-SMR) (resistance nodulation MATE compound extrusion) و RND (division) تقسیم می‌شوند [۶]. خانواده ABC در انتقال چندین دارو نقش دارند. پیرازینامید یکی از داروهای موثر بر درمان کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس نهفته و غیرتکثیر شونده است. استفاده این دارو در رژیم درمانی باعث کوتاه شدن مدت زمان درمان سل از ۱۲ ماه به ۶ ماه می‌شود [۶]. پیرازینامید جزو دارو هایی رایج در درمان سل است که با عوارض جانبی کمتر نسبت به دیگر آنتی بیوتیک‌های خط درمانی سل به راحتی می‌تواند در رژیم درمانی بیماران گنجانده شود و روند سلامت بهبود

در آنها توسط پزشک متخصص تایید شده بود.

### رعایت اصول اخلاقی

این مطالعه طرح تحقیقاتی مصوب در کمیته تحقیقات دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز با کد اخلاق ۱۴۰۲،۴۸۸ IRAJUMS.REC. می‌باشد. در این مطالعه تمامی موازین اخلاقی از جمله پنهان بودن نام و هویت بیماران و حفظ اسرار بیماران رعایت شده است. همچنین این چون به این مطالعه به صورت گذشته نگر بوده است صرفاً روی ایزوله‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس آرشو در مرکز رفرانس سل استان خوزستان طی بازه زمانی ۱۳۹۵ تا ۱۴۰۱ کار شده است و هیچ هویت و اسراری از بیمار فاش نشده و صرفاً یک طرح تحقیقاتی است.

### شرایط ایمنی در محیط آزمایشگاه سل

با توجه به این مهم که مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از طرق مختلف که عمدتاً سیستم تنفسی است انتقال می‌یابد رعایت نکات ایمنی در آزمایشگاه سل امری مهم و واجب است، چرا که هرگونه بی‌دقتی وعدم رعایت اصول ایمنی موجب آلودگی محیط و وپرسنل شاغل در آن مرکز می‌گردد. تمامی مراحل مربوط به کشت، تست آنتی بیوگرام، افزودن محلول‌های مختلف به محیط کشت، ورتکس کردن و کار با کلنی باکتری تماماً باید زیر هود کلاس II انجام گیرد. بنابراین تمامی لوازم اعم از محیط‌ها، محلول‌ها دستگاه ورتکس قبل از شروع کار باید زیر هود قرار بگیرند. پس از انجام کار تمامی وسایل و ظروف آلوده مورد استفاده در ظرف حاوی مواد ضدعفونی‌کننده و پلاستیک مخصوص اتوکلاو قرار داده شده و اتوکلاو گردیدند. در پایان زیر هود را بامواد ضدعفونی کننده مثل فنل ۵٪ یا وایتکس ۱۰٪ استریل کرده سپس لامپ UV دستگاه هود را روشن کرده و پس از آن لامپ UV مستقر در اتاق را روشن می‌کنیم تا محیط استریل گردد.

### رنگ آمیزی زیل نلسون

نمونه‌ها توسط روش استاندارد رنگ آمیزی زیل نلسون (رنگ آمیزی اسید فست) رنگ آمیزی شدند که دستورالعمل آن به بدین ترتیب است. لام‌ها در سینی رنگ آمیزی قرار گرفته و سطح آن با محلول کربول فوشین به مدت ۱۰ دقیقه پوشانده شد. سپس لام‌ها توسط پنبه‌ی آغشته به الکل و مشتعل از زیر حرارت داده شدند به طوری که بخار به آرامی از سطح لام بلند شد و رنگ در سطح لام نجوشید تا رنگ فوشین به خوبی به دیواره‌ی باکتری نفوذ کند. پس از ۱۰ دقیقه سطح لام با آب‌فشان به آرامی طوری که اسمیر از سطح لام جدا نشود شسته شد. سطح لام به مدت ۳-۲ دقیقه توسط محلول رنگ براسید الکل پوشانده شد و پس از آن توسط آب شستشو داده شد. سطح لام توسط رنگ متیلن بلو به مدت ۲-۱ دقیقه

پوشانده شد و پس از آن توسط آب شستشو داده شد. به منظور خشک شدن سطح لام‌ها در رک مخصوص قرار داده شدند و سپس با عدسی ۱۰۰ مشاهده شدند. در جدول ۱ نحوه گزارش اسمیر رنگ آمیزی اسید فست نشان داده شده است [۹].

### جدول ۱. نحوه ی گزارش اسمیر رنگ آمیزی اسید فست

تعداد باکتری	گزارش
۱-۹ باسیل در ۱۰۰ شان	گزارش تعداد
۹-۹۹ باسیل در ۱۰۰ شان	۱+
۱-۹ باسیل در هر شان	۲+
> ۹ باسیل در هر شان	۳+

### کشت نمونه ها

برای کشت نمونه‌ها به مقدار ۱۰۰۰ میکرولیتر از نمونه سودزدایی شده به محیط کشت لوین اشتاین جانسون اضافه گردید. پس از کشت درب لوله‌های مک کارتنی به مدت چند روز به صورت نیمه باز برای تبادل هوا باز ماندند. محیط‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه به صورت شیب دار قرار داده شدند و بعد از ۳ روز از نظر آلودگی بررسی شدند. در صورت نبود آلودگی انکوباسیون ادامه می‌یافت. پس از ۸ روز محیط‌ها از نظر رشد بررسی شدند. در صورت وجود رشد به عنوان مایکوباکتریوم‌های سریع‌الرشد در نظر گرفته می‌شدند. در غیر این صورت انکوباسیون تا ۴۵ روز ادامه می‌یافت. کلنی‌های نخودی رنگ بزرگ با حاشیه‌ی نامنظم از نظر باسیل اسید فست و تست‌های بیوشیمیایی بررسی شدند [۱۰].

### محیط کشت لون اشتاین جانسون (LG)

۱- برای تهیه ی محیط کشت LG ابتدا ۶۰۰ میلی‌لیتر محلول نمکی به شکل زیر آماده شد [۱۰]:

### جدول ۲. مواد لازم جهت تهیه محیط کشت

نام ماده	مقدار (گرم)
ال‌اسپارژین	۳/۶
مونوتاسیم فسفات دهیدراته	۲/۴
سولفات منیزیم	۰/۲۴
سیترات منیزیم	۰/۶

۲- این مواد در ۲۰۰ میلی لیتر آب مقطر استریل حل شد و روی دستگاه هیتر شیک دار کمی حرارت داده شد تا کاملاً حل گردد. سپس ۱۲ میلی‌لیتر گلیسرین اضافه شد و بعد حجم محلول را توسط آب مقطر به ۶۰۰ میلی لیتر رسانده و در دمای ۱۲۱°C به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شد.

۳- پس از خارج کردن محلول و سرد شدن آن در دمای اتاق، تخم مرغ‌ها باید به محیط کشت اضافه گردند برای این منظور می‌بایست به نکات زیر

## استخراج DNA

دقت کرد:

استخراج DNA از کلونی‌های سویه‌های میکوباکتریوم توبرکلوزیس MDR و حساس به روش جوشاندن به قرار زیر است:

از کلنی تازه باکتری رشد یافته در محیط لون اشتاین جانسون یک لوپ پر از باکتری را در ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر حل کرده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس جوشانده شد. سپس به منظور وارد آمدن شوک به باکتری و لیز دیواره آن، به مدت ۲۰ دقیقه، داخل فریزر منفی ۲۰ نگهداری شد. پس از آن به دستگاه سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه با دور rpm ۱۴۰۰۰ منتقل و سپس مایع رویی حاوی DNA جمع‌آوری می‌شود. تمام مراحل در شرایط استریل وزیر هود کلاس دو انجام گرفت سپس غلظت DNA استخراج شده را با دستگاه نانودراپ بررسی شد [۱۲].

## بررسی کمی و کیفی DNA

بررسی DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ Thermo (scientific Waltham MA) انجام شد. نسبت OD 260/280 بیشتر از ۱/۸ به عنوان نمونه باکیفیت مناسب DNA جهت انجام واکنش PCR در نظر گرفته شد. در این تحقیق اعداد حاصل برای غلظت DNAهای استخراج شده ۱/۸۵-۱/۷۹ بود.

## تایید ژن IS6110 در ایزوله‌های بالینی میکوباکتریوم توبرکلوزیس

در این روش با استفاده از تکنیک PCR و استفاده از پرایمرهای اختصاصی توالی الحاقی IS6110، گونه‌های متعلق به کمپکس میکوباکتریوم توبرکلوزیس مورد تایید قرار گرفت. تکنیک PCR با استفاده از پرایمرهای جدول ۱ و دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf, Germany) انجام شد.

تخم مرغ‌ها باید سالم و تازه باشند و از تاریخ تولید آن‌ها بیش از یک هفته نگذشته باشد. سپس با یک عدد گاز استریل و محلول شوینده به خوبی شسته و تمیز شوند. و بعد ۳ مرتبه و هر مرتبه به مدت ۵ دقیقه در الکل ۷۰٪ قرار گرفته و شسته شدند تا کاملاً استریل شوند. سپس تخم مرغ‌ها در شرایط استریل زیر هود در یک ارلن استریل ریخته و خوب همزده شد تا یکنواخت گردند. در مرحله بعد تخم مرغ‌ها توسط یک قیف شیشه‌ای و دو گاز استریل صاف گردیدند. باید تعداد تخم مرغ‌ها به اندازه‌ای باشد که حجم نهایی تخم مرغ پس از صاف شدن به ۱۰۰۰ میلی لیتر برسد.

۴- تخم مرغ‌های هم‌وزن و صاف شده به ۶۰۰ میلی لیتر محلول نمکی از پیش ساخته شده اضافه شد و حجم کل محیط به ۱۶۰۰ میلی لیتر رسانده شد.

۵- در این مرحله ۲۰ میلی لیتر مالشیت گرین استریل به همراه ۵۰ واحد پنی‌سیلین به منظور جلوگیری از آلودگی احتمالی به محیط کشت اضافه گردید.

۶- سپس به مقدار ۸-۱۰ میلی لیتر از این محیط به لوله مک کارتنی که از قبل اتوکلاو شده بودند اضافه شد و به صورت شیب‌دار در دستگاه کوآگولاتور به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۸۵-۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند تا محیط‌ها منعقد شوند [۱۱].

محیط‌های کشت بعد از منعقد شدن و سردن شدن به مدت ۳ روز در انکوباتور و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرارداده شدند تا در صورت وجود آلودگی در محیط کشت بررسی شده و از محیط‌های استریل جدا شوند. محیط‌های مناسب تا یک ماه در یخچال نگهداری و قابل استفاده هستند [۱۰].

## تایید مولکولی میکوباکتریوم توبرکلوزیس

## جدول ۳. مشخصات پرایمر IS6110

توالی هدف	پرایمر	توالی (۳' → ۵')	طول محصول	رفرنس
IS6110	Forward	F: 5'-CTCGTCCAGCGCCGCTTCGG-3'	۱۳۰ bp	۱۲
12	Reverse	R: 5' CCTGCGAGCGTAGGCGTCGG-3'		

مورد استفاده در این تحقیق از شرکت سیناکلون تهیه شدند. در این واکنش از سویه استاندارد میکوباکتریوم توبرکلوزیس H37RV (ATCC 25177) به عنوان کنترل مثبت و از آب مقطر به عنوان کنترل منفی واکنش استفاده شد. پس از انجام کار محصولات PCR بلافاصله به چاهک‌های روی ژل الکتروفورز شدند. در غیر این صورت در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شدند [۱۲].

برای انجام PCR واکنش در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام گرفت. برای این منظور ۱۲٫۵ میکرولیتر مسترمیکس (Amplicon Denmark) ۰٫۸ میکرولیتر پرایمر Forward، ۰٫۸ میکرولیتر پرایمر Reverse (با غلظت ۱۰ پیکومول) و ۱۰ میکرولیتر از Template DNA و ۷٫۵ میکرولیتر Depse Water بود. محلول واکنش به تعداد نمونه‌ها و کنترل مثبت و کنترل منفی و به میکروتوب‌های ۰٫۲ میلی لیتر اضافه شدند. پرایمرهای

## الکتروفورز محصولات واکنش PCR

الکتروفورز فرایند حرکت مولکول های باردار در میدان الکتریکی است. در جریان الکتروفورز دو الکتروود (به طور معمول از یک فلز بی اثر مانند پلاتین) در بافر غوطه ور می شوند. با استفاده از یک منبع برق، ذرات دارای بار الکتریکی (DNA به دلیل دارا بودن گروه فسفات دارای بار منفی) پس از برقراری جریان الکتریکی در ژل حرکت می کنند. به طور معمول حرکت الکترون ها از سمت قطب منفی به سمت قطب مثبت است. باید توجه داشت که براساس بار الکتریکی و اندازه ی مولکول مورد نظر سرعت حرکت یون ها در میدان الکتریکی بر روی ژل متفاوت خواهد بود.

مکانی در ژل الکتروفورز که مولکول DNA در آن نقطه قرار می گیرد، تعیین کننده اندازه DNA است که به همراه نمونه ها ۳ میکرولیتر DNA مارکر (Ladder Cinnagen) در یک چاهک اضافه شد که این مارکر جهت مقایسه و سایز DNA و اثبات حضور محصول روی ژل به کار می رود.

بعد از آماده شدن تانک و ژل برای انجام الکتروفورز در چاهک ها به مقدار ۵ میکرولیتر از محصول PCR اضافه شد. همچنین داخل تانک الکتروفورز به مقدار کافی از بافر TBE با غلظت 0,5 X (همان بافری که ژل با آن تهیه شد) سپس تانک به منبع تغذیه با ولتاژ ۹۰-۷۰ ولت وصل شد. پس از حدود ۴۰ دقیقه ولتاژ قطع شد و ژل به آرامی خارج گردید و با دستگاه Gel documentation مشاهده شد. نمونه هایی که PCR آن ها مثبت شد به عنوان مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مورد تایید قرار گرفتند [۱۳].

## تعیین حساسیت دارویی ایزوله ها به روش نسبی در آنتی بیوتیک پیرازینامید

## تهیه محلول دارویی پیرازینامید با محیط کشت 7H10 AGAR به روش نسبی (proportion)

روش استفاده روش نسبی (Proportion) استفاده از محیط کشت 7H10 AGAR بود. بدین منظور ابتدا ۱۰,۵ گرم از پودر آماده 7H10 به ۴۵۰ میلی لیتر آب اضافه شد و سپس مقدار ۳,۳ گرم مونو پتاسیم فسفات ۰,۵ گرم کازئین هیدرولیز ۲,۵ سی سی گلیسرول به آن اضافه گردید و محلول فوق الذکر در اتوکلاو استریل شد. سپس با سرد شدن محلول آماده شده به دمای ۵۴ درجه سانتیگراد، به آن محلول OADC (oleic acid, albumin, dextrose, catalase) اضافه گردید و در ظروف مک کارتنی بلافاصله پخش شد. به منظور آماده کردن محیط کشت آنتی بیوتیک دار از محلول PZA، ابتدا از پودر آنتی بیوتیک به مقدار ۱۰۰ میلی گرم برداشت شد و در ۱۰ سی سی آب مقطر حل گردید. محلول آنتی بیوتیک قبل از

مصرف با استفاده از فیلتر غشایی ۰,۲۲ میکرون استریل شده بود. سپس از این محلول اصلی که دارای غلظت PZA ۱۰۰۰۰ mg/ml می باشد مقدار ۲,۵ سی سی به ارلن مایر حاوی مقدار ۲۴۷,۵ سی سی محیط کشت 7H10 اضافه گردید که در نهایت مقدار دارو در محیط کشت برای آنتی بیوگرام ۱۰۰ mg/ml بود [۱۴].

## روش نسبی آنتی بیوگرام

در این روش تعداد کلنی رشد یافته در محیط کشت حاوی آنتی بیوتیک با محیط شاهد فاقد دارو مقایسه می گردد. اگر مقدار رشد باکتری در محیط آنتی بیوتیک برابر یا بیشتر از ۱٪ باشد، سویه مقاوم گزارش می شود.

## تهیه غلظت یک مک فارلند

مقداری از کلنی رشد یافته در یک لوله مک کارتنی استریل حاوی پرل شیشه ای ریخته شد و با احتیاط به مدت چند ثانیه ورتکس شد تا کلونی های خرد و از هم جدا شوند. درون لوله مک کارتنی حاوی کلونی کوبیده شده مرحله قبل، ۲ تا ۳ میلی لیتر آب مقطر استریل اضافه شد و مجدد ورتکس شد تا در حد ممکن یکنواخت گردد. در یک لوله مک کارتنی استریل مقداری آب مقطر استریل اضافه و از محلول حاصل از مرحله قبل با پیپت پاستور به صورت قطره ای افزوده شد تا جایی که کدورت آن به یک مک فارلند برسد. به این صورت غلظت میکروبی مناسب برای کشت محیط های حاوی آنتی بیوتیک و فاقد آن تهیه گردید [۱۴].

## تهیه رقت میکروبی

پس از تهیه غلظت میکروبی ۱ مک فارلند سه رقت میکروبی تهیه شد:

۱- رقت ۲-۱۰: ۰,۱ میلی لیتر از محلول میکروبی تهیه شده به ۹/۹ میلی لیتر آب مقطر استریل اضافه شد.

۲- رقت ۴-۱۰: ۰,۱ میلی لیتر از رقت ۲-۱۰ به ۹/۹ میلی لیتر آب مقطر استریل اضافه شد.

۳- رقت ۵-۱۰: ۰,۵ میلی لیتر از رقت ۴-۱۰ به ۴/۵ میلی لیتر آب مقطر استریل اضافه شد.

## انجام کشت میکروبی جهت آنتی بیوگرام

از هر کدام از رقت های ۲-۱۰، ۴-۱۰ به مقدار ۰,۲ میلی لیتر روی یک محیط حاوی آنتی بیوتیک و فاقد آنتی بیوتیک اضافه شد. از رقت ۵-۱۰ به مقدار ۰,۲ روی یک محیط حاوی آنتی بیوتیک و فاقد آنتی بیوتیک اضافه شد. برای هر نمونه باکتری ۶ لوله تهیه شد و برای ۲۸-۴۲ روز در دمای ۳۷ درجه انکوبه شدند [۱۵].

# جنیدی شاپور

DMSO (Ampliqon, Denmark) یکبار با DMSO و یکبار بدون

بارگذاری شد تا به غلظت مورد نظر برسیم. باتوجه به اینکه حجم واکنش ۲۵ میکرولیتر است، آب آن را طوری تنظیم کردیم تا حجم نهایی همان ۲۵ میکرولیتر باشد.

برای پیدا کردن بهترین دمای اتصال پرایمرها، گرادیان دمایی را با توجه به TM پرایمرها که TM نیم درجه نیم درجه بالا بردیم. بهترین باند در هر دمایی مشاهده شد همان دما را برای اتصال انتخاب می‌کنیم که برای این مطالعه ۵۵ درجه سانتی گراد بود. پرایمرها بعد از اضافه کردن مقدار آب ذکر شده طبق شرکت سازنده به غلظت ۱۰۰ پیکومول بر میکرولیتر در می‌آیند. برای تهیه غلظت مناسب که در اینجا ۱۰ پیکومول بر میکرولیتر است از فرمول  $M1 V1 = M2 V2$  استفاده کرده و آن‌ها را به ۱۰ پیکومول بر میکرولیتر رساندیم. به این ترتیب که ابتدا در یک میکروتیوب ۱٫۵ میلی‌لیتری مخلوطی از واکنش اولیه تهیه شد و سپس در میکروتیوب‌های ۰٫۲ میلی‌لیتری تقسیم گردید به ترتیبی که حجم نهایی مواد به ۲۵ میکرولیتر برسد. واکنش حاوی ۱۲٫۵ میکرولیتر مسترمیکس، ۱ میکرولیتر پرایمر forward و ۱ میکرولیتر پرایمر reverse که هر کدام غلظت ۱۰ پیکومول بر میکرولیتر دارند و ۰٫۵ میکرولیتر DMSO و ۵ میکرولیتر آب مقطر استریل و ۵ میکرولیتر از DNA نمونه بود. سویه استاندارد مایکوباکتریوم توبرکلوزیس H37Rv به عنوان کنترل مثبت و آب مقطر به عنوان کنترل منفی در این واکنش استفاده شدند.

سپس برنامه دستگاه ترموسایکلر را تنظیم کرده و میکروتیوب‌ها درون دستگاه ترموسایکلر قرار گرفتند و تکثیر انجام شد. پس از انجام الکتروفورز و به دست آمدن قطعات تکثیر شده مطابق با طول موج ژن مورد نظر، نمونه‌ها جهت تخلیص و تعیین توالی با تکنیک سانجر به شرکت Cardio Genetic Iran فرستاده شد. برای تمام محصولات خوانش یک طرفه انجام شد. توالی‌های به دست آمده با استفاده از نرم افزار Bio Edite بایکدیگر هم تراز شدند تا توالی‌های مورد توافق مشخص گردند. توالی‌های مورد توافق به منظور بررسی میزان همپوشانی با توالی‌های موجود در بانک ژن با استفاده از نرم افزار nBLASTE مورد تحلیل قرار گرفتند. توالی‌های دارای جهش نسبت به توالی رفرنس (مایکوباکتریوم توبرکلوزیس H37Rv) و توالی‌های موجود در بانک ژن شناسایی شدند.

## گزارش آنتی بیوگرام

پس از ۲۸ روز محیط کشت‌ها از نظر رشد باکتری بررسی شدند. در صورت رشد باکتری، سویه مقاوم بوده و در صورت عدم رشد، انکوباسیون تا ۴۲ روز ادامه می‌یافت. پس از ۴۲ روز در صورت رشد، باکتری به عنوان سویه‌ی مقاوم و در صورت عدم رشد به عنوان سویه حساس گزارش شدند. تعداد کلنی‌ها بایستی روی محیط شاهد و محیط آنتی بیوتیکی شمارش شوند. کلنی‌های محیط شاهد نشان دهنده باکتری زنده و کلنی‌های محیط آنتی‌بیوتیک نشان دهنده باکتری مقاوم هستند. در صورتی که تعداد کلنی‌های مقاوم نسبت به گروه شاهد کمتر از ۱٪ باشد، سویه حساس و اگر این نسبت بیشتر یا مساوی ۱٪ باشد سویه مقاوم گزارش می‌شود [۱۵].

$X =$  تعداد کلنی‌ها در سطح محیط شاهد / تعداد کلنی در سطح محیط آنتی بیوتیک  $\times 100$

## تعیین فراوانی موتاسیون‌های ژن *pncA* مرتبط با مقاومت

### پیرازینامید

در این مرحله سویه‌های مقاوم مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از نظر موتاسیون در ژن *pncA* مرتبط با مقاومت به پیرازین امید مورد بررسی قرار گرفتند. که سویه‌های MDR-TB مقاوم و تک مقاومتی به پیرازین امید در این مطالعه شناسایی، که جهت تعیین نوع و فراوانی جهش‌ها، برای انجام تعیین توالی تکثیر شدند. PCR برای تمام ایزوله‌هایی که مقاوم فنوتیپی بودند و ایزوله حساس که به‌طور اتفاقی انتخاب شدند انجام شد.

برای استخراج DNA از کلنی‌های مقاوم به روش جوشاندن (Boiling) عمل کردیم. ابتدا چند کلونی از باکتری را در یک میکروتیوب درب پیچ‌دار که حاوی ۵۰۰ میکرولیتر محلول TE بافر است حل کردیم و به مدت ۳۰ دقیقه در ظرف حاوی آب جوش قرار دادیم. سپس به مدت ۱۰ دقیقه با دور 1400rpm سانتریفیوژ کرده و محلول بالایی که حاوی DNA مایکوباکتریوم توبرکلوزیس را جدا کردیم. برای انجام PCR و تعیین توالی نمونه‌ها از پرایمرهای جدول ۴ استفاده شد. سنتز پرایمرها توسط شرکت سیناکلون (Sinaclone) انجام شد [۱۶].

برای ستاپ کردن PCR غلظت‌های متفاوتی از مسترمیکس

جدول ۴. پرایمرهای مورد استفاده جهت PCR ژن *pncA*

توالی هدف	پرایمر	توالی (۵' → ۳')	طول محصول	رفرنس
<i>pncA</i>	Forward	F: 5'GCGTCATGGACCCTATA-3'	۵۶۱ bp	۱۶
	Reverse	R: 5'GTGAACAACCCGACCAG-3'		

## آنالیز آماری

آنالیز آماری و رسم نمودارها در نرم افزار SPSS نسخه ۲۳ انجام شد. برای مقایسه گروه‌ها از آزمون واریانس یک طرفه و دو طرفه استفاده شد. ضریب اطمینان آزمون‌ها ۹۵٪ و سطح معنی داری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. همچنین برای تعیین سطح معنی داری میانگین بین دو گروه از ANOVA one-way استفاده شد.

## یافته‌ها

## جمعیت مورد بررسی

در این مطالعه در مجموع ۴۰ ایزوله مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به دارو از سال ۱۳۹۵ تا ۱۴۰۱ از آزمایشگاه رفرانس سل اهواز مورد ارزیابی قرار گرفتند. که پس از آلودگی زدایی و کشت نمونه‌ها کلونی آنها برای انجام تست حساسیت دارویی و تعیین توالی DNA مورد استفاده قرار گرفت.

## تایید مولکولی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با استفاده از ژن IS6110

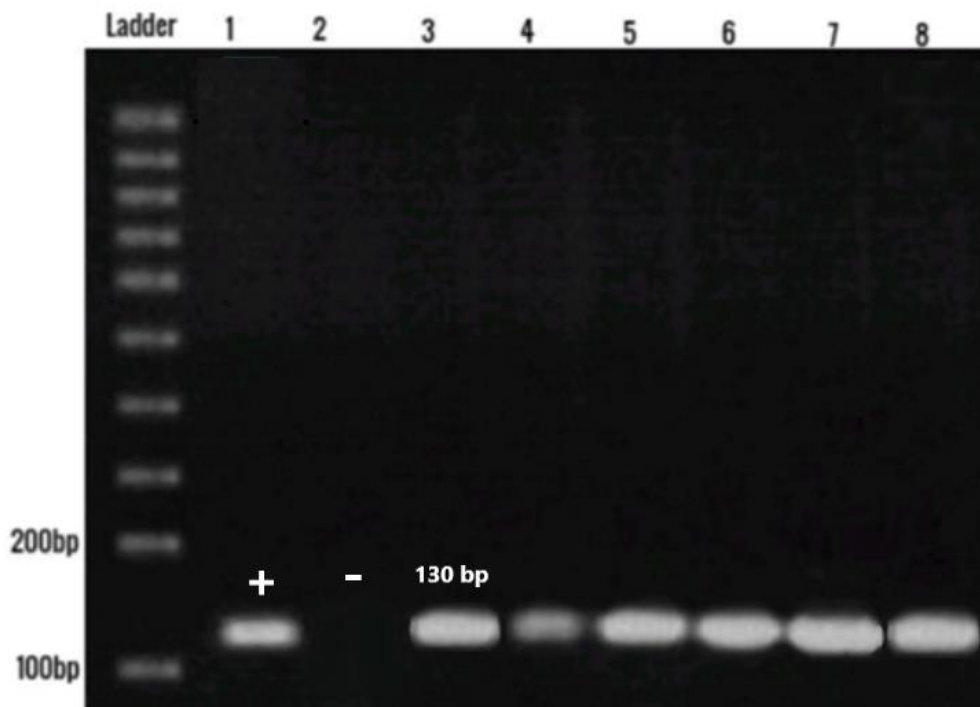
بعد از کشت مجدد ایزوله‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس برای تایید از توالی الحاقی IS6110 استفاده و تایید گردیدند.

## تعیین هویت ایزوله‌های کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با استفاده از ژن IS6110 با PCR

برای بررسی توالی الحاقی IS6110 جهت تایید کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، PCR بر اساس ژن هدف انجام گرفت و نمونه‌هایی که PCR آنها مثبت شدند و با تست‌های بیوشیمیایی تایید گردیدند به عنوان کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس ثبت شد (شکل ۱).

## تست حساسیت دارویی

در مجموع در این پژوهش تعداد ۴۰ نمونه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس جدا شده از بیماران مسلول مورد ارزیابی قرار گرفتند و برای آنها تست حساسیت دارویی نسبت به آنتی بیوتیک‌های ریفامپین و ایزونیاژید انجام شد. بعد از انجام آنتی بیوگرام نمونه‌های مقاوم به این آنتی بیوتیک‌ها تعیین شدند. تعداد ۲۵ ایزوله که ۱۶ سویه آن مقاوم به دو داروی ایزونیاژید و ریفامپین (MDR-TB) و ۹ ایزوله مقاوم تک دارویی (۸ ایزوله مقاوم به ریفامپین و ۱ ایزوله مقاوم به ایزونیاژید) به دست آمد و برای ادامه ی کار مورد استفاده قرار گرفت. همچنین ۵ ایزوله حساس به هر ۳ آنتی بیوتیک به صورت راندوم انتخاب شد. تعداد سویه‌های حساس به هر ۳ آنتی بیوتیک MDR-TB مرکز سل رفرانس اهواز در جدول ۵ نشان داده شده است.



شکل ۱. PCR با استفاده از پرایمر اختصاصی IS6110. چاهک ۱: کنترل مثبت، چاهک ۲: کنترل منفی و چاهک‌های ۳ تا ۸: نمونه‌های بالینی مثبت

# جنیدی شاپور

تعیین فراوانی موتاسیون‌های ژن *pncA* مرتبط با مقاومت به پیرازینامید

در این مرحله ایزوله‌های مقاوم کمپلکس میکوباکتریوم توبرکلوزیس از نظر موتاسیون در ژن *pncA* مرتبط با مقاومت به پیرازینامید مورد بررسی قرار گرفتند. ژن *pncA* قطعات جفت بازی مشخص و پرایمرهای اختصاصی (جدول شماره ۲) را با استفاده از برنامه دمایی زیر تکثیر و موتاسیون‌های مرتبط با مقاومت دارویی پس از تعیین توالی به روش سانجر مورد ارزیابی قرار گرفت. پس از انجام PCR محصول آن را الکتروفورز کرده، باند مورد نظر را استخراج کرده و برای تایید سویه‌های حاوی ژن فوق به شرکت Bioneer کره جنوبی برای Sequencing فرستاده شدند. سپس با استفاده از نرم افزار chromas و Blast در NCBI نتایج مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج تعیین توالی ایزوله‌ها به منظور بررسی موتاسیون در ژن *pncA*

در جدول ۶ و در جدول ۷ اطلاعات ایزوله‌های مورد مطالعه که از شهر اهواز جمع‌آوری شده بودند ذکر گردیده است. از ۱۷ نمونه‌ای که دارای ژن *pncA* و مقاوم به پیرازینامید بودند ۱۰ ایزوله به آنتی‌بیوتیک‌های ایزونیاژید و ریفامپین مقاوم بودند (MDR)، و ۷ ایزوله تک مقاومتی (Mono resistance) بودند، از ۷ ایزوله‌ی تک مقاومتی ۲ ایزوله به ایزونیاژید و ۵ ایزوله به ریفامپین مقاوم بودند. پس از انجام PCR و تایید ژن *pncA*، ۱۷ ایزوله‌ی دارای ژن، برای تعیین توالی و بررسی موتاسیون مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج تعیین توالی با استفاده از نرم افزار n BLAST نشان داد که ۱۳ ایزوله دارای موتاسیون در ژن *pncA* و ۴ ایزوله فاقد هر گونه موتاسیون بودند.

جدول ۵. تعداد کل سویه‌های مقاوم به دارو در این مطالعه

تعداد سویه‌ها	پروفایل حساسیت دارویی
۱۲	مقاوم تک دارویی به ریفامپین
۳	مقاوم تک دارویی به ایزونیاژید
۲۵	MDR-TB
۴۰	تعداد کل سویه‌های مقاوم

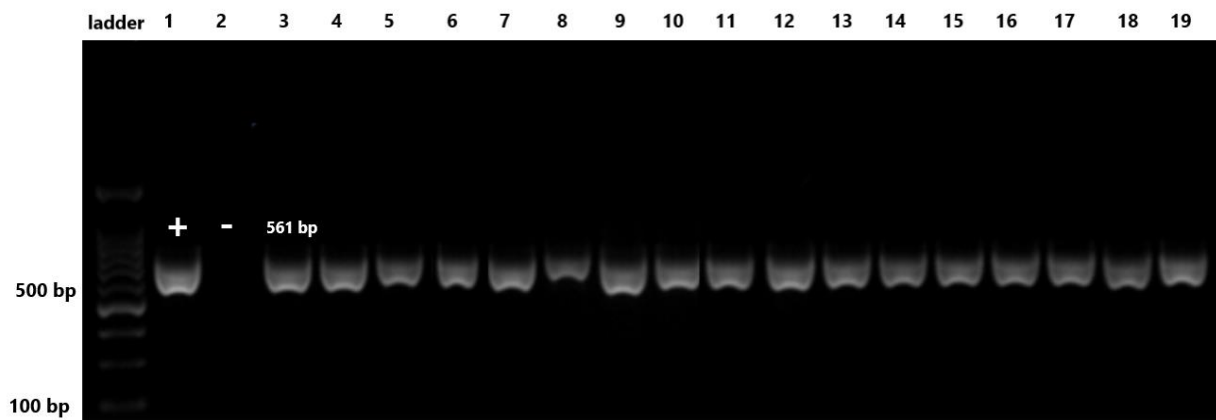
تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی به پیرازینامید به روش proportion در میدلبروک 7H10 با PH اسیدی در سویه‌های مقاوم و حساس

تمامی ایزوله‌های MDR-TB و مقاوم تک دارویی تایید شده با روش‌های مولکولی و فنوتیپی ذکر شده جهت بررسی حساسیت آنتی‌بیوتیکی به پیرازینامید انتخاب شدند و ۵ سویه که به هر سه آنتی‌بیوتیک حساس بودند به صورت راندوم انتخاب شدند که در مجموع ۱۷ ایزوله به پیرازینامید مقاوم بودند.

نتایج تکنیک‌های مولکولی

تکثیر ژن *pncA* برای بررسی مقاومت به پیرازینامید

به منظور شناسایی موتاسیون‌های مرتبط با مقاومت به پیرازینامید برای ۱۷ ایزوله‌ی مقاوم به دارو که ۱۰ ایزوله MDR-TB و ۷ ایزوله‌ی مقاوم تک دارویی (۵ سویه مقاوم به ریفامپین و ۲ سویه مقاوم ایزونیاژید) و ۵ سویه حساس با استفاده از تکنیک PCR ژن مربوط به مقاومت به پیرازینامید *pncA* تکثیر و شناسایی شد. نتایج بدست آمده نشان داد که تمامی ۱۷ ایزوله دارای ژن مقاوم به *pncA* را دارا بودند. در شکل ۲ نتیجه PCR ژن *pncA* نشان داده شده است.



شکل ۲. PCR برای ژن *pncA* با استفاده از پرایمر اختصاصی. چاهک ۱: کنترل مثبت، چاهک ۲: کنترل منفی و چاهک‌های ۳ تا ۱۹: نمونه‌های بالینی مثبت

جدول ۶. اطلاعات مربوط به ایزوله‌هایی که از نظرایجاد موتاسیون مورد بررسی قرار گرفتند

Isolates number	INH resistance	RIF Resistance	MDR	Mono resistance	PncA gene	Mutation in pncA
1	+	+	+	-	+	Mutation
2	+	+	+	-	+	Mutation
3	+	+	+	-	+	Mutation
4	+	+	+	-	+	Mutation
5	+	+	+	-	+	Mutation
6	+	+	+	-	+	Mutation
7	+	+	+	-	+	Non mutation
26	+	+	+	-	+	Mutation
27	+	+	+	-	+	Mutation
28	+	+	+	-	+	Mutation
18	-	+	-	+	+	Mutation
19	-	+	-	+	+	Mutation
20	-	+	-	+	+	Mutation
21	-	+	-	+	+	Mutation
22	-	+	-	+	+	Non mutation

جدول ۷. موتاسیون‌های مشاهده شده در ژن های PncA

Isolates number	Base position	Codon change	Amino acid Change	Mutation type
1	G19 > T	7.GTC/TTC	VAL7 PHE	Non synonymous
2	T20 > G	7.GTC/GGC	VAL7 GLY	Non synonymous
3	T20 > G	7.GTC/GGC	VAL7GLY	Non synonymous
4	T20 > G	7.GTC/GGC	VAL7 GLY	Non synonymous
5	A424 > G	142.ACG/GCG	THR 142 ALA	Non synonymous
6	A424 > G	142.ACG/GCG	THR 142 ALA	Non synonymous
26	A424 > G	142.ACG/GCG	THR 142 ALA	Non synonymous
18	G338 > T	180.GTC/TTC	VAL 180 PHE	Non synonymous
19	G338 > T	180.GTC/TTC	VAL 180 PHE	Non synonymous
20	G338 > T	180.GTC/TTC	VAL 180 PHE	Non synonymous
21	G338 > T	180.GTC/TTC	VAL 180 PHE	Non synonymous
27	C151 > T	51.CAC/TAC	HIS 51 TYR	Non synonymous
28	C151 > T	51.CAC/TAC	HIS 51 TYR	Non synonymous

دارو (MDR) در استان خوزستان در بازه زمانی ۱۴۰۱-۱۳۹۵ بود. بیماری سل یک بیماری عفونی و مسری است که توسط کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس ایجاد می‌شود که معمولاً در تمام دوره عمر فرد ادامه پیدا می‌کند. بیماران مبتلا به این بیماری به دو گروه تقسیم می‌شوند: گروه اول سل فعال که فرم ریوی و خطرناک و قابل انتقال از شخصی به شخص دیگر است.

گروه دوم سل نهفته که عفونتی بدون علامت و غیرقابل انتقال است که باکتری پس از ورود به بدن توسط سیستم ایمنی حذف نشده و در بدن پایدار مانده و سل نهفته ایجاد می‌کند [۱۷].

همانطور که قبلاً اشاره شد پیرازینامید یکی از چهار داروی خط اول ضد سلی است که نقش بسیار مهمی در کوتاه شدن دوره درمان از ۹ تا ۱۲ ماه

شایع ترین موتاسیون، جهش‌های غیر متشابه، Non synonymous بود که در آن اسید آمینه‌ی Val به Phe تبدیل شده است. همچنین در بررسی جدول ۷ مشاهده می‌شود که یک ایزوله دارای جهش 7.GTC/TTC است. همچنین سه ایزوله دارای جهش در کدون‌های 142.ACG/GCG بودند. چهار ایزوله هم دارای جهش در کدون بودند که بیشترین منطقه دارای جهش در ایزوله‌های مایکوباکتریوم مقاوم به چند دارو و مقاوم به پیرازینامید بودند.

## بحث

به طور کلی هدف این مطالعه بررسی مقاومت فنوتیپی و ژنوتیپی به آنتی بیوتیک پیرازینامید در ایزوله‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به چند

## جندی شاپور

به چند دارو (MDR-TB) ۴۶٫۹٪، مقاومت به ایزونیاژید ۶۸٫۸٪ و مقاومت به ریفامپین ۶۲٫۵٪ بود که بیشترین مقاومت‌ها مربوط به این دو دارو و میزان مقاومت به پیرازینامید ۲۵٪ بود. در مطالعه حاضر از میان ۴۰ ایزوله جمع‌آوری شده تعداد ۲۵ ایزوله (۶۲٫۵٪) دارای مقاومت چندگانه (MDR) بودند. همچنین در میان ۴۰ سویه جمع‌آوری شده مقاوم به ایزونیاژید و ریفامپین به ترتیب ۷۰٪ و ۹۲٫۵٪ بود. مقاومت به پیرازینامید در ۱۷ سویه (۴۲٫۵٪) مشاهده شد. با مقایسه نتایج به دست آمده از این دو پژوهش به افزایش قابل توجه شیوع مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در میان سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس پی‌میبریم که ممکن است به علت استفاده نادرست از آنتی‌بیوتیک‌ها باشد [۲۲].

در ایالات متحده آمریکا Kurbatova و همکاران از میان سویه‌های ایزوله شده در مدت ۱۰ سال، بین سال‌های ۲۰۰۹-۱۹۹۹، از میان هزاران سویه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس سالانه ۲ تا ۳٫۲٪ موارد به پیرازینامید مقاوم بوده‌اند و این میزان مقاومت سال به سال رو به افزایش بوده است و در اغلب موارد شاهد مقاومت تکی به پیرازینامید بوده‌ایم. از طرفی در این تحقیق اشاره می‌شود که مقاومت به پیرازینامید در سویه‌های MDR بسیار شایع است و میزان آن تا ۳۸٪ نیز تشخیص داده شده است. در مطالعه‌ی حاضر شیوع مقاومت به پیرازینامید در سویه‌های MDR به میزان ۴۰٪ بوده که نشان دهنده‌ی جدی بودن مسئله در سویه‌های MDR است [۲۳]. طبق مطالعه‌ی که توسط khoharo و همکاران که در هندوستان انجام گرفت، از میان ۲۸۶ سویه تنها ۹٪ به پیرازینامید مقاوم بودند که این میزان مقاومت در سویه‌های MDR به ۴۲٪ می‌رسد که به طور کلی از نظر شیوع بیشتر مقاومت به پیرازینامید در این نوع از سویه‌ها با مطالعه‌ی حاضر همخوانی دارد [۲۴].

یانگچه و همکاران در سال ۲۰۲۱ در چین، به بررسی مقاومت فنوتیپی ایزوله‌های MDR-TB به غلظت ۱۰۰ mg/ml داروی پیرازینامید و همچنین شیوع موتاسیون در ژن *pnca* پرداختند. در این مطالعه که از میان ۱۱۰ ایزوله MDR-TB، ۷۸ ایزوله از پکن و ۲۲ سویه از شهرهای دیگر جمع‌آوری شده بودند، میزان مقاومت به پیرازینامید ۵۹٪ بود که بالاتر از استان ژجیانگ (۴۳٪)، شانگهای (۳۸٫۵٪)، تایلند (۴۹٪)، ایالات متحده (۳۸٪) و مشابه نتیجه اخیر از پکن ۵۷٫۷٪ بود. از میان ۶۵ سویه MDR مقام به پیرازینامید، تعداد ۵۴ سویه دارای جهش در ژن *pnca* بودند که اکثریت (۹۰٫۷٪) آنها دارای جهش‌های نقطه‌ای بودند. نتایج این مطالعه نشان داد که تغییرات ژنتیکی در ژن *pnca*، ۸۳٫۱٪ از مقاومت به پیرازینامید را در بین ایزوله‌های MDR-TB ایجاد می‌کند که مانند پژوهش حاضر شامل یک جهش در کدون شماره ۷ G به T (GTC به TTC) و اسید آمینه والین به فنیل آلانین، ۳ جهش در همان کدون ۷ که باز T به G (GTC به

به ۶ ماه با از بین بردن اشکال فعال و غیرفعال باسیل سل در محیط اسیدی درون ماکروفازها و ریشه کردن ارگانسیم در بدن بیمار ایفا می‌کند. این دارو باکتری‌های نهفته و پایدار مایکوباکتریوم توبرکلوزیس را که سایر داروهای ضد سل قادر به از بین بردن آنها نیستند را از بین می‌برد [۱۸].

پیرازینامید یک پیش دارو است که توسط پیرازینامیداز/ نیکوتین آمیداز به فرم فعال خود یعنی پیرازینوئیک اسید تبدیل می‌شود که توسط ژن *pnca* در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کد می‌شود. مکانیسم اصلی و شایع مقاومت به پیرازینامید جهش در ژن *pnca* که کدکننده پیرازینامیداز است؛ که فعالیت پیرازینامیداز/ نیکوتین آمیداز را مختل و باعث مقاومت به این دارو می‌شود. اکثر سویه‌های کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به پیرازینامید دارای جهش در *pnca* هستند. میانگین سویه‌های مقاوم به پیرازینامید با جهش در ژن *pnca* در تمام مطالعات منتشر شده، حتی در مطالعاتی که درصد پایینی از سویه‌های مقاوم به پیرازینامید بدون جهش در ژن *pnca* را گزارش کرده‌اند حدود ۸۵ درصد است. با این حال، برخی از سویه‌های مقاوم به پیرازینامید بدون جهش در *pnca* گزارش شده است [۱۹].

در مطالعه‌ای که Moadab و همکاران در سال ۲۰۱۵ در ایران انجام دادند، به تعیین حساسیت دارویی سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به پیرازینامید پرداختند که از تعداد ۱۰۰ سویه مورد آزمایش تعداد ۲۱ مورد MDR بودند که از این تعداد ۱۲ مورد (۵۷٪) به پیرازینامید مقاوم بودند. در مطالعه‌ی حاضر از میان ۲۵ سویه MDR، تعداد ۱۰ سویه (۴۰٪) مقاوم به پیرازینامید بودند که نتایج این دو مطالعه تقریباً با هم همخوانی دارد. در مطالعه‌ی Moadab همچنین تعداد سویه‌هایی که به یکی از سه داروی خط اول (ایزونیاژید، ریفامپین و اتامبوتول) مقاوم بودند ۳۱ سویه بود که از این تعداد ۳ مورد (۹٪) به پیرازینامید مقاوم بودند اما در مطالعه‌ی حاضر از میان ۱۵ سویه تک مقاومتی ۷ مورد (۴۶٫۷٪) به پیرازینامید مقاوم تشخیص داده شدند. این عدم تطابق می‌تواند نشان دهنده این موضوع باشد که به علت گذشت زمان شاهد شیوع بیشتر مقاومت به پیرازینامید در میان سویه‌های تک مقاومتی هستیم [۲۰]. طبق گزارش اخیر از Emame و همکارانش مقاومت به پیرازینامید در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس پس از مقاومت به ریفامپین و فلوروکینولون‌ها ایجاد می‌شود، همچنین در مطالعه‌ی حاضر از میان ۱۵ سویه تک مقاومتی ۷ مورد (۴۶٫۷٪) به پیرازینامید مقاوم تشخیص داده شدند که بیشتر آنها مقاوم به ریفامپین بودند که نتایج مطالعه‌ی حاضر مطابق با پژوهش نامبرده می‌باشد [۲۱].

فرازی و همکاران طی یک مطالعه‌ی مقطعی بین سال‌های ۲۰۱۰ تا ۲۰۰۵ در ایران، از میان ۹۱۷ نفر بیمار مسلول که وارد مطالعه شدند، از تمام بیماران مبتلا به سل ریوی مقاوم به درمان طی این سال‌ها کشت و آنتی بیوگرام با روش استاندارد (proportion) انجام دادند که میزان مقاومت

در پژوهشی که محمد طاهر خان و همکاران در سال ۲۰۱۹ در پاکستان انجام دادند، به بررسی مقاومت به پیرازینامید و موتاسیون در ژن *pnca* در ایزوله‌های MDR و XDR و ایزوله‌های تک مقاومتی پرداختند که تعداد ۶۹ ایزوله (۱۴٫۸٪) به پیرازینامید مقاوم بودند. جهش‌ها در ۶۹ سویه مقاوم، ۲۶ ایزوله حساس و یک ایزوله H3VRV با تعیین توالی بررسی شدند. تعداد ۳۶ جهش مختلف در ایزوله‌های مقاوم به پیرازینامید شناسایی شد که در میان آن‌ها ۱۵ جهش قبلا در پایگاه‌های داده TBDRM و GMIT و مطالعات قبل گزارش نشده‌اند. شیوع بروز مقاومت چند دارویی (MDR) و مقاومت دارویی شدید (XDR) به ترتیب در ۵۲ (۷۵٫۳۵٪) و ۶ (۸٫۶۹٪) ایزوله تشخیص داده شده است. جهش‌های Lys 96 THR و Ser 179 Gly در حداکثر تعداد ایزوله‌ها (n=4) یافت شد. جهش در نوکلئوتیدهای ۳۳۸ (G به T) که در ۴ سویه مختلف مشاهده شد که شایع‌ترین نوع جهش در این مطالعه بود. همچنین جهش در نوکلئوتید ۷ (T به G) در سه سویه مشاهده شد که در مطالعه‌ی حاضر این جهش در ۴ سویه مشاهده شد. جهش دیگری که مشاهده شد در نوکلئوتید ۱۵۱ (C به T) در دو سویه بود که همگی این یافته مطابق با نتایج مطالعه حاضر بود [۲۹].

در مطالعه‌ی Huixia و همکاران در سال ۲۰۲۰ در چین که به ارزشیابی پیرازینامید در ترکیب با رژیم‌های درمانی جدید برای مایکوباکتریوم توبرکلوزیس‌های مقاوم به چند دارو پرداختند، از مجموع ۳۲۴ ایزوله MDR-TB که از ۲۵ استان چین جمع‌آوری شده بودند، تعداد ۱۳۲ سویه (۴۰٫۷٪) از نظر فنوتیپی به پیرازینامید مقاوم بودند که از این میان ۹۷ ایزوله (۷۳٫۵٪) تغییرات نوکلئوتیدی داشتند که شامل جهش حذف و اضافه و جهش غیر مترادف (non-synonumous) در ژن *pnca* بودند. همچنین تطابق بین نتایج فنوتیپی و ژنوتیپی ۸۵٫۳٪ بود. جهش‌ها در ۳ ایزوله با سه کدون مختلف Val 44 Gly، Val 39 Gly، Val 25 Gly بود که مشابه مطالعه‌ی حاضر در ۳ ایزوله جهش یافته در همان کدون جهش داشتند (Val 7 Gly)، همچنین جهش در کدون مشابه (Thr 142 Ala) در ۲ ایزوله مقاوم به پیرازینامید نمایان شد که در پژوهش حاضر نیز در ۳ ایزوله مقاوم به پیرازینامید این جهش یافت شد. تمامی این جهش‌ها غیر مشابه (non-synonumous) بودند [۳۰].

sh و همکاران در سال ۲۰۲۰ در چین به منظور شناسایی ویژگی‌های فنوتیپی و ژنوتیپی مقاومت به پیرازینامید در میان ایزوله‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به چند دارو (MDR, Pre-XDR, XDR) و همچنین ارزیابی اثربخش جهش‌های *pnca*، *rpsA* و *pand* در پیش بینی مقاومت به پیرازینامید پرداختند. از میان ۱۵۲ سویه ۴۳ سویه (۲۸٫۲۹٪) Pre-XDR بودند که ۳۷ ایزوله (۸۶٫۰۴٪) به پیرازینامید مقاوم بودند. همچنین ۲۵ سویه (۶۴٫۴۴٪) XDR بودند که در میان آنها ۲۳ مورد (۹۲٪) به پیرازینامید مقاوم بودند. علاوه بر این ۱۰۲ سویه (۷۱٫۷٪) به هر ۴ داروی خط اول سل مقاوم بودند

(GGC) و اسید آمینه والین به گلایسین و یک جهش دیگر در کدون ۵۱ است که باز C به T (CAC به TAC) و اسید آمینه هیستیدین به تیروزین تبدیل شده است که این نتایج مطابق با پژوهش حاضر بود [۲۵].

در مطالعه‌ی پانگ و همکاران در سال ۲۰۱۷ در چین، از بین ۱۳۳ ایزوله MDR-TB که به بررسی مقاومت به پیرازینامید در آن‌ها پرداختند، تعداد ۸۳ سویه (۶۲٫۴٪) به عنوان نمونه مقاوم به پیرازینامید توسط *bactec MGIT* 960 تعیین شدند. در مطالعه‌ی ما شیوع مقاومت به پیرازینامید ۴۰٪ بود. همچنین تجزیه و تحلیل توالی نشان داد که از ۸۳ ایزوله MDR، ۷۳ سویه (۸۸٪) دارای جهش در ژن *pnca* بودند که این عدد در پژوهش حاضر ۷۶٫۵٪ است که این تفاوت ممکن است به دلیل تفاوت مکانی پژوهش انجام شده باشد [۲۶].

بررسی جهش‌های رخ داده نشان داد که ۵۵ مورد جایگزینی تک نوکلئوتیدی (۷۵٫۳٪) و ۱۸ مورد جهش تغییر قالب (۲۴٫۷٪) بودند و هیچ جهش ژنتیکی مرتبط با مقاومت به پیرازینامید در ژن *rpsA* یافت نشد. جهش در ژن *pnca* در این مطالعه مشابه یافته‌های حاضر بود، به این صورت که در کدون ۷ باز T به G (GTC به GGC) تبدیل شده که اسید آمینه والین به گلایسین تغییر می‌کند و همچنین در کدون ۵۱ باز C به T (CAC به TAC) تبدیل شده که اسید آمینه هیستیدین به تیروزین تغییر می‌کند [۲۶].

در مطالعه‌ای که رحمان و همکاران در سال ۲۰۱۷ در بنگلادش انجام دادند، به بررسی حساسیت فنوتیپی به پیرازینامید و موتاسیون در ژن *pnca* در ایزوله‌های MDR-TB پرداختند. از مجموع ۱۶۹ ایزوله MDR-TB تعداد ۷۶ ایزوله (۴۵٪) از نظر فنوتیپی مقاوم به پیرازینامید بودند که این عدد در مطالعه حاضر ۴۰٪ بود که این نتایج باهم همخوانی دارند. همچنین نتایج توالی یابی شیوع بسیار بالایی (۸۵٪) از ژن *pnca* را در بین ایزوله‌های مقاوم نشان می‌داد که در کل ۶۴ جهش در کدون‌های مختلف شناسایی شد که ۲۷ جهش آن از نوع جدید در ژن *pnca* است. هیچ یک از جهش‌های موجود در این مطالعه در پژوهش حاضر یافت نشد [۲۷]. فرهنگ دوستدار و همکاران در سال ۲۰۰۹ در ایران برای مشخص کردن اهمیت جهش‌های مختلف در ژن *pnca* در ایزوله‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به پیرازینامید جمع‌آوری شده از ایران و برای آنالیز ارتباط ژنوتیپ‌های مختلف مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به پیرازینامید، به بررسی ۳۴ سویه مقاوم به پیرازینامید با استفاده از توالی‌یابی مستقیم از نظر جهش در ژن *pnca* پرداختند. از میان ۳۴ مورد ۲۴ ایزوله (۷۰٫۵۸٪) دارای جهش در ژن *pnca* بودند که این عدد در مطالعه حاضر ۷۶٫۵٪ بود و نتایج به هم نزدیک هستند. در این مطالعه در ۱۰ ایزوله باقیمانده هیچ جهشی یافت نشد که این موضوع نشان می‌دهد که مکانیسم‌های جایگزین دیگری در ایجاد مقاومت در این سویه‌ها وجود دارند [۲۸].

# جندی شاپور

موثرتر است. با توجه به مقاومت گزارش شده برای آنتی‌بیوتیک پیرازینامید و شیوع بالای جهش در ژن *pnca* در نقاط مختلف جغرافیایی، انجام تست‌های حساسیت آنتی‌بیوتیکی و مولکولی برای این دارو می‌تواند در مدیریت و درمان موارد پیچیده و مقاوم به داروی توپرکلوزیس کمک کننده باشد. با این وجود شواهد در این زمینه اندک هستند و می‌بایست تکرار نتایج پژوهش حاضر در مطالعات مهر تاییدی بر یافته‌های حاضر باشد تا با سطح اطمینان بالاتری سخن از تصمیم‌گیری مبتنی بر شواهد به میان آوریم. در هر حال پژوهش حاضر نقطه آغازی بر این موضوع است و می‌تواند برای پژوهشگران راهگشا باشد.

## ملاحظات اخلاقی

### پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این مطالعه طرح تحقیقاتی مصوب در کمیته تحقیقات دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز با کد اخلاق 1402.488 IRAJUMS.REC. می‌باشد. در این مطالعه تمامی موازین اخلاقی از جمله پنهان بودن نام و هویت بیماران و حفظ اسرار بیماران رعایت شده است. همچنین این چون به این مطالعه به صورت گذشته نگر بوده است صرفاً روی ایزوله‌های مایکوباکتریوم توپرکلوزیس آرشیو در مرکز رفرانس سل استان خوزستان طی بازه زمانی 1395 تا 1401 کار شده است و هیچ هویت و اسراری از بیمار فاش نشده و صرفاً یک طرح تحقیقاتی است.

### حامی مالی

از کمیته تحقیقات دانشجویی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اهواز به خاطر ایجاد زمینه اجرای این تحقیق با کد 76s02 تشکر و قدردانی می‌گردد.

### مشارکت نویسندگان

پژوهش توسط محمد هاشم‌زاده طراحی شده است. انجام آزمایشات توسط آرام عصاره زادگان دزفولی طراحی شده است. جمع‌آوری داده‌ها و کارهای آزمایشی توسط محمد معینی خواه و فرید یوسفی انجام شد. پیش‌نویس اولیه توسط آرام عصاره زادگان دزفولی بررسی شده است.

### تعارض منافع

نویسندگان تعارض منافی را گزارش نکرده‌اند.

### تشکر و قدردانی

از کمیته تحقیقات دانشجویی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اهواز به خاطر ایجاد زمینه اجرای این تحقیق با کد 02s76 تشکر و قدردانی می‌گردد.

که ۸۲ مورد (۳۹،۸۰٪) به پیرازینامید مقاوم بودند. این نتایج نشان می‌دهد که سویه‌های MDR، Pre-XDR و XDR احتمال بیشتری برای ایجاد مقاومت به پیرازینامید داشتند که در مطالعه‌ی حاضر نیز سویه‌های مقاوم به چند دارو (MDR-TB) درصد مقاومت بیشتری را نشان دادند. میزان جهش *pnca* در سویه‌های مقاوم به پیرازینامید در مناطق مختلف متفاوت است. از میان ۱۵۲ سویه MDR-TB، تعداد ۵۰ سویه فاقد جهش و ۱۰۲ سویه (۸۹،۵۲٪) مقاوم به پیرازینامید و دارای جهش بودند که در مطالعه‌ی حاضر میزان جهش در ژن *pnca* ۷۶،۵٪ بود که این نتایج با هم همخوانی دارند. در این مطالعه ۱۰۰ الگوی متفاوت جهش در ژن *pnca* مشاهده شد که شامل ۸ مورد جهش نقطه-ای و ۲۰ مورد جهش حذف و اضافه بودند که این نتایج بر خلاف مطالعه‌ی ما که همه‌ی جهش‌ها از نوع نقطه‌ای non-synonymous بودند بدست آمد. جهش‌هایی که در مطالعه‌ی حاضر در ژن *pnca* اتفاق افتادند و باعث تغییر اسید آمینه و تداخل دارو شدند و مطابق یافته‌های حاضر بودند شامل جهش در نوکلئوتید ۱۹ که باعث تغییر کدون G Y به T، (GTC به TTC) که در ۱ ایزوله مشاهده شد که اسید آمینه Val به Phe تبدیل می‌شود. جهش در نوکلئوتید ۲۰ که باعث تغییر کدون T Y به G، (GTC به GGC) و تغییر اسید آمینه Val به Gly که در ۳ ایزوله‌ی حاضر این جهش مشاهده شد. نتایج جهش در مطالعه‌ی حاضر در کدون ۱۸۰ که اسید آمینه Val به Phe تبدیل می‌شود در ۴ ایزوله مشاهده شد که بر خلاف مطالعه‌ی حاضر در کدون ۱۲۰ CTG به CGG در ۷ ایزوله که اسید آمینه‌ی لوسین به آرژنین تبدیل می‌شود مشاهده شد. از ۱۱ سویه مقاوم به پیرازینامید بدون جهش در *pnca* دو سویه دارای جهش در *rpsA* و یک سویه دارای جهش در *pand* بود [۳۶].

باتوجه به نتایج در مورد ایزوله‌های که فاقد موتاسیون بودند اما مقاومت فنوتیپی نشان می‌دهند می‌توان اینگونه حدس زد که در آن‌ها مقاومت دارویی می‌تواند علاوه بر موتاسیون در ژن‌های مورد بررسی در این مطالعه، موتاسیون در دیگر ژن‌ها مانند *rpsA* و *pand* و یا موتاسیون در دیگر نواحی ژن‌های مورد مطالعه که در اینجا بررسی نشده‌اند و یا در اثر مکانیسم‌های دیگری مانند فعالیت افلاکس پمپ‌ها باشد.

## نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد با توجه به فراوانی مقاومت به پیرازینامید در سویه‌های MDR، تک مقاومتی و همچنین درصد بالای جهش در ژن *pnca* و شیوع کمتر جهش در ژن‌های *pand* و *rpsA*، که اطلاعات سریع و دقیقی در مورد حساسیت به پیرازینامید برای ایزوله‌های MDR-TB و تک مقاومتی فراهم می‌کند، بهترین روش تشخیص مقاومت به پیرازینامید توالی‌یابی و سکانس DNA کل *pnca* برای تایید مقاومت به پیرازینامید به جای روش‌های معمول با پوشش نقاط داغ (hotspots) جهش یافته

### References

- [1] World Health Organization (WHO). Global Tuberculosis Report 2022. Available at <http://www.who.int/tb/en>
- [2] Zulqurnain M, Aijijiyah NP, Wati FA, Fadlan A, Azminah A, Santoso M. Synthesis, Mycobacterium tuberculosis H37Rv inhibitory activity, and molecular docking study of pyrazinamide analogs. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2023 Nov 4;13(11):170-7.
- [3] Floto RA, Olivier KN, Saiman L, Daley CL, Herrmann JL, Nick JA, Noone PG, Bilton D, Corris P, Gibson RL, Hempstead SE. US Cystic Fibrosis Foundation and European Cystic Fibrosis Society consensus recommendations for the management of non-tuberculous mycobacteria in individuals with cystic fibrosis. *Thorax*. 2016 Jan 1;71(Suppl 1):i1-22. [[10.1136/thoraxjnl-2015-207360](https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2015-207360)] [PMID]
- [4] Sun Q, Li X, Perez LM, Shi W, Zhang Y, Sacchetti JC. The molecular basis of pyrazinamide activity on Mycobacterium tuberculosis PanD. *Nature communications*. 2020 Jan 17;11(1):339. [[10.1038/s41467-019-14238-3](https://doi.org/10.1038/s41467-019-14238-3)] [PMID]
- [5] Tulyaprawat O, Chairprasert A, Chongtrakool P, Suwannakarn K, Ngamskulrungraj P. Association of ubiA mutations and high-level of ethambutol resistance among Mycobacterium tuberculosis Thai clinical isolates. *Tuberculosis*. 2019 Jan 1;114:42-6. [[10.1038/s41467-019-14238-3](https://doi.org/10.1038/s41467-019-14238-3)] [PMID]
- [6] Chen RH, Michael T, Kuhlin J, Schön T, Stocker S, Alffenaar JW. Is there a need to optimise pyrazinamide doses in patients with tuberculosis?: A Systematic Review. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2023 Jul 5:106914. [[10.1016/j.ijantimicag.2023.106914](https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2023.106914)] [PMID]
- [7] Thiede JM, Dillon NA, Howe MD, Aflakpui R, Modlin SJ, Hoffner SE, Valafar F, Minato Y, Baughn AD. Pyrazinamide susceptibility is driven by activation of the SigE-dependent cell envelope stress response in mycobacterium tuberculosis. *MBio*. 2022 Feb 22;13(1):e00439-21. [[10.1128/mbio.00439-21](https://doi.org/10.1128/mbio.00439-21)] [PMID]
- [8] Bouz G, Slechta P, Jand'ourek O, Konecná K, Paterová P, Bárta P, Novák M, Kucera R, Dal NJ, Fenaroli F, Zemanová J. Hybridization Approach Toward Novel Antituberculars: Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Compounds Combining Pyrazinamide and 4-Aminosalicylic Acid. *ACS Infectious Diseases*. 2022 Dec 28;9(1):79-96. [[10.1021/acscinfecdis.2c00433](https://doi.org/10.1021/acscinfecdis.2c00433)] [PMID]
- [9] Haghdooost M, Nazmi PA, Osquee HO. Diagnostic value of serum IgG by Eliza to detecting Mycobacterium tuberculosis. *Original Article. Journal of Research in Clinical Medicine*. 2021 Jul 24;9(1):29.
- [10] Narvaiz de Kantor I, Kim SJ, Frieden TR, Laszlo A, Luelmo F, Norval PY, Rieder HL, Valenzuela P, Weyer K. Laboratory services in tuberculosis control/writing committee: Isabel Narvaiz de Kantor...[et al.]. In *Laboratory services in tuberculosis control/writing committee: Isabel Narvaiz de Kantor...[et al.]* 1998.
- [11] Winn Washington C, Allen SD, Janda WM, Koneman EW, Procop GW, Schreckenberger PC, Woods GL. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. Lippincott, Williams & Wilkins; 2006.
- [12] Khosravi AD, Goodarzi H, Alavi SM. Detection of genomic mutations in katG, inhA and rpoB genes of Mycobacterium tuberculosis isolates using polymerase chain reaction and multiplex allele-specific polymerase chain reaction. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2012;16:57-62. [[10.1016/s1413-8670\(12\)70275-1](https://doi.org/10.1016/s1413-8670(12)70275-1)] [PMID]
- [13] Pál G. Introduction to Practical Biochemistry 2013 [Available from: <http://elte.prompt.hu/sites/default/files/tananyagok/IntroductionToPracticalBiochemistry/ch07.html>].
- [14] Heifets L, Sanchez T. New agar medium for testing susceptibility of Mycobacterium tuberculosis to pyrazinamide. *Journal of clinical microbiology*. 2000 Apr 1;38(4):1498-501. [[10.1128/JCM.38.4.1498-1501.2000](https://doi.org/10.1128/JCM.38.4.1498-1501.2000)] [PMID]
- [15] Training Manual for Mycobacterium tuberculosis. Central TB division. <https://tbcindia.gov.in/view.php>. 2009.
- [16] Streicher EM, Maharaj K, York T, Van Heerden C, Barnard M, Diacon A, Mendel CM, Bosman ME, Hepple JA, Pym AS, Warren RM. Rapid sequencing of the Mycobacterium tuberculosis pncA gene for detection of pyrazinamide susceptibility. *Journal of clinical microbiology*. 2014 Nov;52(11):4056-7. [[10.1128/JCM.02438-14](https://doi.org/10.1128/JCM.02438-14)] [PMID]
- [17] Huang CK, Yu MC, Hung CS, Lin JC. Emerging insight of whole genome sequencing coupled with protein structure prediction into the pyrazinamide-resistance signature of Mycobacterium tuberculosis. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2024 Apr 1;63(4):107053. [[10.1128/JCM.02438-14](https://doi.org/10.1128/JCM.02438-14)] [PMID]
- [18] Wang Z, Tang Z, Heidari H, Molaeipour L, Ghanavati R, Kazemian H, Koohsar F, Kouhsari E. Global status of phenotypic pyrazinamide resistance in Mycobacterium tuberculosis clinical isolates: an updated systematic review and meta-analysis. *Journal of Chemotherapy*. 2023 Oct 3;35(7):583-95. [[10.1080/1120009X.2023.2214473](https://doi.org/10.1080/1120009X.2023.2214473)] [PMID]
- [19] Pitaloka DA, Arfan A, Ramadhan DS, Chaidir L. Insights from the molecular mechanism of pyrazinamide to mutated pyrazinamidase linked to the pncA gene in clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 2024 Jan 22;42(2):759-65. [[10.1080/07391102.2023.2195002](https://doi.org/10.1080/07391102.2023.2195002)] [PMID]
- [20] Pitaloka DA, Arfan A, Ramadhan DS, Chaidir L. Insights from the molecular mechanism of pyrazinamide to mutated pyrazinamidase linked to the pncA gene in clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 2024 Jan 22;42(2):759-65. [[10.1080/07391102.2023.2195002](https://doi.org/10.1080/07391102.2023.2195002)] [PMID]
- [21] Alame-Emane AK, Xu P, Pierre-Audigier C, Cadet-Daniel V, Shen X, Sraouia M, Siawaya JF, Takiff H, Gao Q, Gicquel B. Pyrazinamide resistance in Mycobacterium tuberculosis arises after rifampicin and fluoroquinolone resistance. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 2015 Jun 1;19(6):679-84. [[10.5588/ijtld.14.0768](https://doi.org/10.5588/ijtld.14.0768)] [PMID]
- [22] Farazi A, Sofian M. Assessment of drug resistance in tuberculosis patients and the factors affecting it (2005-2010). *Journal of Arak University of Medical Sciences*. 2012 Apr 10;15(1):77-85.
- [23] Kurbatova EV, Cavanaugh JS, Dalton T, S. Click E, Cegielski JP. Epidemiology of pyrazinamide-resistant tuberculosis in the United States, 1999–2009. *Clinical infectious diseases*. 2013 Oct 15;57(8):1081-93. [[10.1093/cid/cit452](https://doi.org/10.1093/cid/cit452)] [PMID]
- [24] Khoharo HK, Shaikh IA. Drug resistance patterns in pulmonary tuberculosis. *JPMA-Journal of the Pakistan Medical Association*. 2011 Mar 1;61(3):229. [PMID]

- [25] Che Y, Bo D, Lin X, Chen T, He T, Lin Y. Phenotypic and molecular characterization of pyrazinamide resistance among multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates in Ningbo, China. *BMC Infectious Diseases*. 2021 Jun 25;21(1):605. [[10.1186/s12879-021-06306-1](https://doi.org/10.1186/s12879-021-06306-1)] [PMID]
- [26] Pang Y, Zhu D, Zheng H, Shen J, Hu Y, Liu J, Zhao Y. Prevalence and molecular characterization of pyrazinamide resistance among multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates from Southern China. *BMC Infectious Diseases*. 2017 Dec;17:1-8. [[10.1186/s12879-017-2761-6](https://doi.org/10.1186/s12879-017-2761-6)] [PMID]
- [27] Rahman A, Ferdous SS, Ahmed S, Rahman SM, Uddin MK, Pholwat S, Gratz J, Hout E, Banu S. Pyrazinamide susceptibility and pncA mutation profiles of Mycobacterium tuberculosis among multidrug-resistant tuberculosis patients in Bangladesh. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2017 Sep;61(9):10-128. [[10.1128/AAC.00511-17](https://doi.org/10.1128/AAC.00511-17)] [PMID]
- [28] Doustdar F, Khosravi AD, Farnia P. Mycobacterium tuberculosis genotypic diversity in pyrazinamide-resistant isolates of Iran. *Microbial Drug Resistance*. 2009 Dec 1;15(4):251-6. [[10.1089/mdr.2009.0066](https://doi.org/10.1089/mdr.2009.0066)] [PMID]
- [29] Khan MT, Malik SI, Ali S, Masood N, Nadeem T, Khan AS, Afzal MT. Pyrazinamide resistance and mutations in pncA among isolates of Mycobacterium tuberculosis from Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan. *BMC infectious diseases*. 2019 Dec;19:1-7. [[10.1089/mdr.2009.0066](https://doi.org/10.1089/mdr.2009.0066)] [PMID]
- [30] Xia H, van Den Hof S, Cobelens F, Zhou Y, Zhao B, Wang S, Zhao Y. Value of pyrazinamide for composition of new treatment regimens for multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis in China. *BMC Infectious Diseases*. 2020 Dec;20:1-0. [[10.1186/s12879-020-4758-9](https://doi.org/10.1186/s12879-020-4758-9)] [PMID]
- [31] Shi J, Su R, Zheng D, Zhu Y, Ma X, Wang S, Li H, Sun D. Pyrazinamide resistance and mutation patterns among multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis from Henan Province. *Infection and drug resistance*. 2020 Aug 20:2929-41. [[10.2147/IDR.S260161](https://doi.org/10.2147/IDR.S260161)] [PMID]