عفونت‌ها، تست‌های شناسایی و روش‌های درمانی جدید مایکوباکتریوم‌های غیرسلی

مسعود کیخا[۱]، مرتضی کرمی زرندی[۲]، حسینعلی راهدار[۳]*، الهه تاکی[۴]

۱. دانشجوی دکتری تخصصی باکتری‌شناسی پزشکی، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
۲. دانشجوی دکتری تخصصی باکتری‌شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۳. استادیار باکتری‌شناسی، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایرانشهر، ایرانشهر، ایران
۴. دانشجوی دکتری تخصصی باکتری‌شناسی پزشکی، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۳/۰۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۸/۲۰

چکیده

مایکوباکتریوم‌ها باکتری‌های اسید فست حاوی مایکولیک‌اسید با گوانین و سیتوزین ۶۱ـ۷۱ مول درصد هستند. مایکوباکتریوم‌ها براساس ویژگی‌های رشد، به دو گروه سریع‌رشد و کُندرشد تقسیم می‌شوند. براساس تولید رنگ‌دانه، به سه زیرگروه فوتوکروموژن، اسکوتوکروموژن و نان‌کروموژن طبقه‌بندی می‌شوند. پاتوژن‌های انسانی (مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و لپره) و گونه‌های ساپروفیت محیطی در جنس مایکوباکتریوم وجود دارند. عفونت‌های مایکوباکتریومی بیماری ریوی تا انواع عفونت‌های بافت‌های پوست، استخوانی، غدد لنفی و بیماری‌های منتشر را شامل می‌شوند. افراد دارای نقص ایمنی حساسیت زیادی به عفونت مایکوباکتریوم‌های غیرسلی دارند. رنگ‌آمیزی اسید فست، انواع تست‌های بیوشیمیایی و تجزیه و تحلیل مایکولیک‌اسید و اسیدهای چرب برای تشخیص مایکوباکتریوم‌ها استفاده می‌شود. تست‌های مولکولی ازقبیل انواع PCR، تست‌های هیبریدیزاسیون و سکانسینگ ژن‌های خانه‌دار برای تأیید تشخیص مایکوباکتریوم‌ها استفاده می‌شوند. مایکوباکتریوم‌های کُندرشد به‌طور معمول با داروهای کلاریترومایسین، ریفابوتین، سیپروفلوکساسین، ریفامپین و اتامبوتول درمان می‌شوند؛ درحالی که برای مایکوباکتریوم‌های سریع‌رشد ماکرولیدها، سفالوسپورین‌ها و فلوئوروکوئینولون‌ها تجویز می‌شوند. برای تعیین حساسیت دارویی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس روش‌های تناسبی (proportional method) استفاده می‌شود. همچنین برای مایکوباکتریوم‌های سریع‌رشد روش‌های دیسک دیفوژن، دیسک الوشن و براث میکرودیلوشن و برای مایکوباکتریوم‌های کُندرشد روش‌های رادیومتریک و براث میکرودیلوشن مناسب‌ترین روش‌های تعیین حساسیت دارویی به‌شمار می‌روند. روش‌های مولکولی نظیر PCR single-strand conformational polymorphism، Sequencing، PCR-RFLP و Multiplex-PCR برای تعیین حساسیت دارویی استفاده می‌شوند. با توجه به اهمیت مایکوباکتریوم‌های غیرسلی و مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی این باکتری‌ها، آزمایشگاه‌های تشخیص طبی و تیم درمان باید به عفونت‌های مایکوباکتریوم‌های محیطی در بیماران واجد شرایط خاص توجه کنند..

کلیدواژه‌ها:
مایکوباکتریوم‌های غیرسلی، عفونت، درمان، تشخیص مولکولی.

۱. مقدمه

مایکوباکتریوم‌ها باکتری‌های اسید فست حاوی مایکولیک‌اسید با گوانین و سیتوزین ۶۱ـ۷۱ مول درصد هستند. دانشمندی به‌نام هانسن این گروه از باکتری‌ها را برای اولین بار در سال ۱۸۷۵م کشف و باسیلوس لپر ه[۱] نام‌گذاری کرد. اولین طبقه‌بندی علمی مایکوباکتریوم‌ها در سال ۱۸۹۶م توسط

1. bacillus leprae

* **نویسندهٔ مسئول: حسینعلی راهدار**
نشانی: استادیار باکتری‌شناسی، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایرانشهر، ایرانشهر، ایران

تلفن: ۰۹۱۰۵۱۰۱۴۹۱-۰۵۱۴۴۴۱۱۴۳۰ **دورنگار:**
رایانه: rahdar_hossein@yahoo.com
شناسه ORCID: 0000-0003-1583-9936
شناسه ORCID نویسندهٔ اول: 0000-0002-5883-9429

مجلهٔ علمی ـ پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، دورهٔ ۲۶، شمارهٔ ۵، آذر و دی ۱۳۹۸، ص۶۲۷ـ۶۴۰
آدرس سایت: http://jsums.medsab.ac.ir رایانامه: journal@medsab.ac.ir
شاپای چاپی: ۷۴۸۷-۱۶۰۶

دانشمندانی به‌نام‌های لمن و نویمن[1] صورت گرفت [۱ـ۳]. براساس طبقه‌بندی رانیون، گونه‌های مایکوباکتریومی براساس ویژگی‌های رشد به دو گروه سریع‌رشد و کُندرشد تقسیم‌بندی می‌شوند. کلنی‌های گونه‌های سریع‌رشد کمتر از ۷ روز در سطح محیط کشت ظاهر می‌شوند؛ درحالی که رشد گونه‌های کُندرشد بیش از ۷ روز به‌طول می‌انجامد. گونه‌های کُندرشد براساس تولید رنگ‌دانه در سه زیرگروه فوتوکروموژن (تولید رنگ‌دانه درمقابل نور)، اسکوتوکروموژن (تولید رنگ‌دانه در غیاب نور) و نان‌کروموژن (عدم تولید رنگ‌دانه) طبقه‌بندی می‌شوند [۱، ۴]. گونه‌های سریع‌رشد توانایی رشد در محیط‌های روتین آزمایشگاهی نظیر نوترینت آگار،[2] عصارهٔ مغز و قلب گاو[3] و پپتون آگار[4] را دارند؛ درحالی که گونه‌های کُندرشد قادر به رشد در محیط‌های ذکرشده نیستند. محیط‌های روتین آزمایشگاهی که برای جداسازی مایکوباکتریوم‌ها استفاده می‌شوند، در سه دستهٔ محیط‌های پایه تخم‌مرغ (لون اشتاین جانسون)، محیط‌های آگار نیمه‌صناعی[5] و محیط‌های آبگوشتی[6] جای دارند [۱]. مایکوباکتریوم‌ها به‌طور معمول در منابع محیطی نظیر آب، خاک، حیوانات و گیاهان درحال فساد زندگی می‌کنند؛ به‌طوری که حتی گونه‌های پاتوژن اجباری این خانواده نظیر مایکوباکتریوم توبرکلوزیس نیز منشأ محیطی دارند و از منابع محیطی قابل جداسازی‌اند [۵ـ۷]. مطالعات مولکولی نشان داده‌اند که مایکوباکتریوم‌های کُندرشد حاوی یک مجموعه از ژن‌های کدکنندهٔ RNA ریبوزومی (16S rRNA) هستند؛ درحالی که مایکوباکتریوم‌های سریع‌رشد بیش از یک مجموعه از ژن‌های کدکنندهٔ RNA ریبوزومی را دارند [۱]. امروزه بیش از ۱۷۵ گونه از جنس مایکوباکتریوم‌ها شناسایی شده است. براساس خصوصیت پاتوژن بودن، مایکوباکتریوم‌ها به دو گروه کلی مایکوباکتریوم‌های بیماری‌زا نظیر مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس (حاوی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، آفریکانوم، کانتی، میکروتی، بویس، کاپرایی، مونگی، اوریگیس و پینپدی) و مایکوباکتریوم لپره، و همچنین مایکوباکتریوم‌های غیربیماری‌زا یا پاتوژن‌های فرصت‌طلبی مانند مایکوباکتریوم‌های محیطی و غیرتوبرکلوزیس تقسیم می‌شوند [۸، ۳].

۲. عفونت‌های مایکوباکتریومی

بیماری سل یکی از مهلک‌ترین بیماری‌های عفونی تاریخ بشر است که بر اثر استنشاق باکتری مایکوباکتریوم توبرکلوزیس پدیدار می‌شود. مایکوباکتریوم توبرکلوزیس پس از ویروس نقص سیستم ایمنی (HIV)، دومین عامل عفونی شایع در سراسر جهان است [۹، ۲]. تقریباً یک‌چهارم جمعیت جهان بدون اینکه تظاهرات و علائم بیماری را از خود نشان دهند، به مایکوباکتریوم توبرکلوزیس آلوده هستند. بیماری سل سالیانه جان ۱٫۵میلیون نفر را در سراسر جهان می‌گیرد [۲]. امروزه گسترش همه‌گیری‌های ویروس نقص سیستم ایمنی (HIV) و ظهور سویه‌های مقاوم به چند دارو (MDR-TB) و مقاومت گستردهٔ دارویی (XDR-TB) مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، مشکلات درمان و کنترل سل را دشوارتر کرده است [۲، ۱۱]. مایکوباکتریوم بویس نیز در انسان عفونت سل را به‌وجود می‌آورد. به‌طور کلی سل ناشی از مایکوباکتریوم بویس کُشنده‌تر و مقاوم‌تر از مایکوباکتریوم توبرکلوزیس است و حدود ۱ـــ۲٪ از موارد سل ایالات متحدهٔ امریکا بر اثر مایکوباکتریوم بویس به‌وجود می‌آید [۲، ۱۲]. علاوه‌بر این، مایکوباکتریوم‌های محیطی نیز امروزه از نظر بالینی اهمیت پیدا کرده و قادرند عفونت‌هایی نظیر تنفسی، جلدی، جلدی ـــ لنفاوی، بافت نرم، زخم، استخوان و عفونت‌های منتشره را در بیماران مبتلا به نقص سیستم ایمنی، بیماران تحت عمل پیوند، سرطانی‌ها، مصرف‌کنندگان داروهای سرکوب‌کنندهٔ سیستم ایمنی و حتی افراد سالم نیز به‌وجود آورند [۱۳، ۵]. مایکوباکتریوم‌های موجود در منابع محیطی بیمارستان‌ها از طریق آلودگی وسایل برونکوسکوپی، وسایل داخل عروقی، فیلترهای تصفیه، دریچهٔ مصنوعی قلب، آلودگی شانت‌های داخل شکمی و تجهیزات آلودهٔ دیالیز به بیماران منتقل می‌شود [۱۰]. مایکوباکتریوم‌های غیرتوبرکلوزیس موجود در سیستم‌های توزیع آب، بیوفیلم تشکیل می‌دهد که این پدید خود منبع بالقوه‌ای برای آلودگی آب به‌شمار می‌آید [۱۴]. امروزه شواهد فزاینده‌ای مبنی بر بیماری‌زا بودن مایکوباکتریوم‌های کُندرشد در مقایسه با گونه‌های سریع‌رشد وجو دارد [۱۵]. طبق برآوردهای اخیر، میزان شیوع عفونت‌های مایکوباکتریوم‌های محیطی در ایالات متحدهٔ امریکا به میزان ۱۴ نفر در هر ۱۰۰,۰۰۰ نفر محاسبه شده است. در بین بیماران سراسر جهان، مایکوباکتریوم آویوم‌کمپلکس،[7] مایکوباکتریوم گوردونه[8] و مایکوباکتریوم گزنوپی[9] از شایع‌ترین مایکوباکتریوم‌های جداشده از نمونه‌های بالینی بودند؛ همچنین مایکوباکتریوم فورچئیتوم[10] و

1. Lehmann & Neumann
2. nutrient agar
3. brain heart infusion
4. peptone agar
5. middlebrook 7h10, 7h11
6. middlebrook 7H9, 7H12
7. mycobacterium aviumcomplex
8. mycobacterium gordonae
9. mycobacterium xenopi
10 mycobacterium fortuitum

مایکوباکتریوم آبسسوس[1] شایع‌ترین مایکوباکتریوم‌های سریع‌رشد جداشده از نمونه‌های بالینی هستند [۱۶ـ۱۷]. همچنین طبق مطالعات صورت‌گرفته در ایران، شایع‌ترین مایکوباکتریوم‌های غیرتوبرکلوزیس جداشده از بیماران به‌ترتیب مایکوباکتریوم فورچئیتوم، مایکوباکتریوم کانزاسی[2] و مایکوباکتریوم سیمیه[3] هستند [۱۸]. از آنجایی که تظاهرات بالینی و یافته‌های رادیولوژیک عفونت‌های مایکوباکتریوم‌های غیرتوبرکلوزیس و سل مشابه هستند، به‌طور معمول عفونت‌های مایکوباکتریوم‌های عفونی تشخیص داده نمی‌شوند؛ همچنین در کشورهایی همچون ایران که بیماری سل اندمیک است، تمرکز تیم پزشکی و آزمایشگاه‌ها بیشتر بر تشخیص مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بوده و یا مایکوباکتریوم‌ها تا سطح گونه تشخیص داده نمی‌شوند [۱۹-۲۰]. با توجه به افزایش آمار و ارقام عفونت‌های مایکوباکتریوم‌های محیطی و همچنین شباهت‌های پایه‌ای با مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در خصوصیاتی همچون اسید فست بودن و روش‌های جداسازی اولیه از بیمار، به‌منظور تشخیص صحیح و درمان مؤثر بیماران، یکی از رسالت‌های مهم پزشکان و آزمایشگاه‌های تشخیص طبی شناسایی و افتراق صحیح گونه‌های مایکوباکتریومی است [۲۰، ۵]. انواع عفونت‌های ایجادشده توسط گونه‌های مایکوباکتریوم در جدول ۱ خلاصه شده است.

جدول ۱. انواع عفونت‌های ایجادشده توسط گونه‌های مایکوباکتریوم

عفونت								منبع
ریوی	جلدی	گوش میانی	لنفاوی	مغز و سیستم اعصاب	مفاصل و استخوان	چشم	خون و منتشره	۱۹و۳۴
M.aviumintracellulare complex (MAC)	*M. fortuitum*	*M. abscessus.*	*MAC*	*M. kansasii*	*M. marinum*	*M. abscessus*	*M. avium*	
M. kansasii	*M. chelonae*	*M. fortuitum*	*M malmoense*	*MAC*	*M. terrae*	*M. abscessus*	*M. chelonae*	
M.scrofulaceum	*M. abscessus*		*M. haemophilum*	*M. gordonae*	*M. nonchromogenicum*	*M. szulgai*	*M. fortuitum*	
M. xenopi			*M. lentiflavum*	*M. fortuitum*	*M. triviale*		*M. bohemicum*	
M.simiae			*M. scrofulaceum*	*M. malmoense*	*M. arupense.*		*M. genavense*	
M.habana			*M. palustre*	*M. terrae complex*	*M. wolinskyi*		*M. mageritense.*	
M.szulgai			*M. parmense*		*M. haemophilum*		*M. terrae complex*	
M.fortuitum			*M. tusciae*		*M. setense*		*M. wolinskyi*	
M.vaccae					*M. goodii*		*M. lentiflavum*	

۳. تشخیص

مهم‌ترین تست‌های پایه‌ای تشخیص عفونت‌های مایکوباکتریومی شامل رنگ‌آمیزی زیل نلسون (رنگ‌آمیزی اسید فست)، سرعت رشد، وجود یا نبودِ رنگ‌دانه و مورفولوژی کلنی است [۱]. اما برای تشخیص و افتراقِ گونه‌های مایکوباکتریومی می‌توان از تست‌های بیوشیمیایی (موفولوژی کلنی، تولید پیگمان، سرعت رشد، رشد در دماهای مختلف، کاتالاز نیمه‌کمّی و مقاوم به حرارت، اوره‌آز، هیدرولیز توئین، احیای نیترات، تولید نیاسین، فعالیت آریل سولفاتاز، پیرازینامیداز، مقاومت به نمک، اولئات و پیکرات، تست جذب آهن و احیای تلوریت پتاسیم)، تجزیه و تحلیل اسیدهای چرب دیوارهٔ سلولی و روش‌های مولکولی استفاده کرد [۸، ۲۰ـ۲۲].

1. mycobacterium abscessus
2. mycobacterium kansasii
3. mycobacterium simiae

۳,۱. تولید پیگمان (رنگ‌دانه)

مایکوباکتریوم‌ها رنگ‌دانه‌های کاروتنوئیدی زرد تا قرمزرنگی را تولید می‌کنند. مایکوباکتریوم‌هایی را که در غیاب نور تولید پیگمان می‌کنند، اسکوتوکروموژن می‌نامند. برخلاف اسکوتوکروموژن‌ها، مایکوباکتریوم‌هایی را که برای فرایند کاروتنوژنز نیازمند نور و اکسیژن هستند، مایکوباکتریوم‌های فوتوکروموژن می‌گویند. مایکوباکتریوم‌هایی را که تحت هیچ شرایط تولید رنگ‌دانه نمی‌کنند، مایکوباکتریوم‌های نان‌کروموژن گویند [۱].

۳,۲. رشد در دماهای مختلف

گونه‌های مختلف مایکوباکتریومی توانایی رشد در دماهای مختلف ۲۵، ۳۰، ۳۳، ۳۷، ۴۲ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد را دارند که براساس رشد و عدم رشد در برخی دماها شناسایی می‌شوند [۱].

۳,۳. فعالیت کاتالاز (نیمه‌کمّی و مقاوم به حرارت)

تست کاتالاز نیمه‌کمّی مایکوباکتریوم‌ها را براساس فعالیت کینتیک[1] آنزیم کاتالازشان شناسایی و از هم جدا می‌کند؛ به این صورت که اگر ارتفاع کف بیشتر از ۴۵ میلی‌متر باشد، نتیجهٔ تست مثبت است؛ ولی اگر ارتفاع آن کمتر از ۳۱ میلی‌متر باشد، نتیجهٔ تست منفی ارزیابی می‌شود. اما اگر ارتفاع کف بین ۳۱ـــ۴۵ میلی‌متر بود، باید تست دوباره تکرار شود. برای مثال نتایج این تست برای مایکوباکتریوم گوردونه و پاراتوبرکلوزیس به‌ترتیب مثبت و منفی است [۱]. در تست کاتالاز مقاوم به حرارت، مایکوباکتریوم‌ها براساس مقاومت آنزیم کاتالاز نسبت به دمای ۶۸ درجه سانتی‌گراد تفکیک می‌شوند. در این تست، درصورت وجود حباب‌های اکسیژن در سطح محیط، تست مثبت ارزیابی می‌شود. نتایج این تست برای مایکوباکتریوم بویس و بسیاری از مایکوباکتریوم‌ها منفی و برای برخی مایکوباکتریوم‌هایی ازقبیل مایکوباکتریوم کانزاسی مثبت است [۱].

۳,۴. تجزیهٔ توئین ۸۰

اساس این تست برپایهٔ تغییر رنگ سوسپانسیون حاوی نوترال رد و توئین ۸۰ از زرد به رنگ قرمز طی ۱۰ روز است. این تغییر رنگ به‌دلیل تجزیه شدن توئین ۸۰ است. این تست در شناسایی مایکوباکتریوم‌های اسکوتوکروموژن و نان‌کروموژن مفید است. مثلاً نتایج این تست برای مایکوباکتریوم‌های مارینوم و سیمیه به‌ترتیب مثبت و منفی است [۱].

۳,۵. فعالیت اوره‌آز

اساس این تست یک واکنش آمیداز و تغییر در pH محیط و درنتیجه تغییر رنگ محیط است. این تست بعد از ۲۴ ساعت گزارش می‌شود [۱].

۳,۶. تولید نیاسین

این تست برپایهٔ عدم تولید آنزیم تجزیه‌کنندهٔ نیاسین به ریبونوکلئوتید انجام می‌شود که درنتیجه نیاسین تجمع می‌یابد. یکی از مهم‌ترین تست‌های تشخیص اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس تجمع نیاسین است. اما نتیجهٔ این تست برای سایر مایکوباکتریوم‌های غیرتوبرکلوزیس منفی است [۱].

۳,۷. احیای نیترات

این تست نیز یکی از مهم‌ترین تست‌های تشخیص مایکوباکتریوم توبرکلوزیس است. توانایی مایکوباکتریوم‌ها در احیای نیترات به نیتریت با فاکتورهایی ازقبیل سن باکتری، دما و مهارکننده‌های آنزیمی تحت تأثیر قرار می‌گیرد. نتایج این تست برای مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و فورچئیتوم مثبت و برای مایوباکتریوم سیمیه منفی است [۱].

۳,۸. آریل سولفاتاز

آریل سولفاتاز آنزیمی است که پیوند بین گروه سولفات و حلقهٔ آروماتیک را هیدرولیز می‌کند. آریل سولفاتاز چهارده‌روزه یکی از مهم‌ترین تست‌های افتراق مایکوباکتریوم‌ها از نوکاردیا، رودوکوکوس و کورینه باکتریوم‌هاست. تست آریل سولفاتاز سریع (آریل سولفاتاز سه‌روزه) نیز برای تفکیک گونه‌های سریع‌رشد از گونه‌های اسکوتوکروموژن و نان‌کروموژن‌ها مفید است. برای مثال، در مایکوباکتریوم گزنوپی، آریل سولفاتاز مثبت است؛ درحالی که در مایکوباکتریوم سیمیه، نتیجهٔ تست آریل سولفاتاز منفی است [۱].

۳,۹. فعالیت پیرازینامیداز

اساس این تست تولید آنزیم پیرازینامیداز و تولید پیرازینوئیک اسید در محیط حاوی آگار است. درصورت تولید آنزیم پیرازینامید در محیط، پیرازینامید به پیرازینوئیک اسید تبدیل می‌شود و هنگام اضافه کردن فروس آمونیوم سولفات[2] به محیط، این معرف با پیرازینوئیک اسید واکنش نشان می‌دهد و در سطح محیط تغییر رنگ صورتی تا قرمز را شاهد خواهیم بود. نتایج این تست برای مایکوباکتریوم‌های سیمیه و بویس به‌ترتیب مثبت و منفی است (جدول ۲) [۱].

1. kinetics
2. ferrous ammonium sulfate

جدول ۲. بررسی تست‌های مختلف آزمایشگاهی در گونه‌های مختلف مایکوباکتریوم

گونه	دما		تولید رنگ‌دانه در حضور نور	تولید رنگ‌دانه در تاریکی	مقاومت به					کاتالاز							منبع
	25°C	42°C			NaCl	Picrate	Oleate	Thiacetazone	p-Nitrobenzoic acid	کاتالاز نیمه‌کمّی	کاتالاز مقاوم به حرارت	تجزیهٔ Tween 80	اوره‌آز	احیای نیترات	تولید نیاسین	آریل سولفات (سه‌روزه)	پیرازینامیداز	۱
M. kansasii	■		■						■	■	■	■	■	■			M	
M. gordonae	■			■			M	■	■	■	■	■					M	
M. gastri	■											■	■				M	
M. xeopi		■		■				■	M							■	M	
M. bovis						■	M	M				M	■					
M. tuberculosis						■						M	■	■	■			
M. ulcerans	■							■										
M. terrae	■						■	■	M	■	■	■		M			■	
M. simiae	■	■					■	■	■	■	■		■				■	
M. szulgai	■			■				■	■	■	■	M	■	■			■	
M. paratuberculosis		■									■							
M. marinum	■		■					M	M		M	■	■				M	
M. avium	■	■					M	■	■		M						M	
M. asiaticum	■			■			M	■	■	■	■	■						
M. cookie	■			■			■							■				
M. farcinogenes								■		■	■	■		■				
M. intracellulare	■						M	■	■		■						M	
M. scrofulaceum	■	■		■			■		■	■	■		■				M	
M. trivial	■				■		■	■	■	■	■	M		■			■	

■: نتیجهٔ تست مثبت

M: نتیجهٔ تست برای ۵۰ـ۸۵٪ سویه‌های باکتری مورد نظر مثبت است.

۴. روش‌های مولکولی تشخیص

از روش‌های فنوتایپیک (مرسوم) به روش استاندارد طلایی تشخیص مایکوباکتریوم‌ها یاد می‌شود؛ باوجود این، روش‌های فنوتایپیک هزینه‌بر و وقت‌گیر است و در برخی موارد نتایج آن‌ها گیج‌کننده؛ لذا توصیه می‌شود در کنار کاربرد روش‌های مرسوم، از روش مولکولی نیز استفاده شود [۲۳ـ۲۴]. روش‌های مولکولی قادرند گونه‌های مایکوباکتریومی را با سرعت زیاد و هزینهٔ کمتر، ولی درعین حال با دقت و صحت قابل قبولی تشخیص دهند [۲۵]. از مهم‌ترین روش‌های مولکولی که برای تشخیص مایکوباکتریوم‌ها استفاده می‌شود، می‌توان به این روش‌ها اشاره کرد: توالی‌یابی[1]، تکنیک هیبریدیزاسیون[2]، Polymerase Chain Reaction-Restriction Length Polymorphism (PCR-RFLP)، RAPD-PCR، PFGE، AFLP، SNPtyping، Rep-PCR، MIRU-VNTR، Spoligotyping، MLST و Real-time PCR [۲، ۱۹، ۲۶]. در این راستا مهم‌ترین ژن‌هایی که برای تشخیص مولکولی بررسی می‌شوند، عبارت‌اند از: 16S rRNA، ITS، *hsp65*، *rpoB*، *gyrB*، *dnaJ1*، *recA*، *sodA*، *secA*، *tuf*، *ssrA* و *smpB* [۲۶].

طبق مطالعات، هریک از این ژن‌ها در شناسایی و تفریق گونه‌های خاصی از مایکوباکتریوم‌ها بهتر عمل می‌کنند. برای مثال ژن *rpoB* در شناسایی و تشخیص گونه‌های سریع‌رشد مایکوباکتریومی عملکرد بهتری از سایر ژن‌ها از خود نشان می‌دهد [۲۶، ۲۷] و ژن *gyrB* فقط برای افتراق گونه‌های کُندرشد مایکوباکتریومی کاربرد دارد [۲۶]. ژن 16SrRNA استاندارد طلایی تشخیص مایکوباکتریوم‌هاست؛ اما افتراق مایکوباکتریوم‌های سریع‌رشد به‌دلیل وجود دو نسخه از این ژن با مشکلاتی مواجه است. برای مثال ژن 16SrRNA توانایی تشخیص مایکوباکتریوم گاستری (غیرپاتوژن) از مایکوباکتریوم کانزاسی (پاتوژن انسانی) را ندارد [۲۶]. همچنین برای شناسایی و افتراق اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم آویوم و توبرکلوزیس، هیچ‌یک از ژن‌های ذکرشده توصیه نمی‌شود؛ برای شناسایی این گروه از مایکوباکتریوم‌ها از عناصر الحاقی همچون *IS6110*، *IS901* و *IS1245* می‌توان بهره برد [۲۵، ۲۸]. پیشنهاد می‌شود جهت شناسایی صحیح و دقیق گونه‌های مایکوباکتریومی ترکیبی از ژن‌ها مطالعه شود [۲۶، ۲۹] (جدول ۳).

جدول ۳. تست‌های مولکولی جهت تشخیص مایکوباکتریوم‌های سریع‌رشد و کُندرشد

ژن	مایکوباکتریوم‌های سریع‌رشد	مایکوباکتریوم‌های کُندرشد	منبع
16S rRNA	■	■	۲۶،۲
rpoB	■		
Hsp65	■	■	
gyrB		■	
rpoBC		■	
dnaK	■	■	
ITS	■	■	۲۸،۲۵
Insertion Sequence		■	

۵. تجزیه و تحلیل مایکولیک‌اسید و دیگر اسیدهای چرب دیوارهٔ سلولی

در سال ۱۹۸۵م، سازمان کنترل بیماری‌ها (CDC) این روش را یکی از روش‌های مرجع تشخیص مایکوباکتریوم‌ها معرفی کرد [۴، ۳۰]. مایکولیک‌اسید یک ترکیب اسید چرب حاوی گروه‌های متعدد هیدروکسی و متوکسی بوده که تقریباً ۸۸ اتم کربن دارد. این اسید چرب در جنس‌های دیگری ازقبیل کورینه باکتریوم‌ها و نوکاردیا نیز وجود دارد؛ اما ترکیب شیمیایی مایکولیک‌اسید در هریک از آن‌ها متفاوت است. در طی فرایند تجزیه بر اثر حرارت pyrolysis و با استفاده از دستگاه GC[3]، مایکوباکتریوم‌ها محصول ۲۲ـ۲۸کربنی تولید کرده‌اند که سایر جنس‌ها این خصوصیت را ندارند [۳۰]. به‌طور کلی با استفاده از تکنیک‌های GC و HPLC[4] و فرایند تجزیه در حرارت مایکولیک‌اسید، هرکدام از گونه‌های مایکوباکتریومی قطعاتی از اسیدهای چرب با تعداد متغیری کربن آزاد ساخته که توسط شناساگرهای GC و HPLC شناسایی شده که درنهایت با توجه به متفاوت بودن این الگوها در گونه‌های مختلف شناسایی صورت می‌گیرد [۴، ۳۰].

به‌دلیل ماهیت کُندرشد بودن مایکوباکتریوم‌ها اغلب

1. sequencing
2. hybridization
3. gas-liquid chromatography
4. high-pressure liquid chromatography

تشخیص داده نمی‌شوند؛ این موضوع در نمونه‌های محیطی که تعداد بی‌شماری باکتری دارد، مهم‌تر است. لذا محققان مایکوباکتریولوژی ناچارند نمونه‌های مشکوک به مایکوباکتریوم‌ها را آلودگی‌زدایی[1] اولیه کنند تا میکروارگانیسم‌های مزاحم کمتر شوند [۳۱]. از مهم‌ترین روش‌های آلودگی‌زدایی مایکوباکتریوم‌ها می‌توان به روش‌های پتروف، Tacquet-Tison و CPC[2] اشاره کرد که در این میان روش پتروف (NaOH4%) برای نمونه‌های بالینی شناخته‌شده‌تر است؛ درحالی که روش CPC در جداسازی مایوباکتریوم از منابع محیطی عملکرد بهتری دارد [۸، ۲۸، ۳۲].

۶. مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی

در کنار شناسایی صحیح مایکوباکتریوم‌های عامل عفونت، انتخاب رژیم درمان دارویی صحیح نیز نقش کلیدی دارد. طبق شواهد موجود، ۳۰٪ از گزارش‌های مایکوباکتریوم‌های توبرکلوزیس مقاوم به چند دارو (MDR-TB) درواقع مایکوباکتریوم‌های غیرتوبرکلوزیسی هستند که اشتباه تشخیص داده شده‌اند. مطالعات نشان داده است که مایکوباکتریوم‌های محیطی به داروهای خط اول درمان سل مقاوم‌اند. نکتهٔ قابل توجه‌تر این است که درمان عفونت‌های مایکوباکتریوم‌های کُندرشد با سریع‌رشد متفاوت است [۲۰، ۳۲]. مایکوباکتریوم‌های کُندرشد به‌طور معمول با داروهای کلاریترومایسین خوراکی، ریفابوتین، سیپروفلوکساسین، ریفامپین و اتامبوتول درمان می‌شوند؛ درحالی که برای عفونت‌های مایکوباکتریوم سریع‌رشد ماکرولیدها، سفالوسپورین‌ها و فلوئوروکوئینولون‌ها تجویز می‌شوند [۳۴، ۳۳]. در این راستا برای تعیین حساسیت دارویی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس برای داروهای خط اول روش‌های تناسبی[3] و رادیومتریک و برای داروهای خط دوم روش تناسبی پیشنهاد می‌شود. درخصوص مایکوباکتریوم‌های سریع‌رشد، دیسک دیفوژن، دیسک الوشن و براث میکرودیلوشن روش‌های مناسبی شناخته شده؛ درحالی که رادیومتریک و براث میکرودیلوشن مناسب‌ترین روش‌های تعیین حساسیت دارویی[4] مایکوباکتریوم‌های کُندرشد است [۳۴ـ۳۵]. از روش‌های مولکولی که جهت بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در مایکوباکتریوم‌ها استفاده می‌شود، می توان به PCR single-strand conformational polymorphism (PCR-SSCP)، Sequencing، PCR-RFLP و Multiplex-PCR اشاره کرد [۳۳ـ۳۶]. درمان عفونت‌های مایکوباکتریومی ترکیبی از جراحی و آنتی‌بیوتیک‌تراپی است. عفونت‌های منتشره که بیشتر توسط اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم آویوم ـ انتروسلولار به‌وجود می‌آیند، توسط داروهای اتامبوتول، ریفامپین، آمیکاسین و کلوفازیمین به مدت ۱ تا ۲ ماه درمان می‌شوند. عفونت‌های چشمی که بیشتر توسط مایکوباکتریوم‌های سریع‌رشد، به‌خصوص مایکوباکتریوم‌های آبسسوس و چلونه، به‌وجود می‌آیند، توسط آمینوگلیکوزیدها و کوئینولون‌ها درمان می‌شوند. برای عفونت‌های استخوانی و مفاصل که بیشتر مایکوباکتریوم ترا[5]، مارینو م[6] و نان‌کروموژنیکوم[7] موجِد آن‌ها هستند، داروهای ماکرولیدی، سولفانامیدها، ریفامپین و ریفابوتین برای یک دورهٔ سه تا چهارماهه تجویز می‌شوند؛ همچنین برای درمان عفونت‌های عصبی که بیشتر توسط مایکوباکتریوم‌های کانزاسی، گوردونه و آویوم کمپلکس به‌وجود می‌آیند، از ترکیباتی همچون کلاریترومایسین، ریفامپین و اتامبوتول استفاده می‌شود. در عفونت‌های جلدی نیز که در بیشتر موارد به‌وسیلهٔ مایکوباکتریوم‌های سریع‌رشدی چون مایکوباکتریوم فورچئیتوم، چلونه و آبسسوس به‌وجود می‌آیند، از روش‌های جراحی و ماکرولیدها استفاده می‌شود؛ درخصوص عفونت‌های جلدی باید مراقب عفونت‌های لنفاوی، منتشره و استئومیلیت بود که بر اثر عفونت‌های جلدی پدید می‌آیند [۳۴]. باوجود این، تشخیص غلط و تجویز اشتباه دارویی موجب مقاومت‌های دارویی مایکوباکتریوم‌های توبرکلوزیس و غیرتوبرکلوزیس شده است [۲۰]. مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی مایکوباکتریوم‌ها می‌تواند درنتیجهٔ جهش یا اکتساب ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتکی (ترانسپوزون‌ها) صورت گیرد. اسیدهای چرب موجود در دیوارهٔ سلولی مایکوباکتریوم‌ها یک سد فیزیکی و شیمیایی برای ورود ژن‌ها و ترکیبات خارجی به‌شمار می‌آید. طبق مطالعات جارلیر و همکارانش در سال ۱۹۹۰، مشخص شد که دلیل مقاومت ذاتی اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم چلونه در برابر بتالاکتام‌ها دیوارهٔ سلولی این باکتری‌هاست. مشابه این پدیده را می‌توان درمورد مایکوباکتریوم آبسسوس و مقاومت به آمینوگلیکوزیدها مثال زد. از دیگر دلایل مقاومت‌های ذاتی مایکوباکتریوم‌ها می‌توان به مواردی همچون تولید ذاتی آنزیم‌های تجزیه‌کنندهٔ آنتی‌بیوتیک‌ها (مقاومت به ریفامپین، بتالاکتاماز و ماکرولیدها)، و پمپ‌های افلاکس[8] اشاره کرد. whiB7 یکی از مهم‌ترین

1. decontamination
2. cetyl pyridinium choloride
3. proportional method
4. antimicrobial susceptibility test
5. M. terrae
6. M. marinum
7. M. nonchromogenicum
8. efflux pumps

ژن‌هایی است که در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به‌چشم می‌خورد و مسئول مقاومت دربرابر ایزونیازید، اتامبوتول و سیکلوسرین است؛ جهش‌های خودبه‌خودی ژن‌ها که از این میان می‌توان مقاومت آنتی‌بیوتیکی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس[1] دربرابر ریفامپین را مثال زد. در کنار عوامل ذاتی، دومین عامل اصلی مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی مایکوباکتریوم‌ها می‌توان اکتساب ژن‌های مقاومت را نمونه آورد که در طی آن، مایکوباکتریوم‌ها با اکتساب ژن‌های پلاسمیدی و ترانسپوزون‌ها درمقابل طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم می‌شوند [۳۸ـ۳۹] (جدول ۴).

جدول ۴. داروهای انتخابی برای درمان انواع عفونت‌های مایکوباکتریومی

گونه	نوع عفونت	دارو	منبع
M. abscessus	تنفسی، جلدی، زخم، چشم، کاتتر و منتشره	Linezolid و ciprofloxacin و clarithromycin-azithromycin و amikacin و imipenem و cefoxitin	۳۴ و ۳۹
M. chelonae	جلدی، زخم، چشم و سینوزیت	Clarithromycin-azithromycin و linezolid و tobramycin و imipenem و amikacin	
M. fortuitum	زخم، کاتاتر و به‌ندرت تنفسی	Ciprofloxacin و trimethoprim sulfamethoxazole و imipenem و linezolid و cefoxitinclarithromycin azithromycin	
M. aviumcomplex	تنفسی، منتشره، جلدی، لنفادنیت و مفاصل	Clarithromycin-azithromycin و rifampin-rifabutin و ethambutol و linezolid و amikacinstreptomycin و ciprofloxacin	
M. kansasii	تنفسی و منتشره در بیماران ایدز	Clarithromycin-azithromycin و trimethoprim sulfamethoxazole و linezolid و ethambutolciprofloxacin و ethambutol	
M. marinum	زخم و مفاصل	Linezolid و amikacin و ethambutol و ciprofloxacin و trimethoprim-sulfamethoxazole	
M. simiae	تنفسی	Clarithromycin-azithromycin و moxifloxacin و trimethoprim amikacin و sulfamethoxazole	
M. xenopi	تنفسی، مفاصل و بافت نرم	Clarithromycin-azithromycin و rifampin-rifabutin و moxifloxacin و streptomycin و ethambutol	
M. scrofulaceum	تنفسی، لنفادنیت و منتشره	Clarithromycin-azithromycin و linezolid و doxycycline و ethambutol	
M. malmoense	تنفسی، لفادنیت و منتشره	rifampin, و ethambutol و streptomycin و imipenem و clarithromycin or rifampin rifabutin و azithromycin	
M. szulgai	تنفسی، جلدی و مفاصل	Isoniazid و ethambutol و streptomycin و imipenem و trimethoprim-sulfamethoxazole	
M. ulcerans	زخم	ethambutol و p-amino salicylic acid و ciprofloxacin و cefoxitin و linezolid	
M. genavense	تنفسی، جلدی، لنفادنیت و منتشره	Clarithromycin و rifampin و ethambutol و ciprofloxacin و rifampin or rifabutin	

مقاومت‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس امروزه به نگرانی جهانی تبدیل شده است. طی سال‌های ۱۹۸۲م، با توجه به شناخت کامل فیزیولوژی، متابولیسم، فاکتورهای ویرولانس و داروهای درمان سل، بین پزشکان این باور شکل گرفت که این بیماری تا ۱۰ سال آینده به‌طور کامل ریشه‌کن و فقط به کتب پزشکی و گزارش‌های موردی محدود می‌شود؛ اما با توجه به افزایش گزارش‌های مرگ‌ومیر ناشی از سل و ظهور سویه‌های مقاوم به داروی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در سراسر جهان، سازمان جهانی بهداشت در سال ۱۹۹۳م این بیماری را یکی از فوریت‌های جهانی اعلام کرد [۴۰]. از مهم‌ترین مقاومت‌های آنتی‌بیوتیک مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می‌توان به مقاومت‌های چندگانه (MDR-TB) و مقاومت گستردهٔ دارویی (XDR-TB) اشاره کرد. سویه‌های با مقاومت چندگانهٔ دارویی به دو داروی مهم خط اول ضدسل، ایزونیازید و ریفامپین، مقاوم هستند. سویه‌های مقاومت گستردهٔ دارویی علاوه‌بر MDR بودن، به فلوئوروکوئینولون‌ها و دست‌کم یکی از آمینوگلیکوزیدهای تزریقی خط دوم (آمیکاسین، کانامایسین و کاپرومایسین) مقاوم‌اند. همچنین در سال ۲۰۰۹م، برای اولین بار در جهان سویه‌ای از مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در کشور ایران شناسایی شد که به تمام داروهای خط اول و دوم سل مقاوم بود [۴۱ـ۴۲].

1. M. tuberculosis

در طی مطالعات مولکولی مشخص شد که در ارتباط با داروهای خط اول ضدسل، جهش در ژن‌های katG، inhA و ahpC در مقاومت به ایزونیازید، جهش‌های ژن rpoB در اکتساب مقاومت به ریفامپین، جهش‌های ژن pncA موجب مقاومت به پیرازینامید، جهش در ژن‌های rpsL، rrs و gidB و جهش در ژن embB موجب مقاومت به اتامبوتول می‌شود. همچنین دربارهٔ مقاومت‌های خط دوم سل، جهش در ژن‌های gyrA و gyrB موجب مقاومت دربرابر فلئوروکوئینولون‌ها، به‌خصوص سیپروفلوکساسین، می‌شود و جهش در ژن rrs موجب مقاومت به آمیکاسین و کانامایسین می شود. همچنین جهش در ژن tylA منجر به مقاومت دربرابر کاپرومایسین و ویومایسین می‌شود [۴۱]. در بین گونه‌های مایکوباکتریوم‌های محیطی، موضوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی مایکوباکتریوم‌های سریع‌رشد بسیار مهم‌تراست. طبق مطالعات صورت‌گرفته در ایران، گونه‌های مایکوباکتریوم فورچئیتوم، کانزاسی و سیمیه فراوان‌ترین مایکوباکتریوم‌های محیطی جداشده از نمونه‌های بالینی هستند که در این میان، مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی مایکوباکتریوم‌های فورچئیتوم، سیمیه و آبسسوس از همه مهم‌تر است؛ به‌طوری که مایکوباکتریوم آبسسوس کابوس آنتی‌بیوتیک شناخته می‌شود. براساس مطالعات صورت‌گرفته در این زمینه، لاینزولید[1] مهم‌ترین داروی درمان عفونت‌های سریع‌رشد مایکوباکتریومی است که کمتر گونهٔ مایکوباکتریومی دربرابر این دارو مقاوم است؛ ضمن اینکه از این دارو برای درمان عفونت‌های سل مقاوم به چند دارو (MDR-TB) و مقاومت گستردهٔ دارویی (XDR-TB) نیز استفاده می‌شود [۳۶ـ۴۳] (جدول ۵).

جدول ۵. مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی و مکانیسم ژنتیکی آن‌ها در گونه‌های مایکوباکتریوم

دارو	ژن‌های جهش‌یافته	عملکرد ژن	منابع
ایزونیازید	*katG*, *inhA* *ahpC* *kasA* *ndh* *oxyR*	کاتالاز/ پراکسیداز، انوئیل ردوکتاز، alkyl hydro peroxide reductase acyl carrier protein NADH dehydrogenase Hydrogen peroxide inducible genes activator	۴۱ و ۴۶
ریفامپین	*rpoB*	b-subunit of RNA polymerase	۴۱
استرپتومایسین	*rpsL* *rrs* *gidB*	S12 ribosomal protein 16S rRNA 7-methylguanosine methyltransferase	۴۱
پیرازینامید	*pncA* *rpsA* *panD*	PZase	۴۱ و ۴۷ و ۴۸
اتامبوتول	*embB*	arabinosyl transferase	۴۱
فلئوروکوئینولون‌ها	*gyrA, gyrB*	DNA gyrase	۴۱
آمیکاسین	*rrs*	16S rRNA	۴۱
کانامایسین	*rrs*	16S rRNA	۴۱
کاپرومایسین/ ویومایسین	*tlyA*	rRNA methyltransferase	۴۱
اتیونامید	*inhA*	enoyl reductase	۴۱
پاراـآمینوسالیسیلیک اسید	*thyA*	thymidylate synthase A	۴۱
کلوفازیمین	*rv0678*	transcription repressor for efflux pump MmpL5	۴۹
ریفابوتین	*rpoB*	b-subunit of RNA polymerase	۵۰
لینزولید	*rplc*	ribosomal L3 protein	۵۱
Delaminid	*Rv3547*	Hypothetical 16.4 kDa protein	۴۴
Bedaquiline	*atpE*	ATP synthase	۴۴

رژیم دارویی روتین ضدسل (داروهای خط اول و دوم درمان) گذشته‌از طولانی بودن، پیچیدگی‌های برنامهٔ مصرف دارویی و ظهور سویه‌های مقاوم به درمان برای مصرف‌کنندگان اثرات سمّی نیز به‌همراه دارند. امروزه محققان به‌دنبال معرفی داروهای مؤثری هستند که آثار سمّی کمتری داشته باشند. داروهای خط اول درمان سل برای اولین بار در اواسط قرن بیستم معرفی شدند. تمام این داروها بین سال‌های ۱۹۵۲ (ایزونیازید) و ۱۹۶۳م (ریفامپین) کشف شدند. امروزه سازمان

1. linezolid

غذا و داروی ایالات متحدهٔ امریکا (FDA) فهرست جدیدی از داروهای ضدسل ازقبیل bedaquiline، delamanid، clofazimine، linezolid و PA-824 را ارائه کرده است [۴۴].

Bedaquiline (TMC 207)

اولین داروی مورد تأیید قرار گرفتهٔ ۴۰ سال اخیر درمان سل است که به خانوادهٔ diarylquinolines تعلق دارد. مکانیسم اصلی این دارو ممانعت از ساخت ATP است که درنهایت مایکوباکتریوم‌ها بر اثر کاهش سطح ATP سلولی و به‌هم خوردن pH طبیعی سلول ازبین می‌روند. این آنزیم در سلول‌های انسان در ۳ اسیدآمینه از آنزیم مایکوباکتریوم‌ها متفاوت است؛ این اسیدآمینه‌های متفاوت در زیرواحد C آنزیم قرار دارند؛ درنتیجه این زیرواحد در دو سلول انسان و باکتری شکل و ساختار متفاوتی دارد. این دارو با اتصال به ساب یونیت C آنزیم ATP سنتاز از فعالیت این آنزیم جلوگیری می‌کند. یکی از مزیت‌های این دارو نیمهٔ عمر زیاد آن است که درنتیجهٔ آن، بیماران مجبور به مصرف روزانه و دوزهای بالا نیستند.

PA-824

داروی مشتق از مترونیدازول و نیترومیدازوکسازین متعلق به کلاس دارویی nitroimidazopyran است که علیه مایکوباکتریوم‌های درحال تکثیر و غیرفعال[1] اثر کشندگی دارد. تا به امروز دو مکانیسم برای فعالیت ضدسلی این دارو تعریف شده است: ۱. ممانعت از سنتز کتومایکولات که یکی از ترکیبات اصلی دیوارهٔ سلولی مایکوباکتریوم‌هاست و باعث مرگ مایکوباکتریوم‌های درحال تکثیر می‌شود. ۲. فعالیت احیاکنندگی نیتریک اکسید (مشابه سیانید) و ممانعت از فرایند تنفس سلولی که مایکوباکتریوم‌های غیرفعال از نظر تکثیر سلولی را ازبین می‌برد. طبق مطالعات، این دارو اثر کشندگی بر سویه‌های حساس و مقاوم به دارو را دارد؛ ضمن اینکه طی مطالعات EBA مشاهده شد که تجویز هم‌زمان این دارو با پیرازینامید و موکسی‌فلوکساسین بسیار مؤثرتر و اثربخش‌تر از مصرف هم‌زمان داروهای خط اول درمان سل است [۴۴].

Delamanid

داروی مشتق از نیترودهیدروایمیدازوکسازول است که از سنتز مایکولیک‌اسید جلوگیری می‌کند. بااینکه MIC این دارو برای مایکوباکتریوم‌های داخل‌سلولی نوعی موش کمتر از PA-824 است، برای رسیدن به محدودهٔ درمانی نیازمند تجویز روزانه دو دوز دارویی است. طی مطالعاتی که در این زمینه صورت گرفت، مشخص شد که این دارو می‌تواند کاندید خوبی برای درمان عفونت‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس حساس به دارو و همین‌طور مقاوم به دارو باشد.

برخی داروهای دیگر نظیر اگزازولیدینون‌ها، بتالاکتام‌ها، کلوفازیمین و سوتزولید از داروهای غیررسمی ضدسلی هستند که طبق رده‌بندی سازمان جهانی بهداشت، جزو داروهای خط پنجم سل به‌شمار می‌آیند.

Oxazolidinones

لینزولید که اولین و مهم‌ترین داروی تجاری این خانواده است، برای درمان عفونت‌های استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) و همچنین درمان بیمارن سل مقاوم به دارو تجویز می‌شود. این دارو با اتصال به زیرواحد 23SrRNA از فرایند پروتئین‌سازی جلوگیری می‌کند.

Clofazimine

یک ترکیب رنگی از riminophenazine است که برای اولین بار در سال ۱۹۵۴م ساخته شد. این دارو قبل از درمان سل برای درمان عفونت‌های M. Leprae و M. lepromatosis به‌کار می‌رفت. مکانیسم عمل این دارو ممانعت از عملکرد آنزیم NADH dehydrogenase زنجیرهٔ تنفس باکتری و درنتیجه تولید رادیکال های آزاد اکسیژن است که برای باکتری خاصیت کشندگی دارد. این دارو نیمهٔ عمر زیادی دارد. طبق مطالعات، این دارو در درمان بیماران سل مقاوم به دارو مفید خواهد بود.

B-Lactams

آموکسی‌سیلین، ایمی‌پنم، ارتاپنم و مروپنم از مهم‌ترین بتالاکتام‌های ضدسلی هستند که سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با تولید بتالاکتامازهایی ازقبیل BlaC، نسبت به آن‌ها مقاوم‌اند. کلاولانات یکی از مهارکننده‌های خوراکی بتالاکتاماز است که فعالیت ژن BlaC را کاهش می‌دهد و موجب اثربخشی بتالاکتام‌ها در درمان سل می‌شود. مطالعات نشان داده است که ترکیبات حاوی بتالاکتام ـ مهارکننده‌های بتالاکتاماز ازقبیل مروپنم ـ کلاولانات علیه سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با مقاومت گستردهٔ دارویی (XDR-TB) اثر درمانی چشمگیری دارد.

از مهم‌ترین مشکلات مطالعات کشف و ارزیابی اثربخشی داروهای ضدسل می توان به شرایط نگه‌داری و انتقال دارو (مانند ایمی‌پنم و سیلیاستاتین) و هزینه‌های گزاف ساخت (مانند bedaquiline) اشاره کرد. با توجه به ظهور سویه‌های مقاوم به دارو و مشکلات و عوارض داروهای موجود، نیاز فوری

1. dormant

به معرفی داروهای جدیدتر که دورهٔ مصرف کوتاه‌تر، عوارض جانبی کمتر و درعین حال اثربخشی بیشتری را داشته باشند، احساس می‌کنیم و برای نیل به این هدف باید برنامهٔ کلی درجهت حمایت از چنین مطالعاتی در سراسر جهان تنظیم و اجرا شود [۴۴ـ۴۵] (جدول ۶).

جدول ۶. داروهای انتخابی برای درمان مایکوباکتریوم توبرکلوزیس

خط دارویی	آنتی‌بیوتیک‌ها	منابع
خط اول	ایزونیازید، ریفامپین، اتامبوتول، پیرازینامید و استرپتومایسین	۴۴ و ۵۲ـ۵۳
خط دوم	فلئوروکوئینولون‌ها (سیپروفلوکساسین)، آمینوگلیکوزیدهای تزریقی (آمیکاسین، کانامایسین، کاپرومایسین، ویومایسین و استرپتومایسین)	
خط سوم	آمینوگلیکوزیدهای تزریقی، اتیونامید، پیرازینامید و افلوکساسین	
خط چهارم	اتیونامید، سیکلوسرین، پارا آمینوسالیسیلیک اسید، پروتیونامید و protionamide	
خط پنجم	Oxazolidinones) لینزولید و Sutezolid، کلوفازیمین، بتالاکتام‌ها (meropenem-clavulanate	

۷. نتیجه‌گیری

امروزه با توجه به افزایش همه‌گیری‌های ویروس نقص سیستم ایمنی و بیماران خاص (سرطان، دریافت‌کنندگان پیوند و مصرف‌کنندگان داروهای سرکوب‌کنندهٔ سیستم ایمنی) شاهد افزایش عفونت‌های مایکوباکتریوم های غیرسلی هستیم [۵]. با توجه به اهمیت بالینی مایکوباکتریوم‌های غیرتوبرکلوزیس و مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی این گروه از باکتری‌ها، آزمایشگاه‌های تشخیص طبی و تیم درمان باید به عفونت‌های مایکوباکتریوم‌های محیطی، به‌خصوص در بیماران واجد شرایط خاص، توجه ویژه‌ای کنند.

References

[1]. Lévy-Frébault VV, Portaels F. Proposed minimal standards for the genus Mycobacterium and for description of new slowly growing Mycobacterium species. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 1992; 42(2): 315-23.

[2]. Jagielski T, Minias A, Van Ingen J, Rastogi N, Brzostek A, Żaczek A, et al. Methodological and clinical aspects of the molecular epidemiology of Mycobacterium tuberculosis and other Mycobacteria. Clinical microbiology reviews. 2016; 29(2): 239-90.

[3]. Kawamura Y, Itoh Y, Mishima N, Ohkusu K, Kasai H, Ezaki T, et al. High genetic similarity of Streptococcus agalactiae and Streptococcus difficilis: S. difficilis Eldar et al. 1995 is a later synonym of S. agalactiae Lehmann and Neumann 1896 (Approved Lists 1980). International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2005; 55(2): 961-65.

[4]. Butler WR, Guthertz LS. Mycolic acid analysis by high-performance liquid chromatography for identification of Mycobacterium species. Clinical microbiology reviews. 2001; 14(4): 704-26.

[5]. Shamaei M, Marjani M, Farnia P, Tabarsi P, Mansouri D. Human infections due to Mycobacterium lentiflavum: first report in Iran. Iranian journal of microbiology. 2010; 2(1): 29-31.

[6]. Velayati AA, Farnia P, Mozafari M, Malekshahian D, Farahbod AM, Seif S, et al. Identification and genotyping of Mycobacterium tuberculosis isolated from water and soil samples of a metropolitan city. CHEST Journal. 2015; 147(4): 1094-102.

[7]. Bogan BW, Sullivan WR. Physicochemical soil parameters affecting sequestration and mycobacterial biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. Chemosphere. 2003; 52(10): 1717-26.

[8]. Azadi D, Shojaei H, Pourchangiz M, Dibaj R, Davarpanah M, Naser AD, et al. Species diversity and molecular characterization of nontuberculous mycobacteria in hospital water system of a developing country, Iran. Microbial Pathogenesis. 2016; 100: 62-69.

[9]. World Health Organization (WHO). Global tuberculosis report 2013: World Health Organization; 2013.

[10]. Vantarakis A, Tsintzou A, Diamandopoulos A, Papapetropoulou M. Non-tuberculosis mycobacteria in hospital water supplies. Water, Air, & Soil Pollution. 1998; 104(3): 331-37.

[11]. Organization WHO. The global MDR-TB & XDR-TB response plan 2007-2008. 2007.

[12]. Majoor CJ, Magis-Escurra Ibanez C, Ingen Jv, Boeree MJ, Soolingen Dv. Epidemiology of Mycobacterium bovis disease in humans, The Netherlands, 1993-2007. 2011.

[13]. Cai L, Chen X, Zhao T, Ding B-C, Zhang J-Z. Identification of Mycobacterium marinum 65 kD heat shock protein gene by polymerase chain reaction restriction analysis from lesions of swimming pool granuloma. Chinese medical journal. 2006; 119(1): 43-48.

[14]. Primm TP, Lucero CA, Falkinham JO. Health impacts of environmental mycobacteria. Clinical microbiology reviews. 2004; 17(1): 98-106.

[15]. Hartmans S, de Bont JA, Stackebrandt E. The Genus Mycobacterium--Nonmedical. The Prokaryotes: Springer; 2006. p. 889-918.

[16]. Mirsaeidi M, Machado RF, Garcia JG, Schraufnagel DE. Nontuberculous mycobacterial disease mortality in the United States, 1999–2010: a population-based comparative study. PloS one. 2014; 9(3): e91879.

[17]. Hoefsloot W, Van Ingen J, Andrejak C, Ängeby K, Bauriaud R, Bemer P, et al. The geographic diversity of nontuberculous mycobacteria isolated from pulmonary samples: an NTM-NET collaborative study. European Respiratory Journal. 2013; 42(6): 1604-13.

[18]. Hashemi-Shahraki A, Darban-Sarokhalil D, Heidarieh P, Feizabadi MM, Deshmir-Salameh S, Khazaee S, et al. Mycobacterium simiae: a possible emerging pathogen in Iran. Japanese journal of infectious diseases. 2013; 66(6): 475-79.

[19]. Katoch V. Infections due to non-tuberculous mycobacteria (NTM). Indian Journal of Medical Research. 2004; 120(4): 290.

[20]. Nasiri MJ, Dabiri H, Darban-Sarokhalil D, Shahraki AH. Prevalence of non-tuberculosis mycobacterial infections among tuberculosis suspects in Iran: systematic review and meta-analysis. PloS one. 2015; 10(6): e0129073.

[21]. Brander E, Jantzen E, Huttunen R, Julkunen A, Katila M. Characterization of a distinct group of slowly growing mycobacteria by biochemical tests and lipid analyses. Journal of clinical microbiology. 1992; 30(8): 1972-75.
[22]. Cook VJ, Turenne CY, Wolfe J, Pauls R, Kabani A. Conventional methods versus 16S ribosomal DNA sequencing for identification of nontuberculous mycobacteria: cost analysis. Journal of clinical microbiology. 2003; 41(3): 1010-5.
[23]. Dinnes J, Deeks J, Kunst H, Gibson A, Cummins E, Waugh N, et al. A systematic review of rapid diagnostic tests for the detection of tuberculosis infection. HEALTH TECHNOLOGY ASSESSMENT-SOUTHAMPTON. 2007; 11(3).
[24]. Kent PT, Kubica GP. Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory: US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control; 1985.
[25]. Gevers D, Cohan FM, Lawrence JG, Spratt BG, Coenye T, Feil EJ, et al. Re-evaluating prokaryotic species. Nature Reviews Microbiology. 2005; 3(9): 733-39.
[26]. Dai J, Chen Y, Dean S, Morris JG, Salfinger M, Johnson JA, et al. Multiple-genome comparison reveals new loci for Mycobacterium species identification. Journal of clinical microbiology. 2011; 49(1): 144-53.
[27]. Nasiri MJ, Shahraki AH, Fooladi AAI, Dabiri H, Feizabadi MM. rpoB Gene Sequencing for Identification of Rapidly Growing Mycobacteria. Archives of Pediatric Infectious Diseases. 2016. (in press)
[28]. Parvandar-Asadollahi K, Mosavari N, Mayahi M. Genotyping of Mycobacterium avium subsp. avium isolates from naturally infected lofts of domestic pigeons in Ahvaz by IS901 RFLP. Iranian journal of microbiology. 2015; 7(5): 260.
[29]. Devulder G, de Montclos MP, Flandrois J. A multigene approach to phylogenetic analysis using the genus Mycobacterium as a model. International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2005; 55(1): 293-302.
[30]. Tisdall PA, Roberts GD, Anhalt JP. Identification of clinical isolates of mycobacteria with gas-liquid chromatography alone. Journal of clinical microbiology. 1979; 10(4): 506-14.
[31]. Falkinham Iii J. Surrounded by mycobacteria: nontuberculous mycobacteria in the human environment. Journal of applied microbiology. 2009; 107(2): 356-67.
[32]. Pfyffer GE, Kissling P, Wirth R, Weber R. Direct detection of Mycobacterium tuberculosis complex in respiratory specimens by a target-amplified test system. Journal of clinical microbiology. 1994; 32(4): 918-23.
[33]. Esfahani BN, Esfahani FSZ, Bahador N, Moghim S, Radaei T, Yazdi HR, et al. Analysis of DNA gyrA Gene Mutation in Clinical and Environmental Ciprofloxacin-Resistant Isolates of Non-Tuberculous Mycobacteria Using Molecular Methods. Jundishapur journal of microbiology. 2016; 9(3).
[34]. Brown-Elliott BA, Nash KA, Wallace RJ. Antimicrobial susceptibility testing, drug resistance mechanisms, and therapy of infections with nontuberculous mycobacteria. Clinical microbiology reviews. 2012; 25(3): 545-82.
[35]. Martin A, Morcillo N, Lemus D, Montoro E, da Silva Telles M, Simboli N, et al. Multicenter study of MTT and resazurin assays for testing susceptibility to first-line anti-tuberculosis drugs. The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease. 2005; 9(8): 901-6.
[36]. Heidarieh P, Shojaei H, Feizabadi MM, Havaei A, Hashemi A, Ataei B, et al. Molecular identification and conventional susceptibility testing of Iranian clinical Mycobacterium fortuitum isolates. Iranian Journal of Basic Medical Sciences. 2010; 13(1): 210-15.
[37]. Shojaei H, Heidarieh P, Hashemi A, Feizabadi MM, Naser AD. Species identification of neglected nontuberculous mycobacteria in a developing country. Japanese journal of infectious diseases. 2011; 64(4): 265-71.
[38]. Nessar R, Cambau E, Reyrat JM, Murray A, Gicquel B. Mycobacterium abscessus: a new antibiotic nightmare. Journal of antimicrobial chemotherapy. 2012: dkr578.
[39]. Falkinham 3rd J. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. Clinical microbiology reviews. 1996; 9(2): 177.
[40]. Daniel TM. The history of tuberculosis. Respiratory Medicine. 2006; 100(11): 1862-70.
[41]. Da Silva PE, Palomino JC. Molecular basis and mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis: classical and new drugs. Journal of antimicrobial chemotherapy. 2011; 66(7): 1417-30.
[42]. Velayati AA, Masjedi MR, Farnia P, Tabarsi P, Ghanavi J, ZiaZarifi AH, Hoffner SE, et al. Emergence of new forms of totally drug-resistant tuberculosis bacilli: super extensively drug-resistant tuberculosis or totally drug-resistant strains in Iran. Chest Journal. 2009; 136(2): 420-25.
[43]. Sotgiu G, Centis R, D'Ambrosio L, Alffenaar J-WC, Anger HA, Caminero JA, et al. Efficacy, safety and tolerability of linezolid containing regimens in treating MDR-TB and XDR-TB: systematic review and meta-analysis. European Respiratory Journal. 2012; 40(6): 1430-42.
[44]. Wong EB, Cohen KA, Bishai WR. Rising to the challenge: new therapies for tuberculosis. Trends in microbiology. 2013; 21(9): 493-501.
[45]. Brigden G, Hewison C, Varaine F. New developments in the treatment of drug-resistant tuberculosis: clinical utility of bedaquiline and delamanid. Infection and drug resistance. 2015; 8: 367.
[46]. Lee AS, Teo AS, Wong S-Y. Novel mutations in ndh in Isoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosisIsolates. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2001; 45(7): 2157-59.
[47]. Shi W, Zhang X, Jiang X, Yuan H, Lee JS, Barry CE, et al. Pyrazinamide inhibits trans-translation in Mycobacterium tuberculosis. Science. 2011; 333(6049): 1630-32.
[48]. Zhang S, Chen J, Shi W, Liu W, Zhang W, Zhang Y, et al. Mutations in panD encoding aspartate decarboxylase are associated with pyrazinamide resistance in Mycobacterium tuberculosis. Emerging microbes & infections. 2013; 2(6): e34.
[49]. Zhang S, Chen J, Cui P, Shi W, Zhang W, Zhang Y, et al. Identification of novel mutations associated with clofazimine resistance in Mycobacterium tuberculosis. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2015; 70(9): 2507-10.
[50]. Heep M, Rieger U, Beck D, Lehn N. Mutations in the Beginning of the rpoBGene Can Induce Resistance to Rifamycins in both Helicobacter pylori and Mycobacterium tuberculosis. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2000; 44(4): 1075-77.
[51]. Beckert P, Hillemann D, Kohl TA, Kalinowski J, Richter E, Niemann S, et al. rplC T460C identified as a dominant mutation in linezolid-resistant Mycobacterium tuberculosis strains. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2012; 56(5): 2743-45.
[52]. Veziris N, Truffot-Pernot C, Aubry A, Jarlier V, Lounis N. Fluoroquinolone-containing third-line regimen against Mycobacterium tuberculosis in vivo. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2003; 47(10): 3117-22.
[53]. Organization WH. Policy guidance on drug-susceptibility testing (DST) of second-line antituberculosis drugs. 2008.
[54]. John R, Essien J, Akpan S, Okpokwasili G. Polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from aviation fuel spill site at Ibeno, Nigeria. Bulletin of environmental contamination and toxicology. 2012; 88(6): 1014-19.
[55]. Skupinska K, Misiewicz I, Kasprzycka-Guttman T. Polycyclic aromatic hydrocarbons: physicochemical properties, environmental appearance and impact on living organisms. Acta Pol Pharm. 2004; 61(3): 233-40.
[56]. Azadi D, Dibaj R, Pourchangiz M, Naser A, Shojaei H. Isolation and molecular identification of biodegrading Mycobacteria from water supplies of Iranian hospitals. Iranian journal of microbiology. 2014; 6(4): 240.
[57]. Haritash A, Kaushik C. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. Journal of hazardous materials. 2009; 169(1): 1-15.
[58]. [58] Zeinali M, Vossoughi M, Ardestani S. Characterization of a moderate thermophilic Nocardia

species able to grow on polycyclic aromatic hydrocarbons. Letters in applied microbiology. 2007; 45(6): 622-28.
[59]. Das S, Pettersson BF, Behra PR, Ramesh M, Dasgupta S, Bhattacharya A, Kirsebom LA, et al. Characterization of three Mycobacterium spp. with potential use in bioremediation by genome sequencing and comparative genomics. Genome biology and evolution. 2015 Jul 1; 7(7): 1871-86.
[60]. Kiyohara H, Nagao K, Yana K. Rapid screen for bacteria degrading water-insoluble, solid hydrocarbons on agar plates. Applied and Environmental Microbiology. 1982 Feb 1; 43(2): 454-47.

Infections, Identification Tests and New Therapeutic Techniques for Non-Tuberculosis Mycobacteria

Masoud Keikha[1], Morteza Karami-zarandi[2], Hosein Ali Rahdar[3*], Elahe Takei[4]

1. Ph.D. student of medical bacteriology, School of medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
2. Ph.D. student of medical bacteriology, School of medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3. Assistant professor of medical bacteriology, School of medicine, Iranshahr University of Medical Sciences, Iranshahr, Iran
4. Ph.D. student of medical bacteriology, School of medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

The genus Mycobacterium is a group of acid fast bacteria with DNA G+C content of 61-71% and the cell wall containing mycolic acid. According to growth physiology, mycobacteria grouped into two divisions: rapidly-growing and slow-growing mycobacteria. Three groups of mycobacteria exist based on pigment production: non-pigmented (non-photochromogens), photo-chromogens and scoto-chromogen. Both human obligate pathogens (*M. tuberculosis* and *M.leprae*) and opportunistic species exist in mycobacteria genus. There is different kind of mycobacterial infections such as respiratory infections, lymphatic node and skeletal involvement, dermal and disseminated infection. Spread of HIV virus and immunodeficiency in recent years makes the mycobacterial infections one of the most dangerous infections. Acid fast staining, biochemical tests and cell wall mycolic acid and fatty acid analysis are used for detection of mycobacteria. Different molecular tests including different PCR based methods; hybridization and sequencing tests are used for diagnosis and also verifying phenotypic and biochemical tests. Clarithromycin, rifabutin, ciprofloxacin, rifampin and ethambutol currently were used for treatment of slow growing mycobacterial infections. Whereas macrolides, cephalosporins and fluoroquinolones are used for rapidly growing treatment. For rapidly growing mycobacteria, disk diffusion method, disk elution method and broth micro dilution method are more appropriate. Radiometric methods and broth micro dilution method are choice methods for slow growing mycobacteria drug susceptibility test. Moreover molecular methods like PCR single-strand conformational polymorphism (PCR-SSCP), Sequencing, PCR-RFLP and Multiplex-PCR are developed for drug susceptibility determination in mycobacteria. According to non-tuberculosis mycobacteria clinical significance, clinical laboratories and health care team most take attention to diagnosis of these bacterial infections.

Received: 2018/05/22
Accepted: 2018/11/11

Keywords: Non-tuberculosis mycobacteria; Infection; Treatment; Molecular identification.