Medical Journal
of
Tabriz University of Medical Sciences and Health Services

Original Article

Molecular identification of Mutations causing resistance to tetracycline in mycoplasma isolated from patients with multiple sclerosis (Ms) in Kerman province

Maryam Naghib, Ramezan Mohebbi, Babak Kheirkhah*

Department of Microbiology, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran
*Corresponding author; E-mail: babakkheirkhah@yahoo.com

Received: 21 May 2017 Accepted: 15 February 2018 First Published online: 5 March 2019
Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 April-May; 41(1):100-107

Abstract

Background: Bacterial infections on the initiation or escalation, play a role in MS, and reports of the involvement of mycoplasma with worldwide distribution in these patients. Mycoplasma with the host cell membrane to mimic the autoimmune attack and the other macrolide antibiotics have become resistant to the first treatment. The purpose of this research was to identify mutations causing resistance to tetracycline in mycoplasmas isolated from patients with MS Kerman province.

Methods: A total of 32 samples of cerebrospinal fluid and 48 samples of urine results in a non-random sampling of patients with MS prepared and enrich one night in PPLO broth, were gathered during a 7 weeks of continuous cultivation in PPLO broth and agar. DNA was extracted from positive examples to identify the type of bacteria (Nested-PCR) and was used tetracycline resistant (rrs3 and rrs4) of 16SrRNA the method (Duplex-PCR), as well as was performed nucleotide sequencing and phylogenetic tree.

Results: Growth was observed in 12 cases, but after (Nested-PCR), only 5 samples were detected (1 sample of cerebrospinal fluid and urine samples 4) mycoplasma. But In (Duplex-PCR), to show only urine samples, alleles.

Conclusion: The phylogenetic was found to have mutated alleles at different points, but for a definitive answer to the resistance to tetracycline, additional research is required. Based on the findings, have mutated alleles has the potential to tetracycline resistance.

Keyword: Mycoplasma, MS, Antibiotic resistance, Tetracycline, rrs3 alleles and rrs4.

How to cite this article: Naghib M, Mohebbi R, Kheirkhah B. [Molecular identification of mutations causing resistance to tetracycline in Mycoplasma isolated from patients with Multiple sclerosis (MS) in Kerman Province]. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 April-May;41(1):100-107. Persian.

© 2019 The Author(s). This is an Open Access article published by Tabriz University of Medical Sciences under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

مقاله پژوهشی

شناسایی مولکولی جهش‌های ایجاد کننده مقاومت به تتراسایکلین در باکتریهای مایکوپلاسمای جدا شده از بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس (ام اس) استان کرمان

مریم نقیب، رمضان محبی، بابک خیرخواه*

گروه میکروبیولوژی، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران
*نویسنده مسئول؛ ایمیل babakkheirkhah@yahoo.com

دریافت: ۱۳۹۶/۲/۳۱ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۲۶ انتشار برخط: ۱۳۹۷/۱۲/۱۴
مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تبریز. فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۸؛ ۴۱(۱):۱۰۰-۱۰۷

چکیده

زمینه: عفونت‌های باکتریایی بر شروع یا تشدید حملات، در بیماری مولتیپل اسکلروزیس (ام اس) نقش اساسی دارند و گزارشهایی مبنی بر دخالت مایکوپلاسما با انتشار جهانی در این بیماری وجود دارد. مایکوپلاسما با تقلید از غشای سلول میزبان منجر به حملات خود ایمنی می‌شود و از سوی دیگر به آنتی‌بیوتیک‌های ماکرولید به عنوان اولین روش درمان مقاوم شده‌اند. هدف این تحقیق شناسایی مولکولی جهش‌های ایجاد کننده مقاومت به تتراسایکلین در مایکوپلاسماهای جدا شده از بیماران مبتلا به ام اس استان کرمان بود.

روش‌کار: تعداد ۳۲ نمونه مایع مغزی نخاعی و ۴۸ نمونه مایع ادراری به روش غیرتصادفی از بیماران مبتلا به ام اس تهیه و یک شب غنی سازی در PPLO broth، ۷ هفته کشت مداوم در PPLO broth و آگار، انجام گردید. از نمونه‌های مثبت، استخراج DNA صورت گرفت. برای شناسایی جنس باکتری از (Nested-PCR) و جدایه‌های دارای مقاومت به تتراسایکلین (rrs_3 و rrs_4) از ژن SrRNA۱۶ به روش (Duplex-PCR) استفاده گردید. همچنین تعیین توالی نوکلئوتیدی و رسم درخت فیلوژنتیک انجام شد.

یافته‌ها: در ۱۲ نمونه رشد مشاهده شد، اما بعد از Nested-PCR، تنها در ۵ نمونه (۱ نمونه مایع مغزی نخاعی و ۴ نمونه ادراری) مایکوپلاسما تشخیص داده شد. در Duplex-PCR، تنها نمونه‌های ادراری، آللهای مورد نظر را نشان دادند.

نتیجه‌گیری: با رسم درخت فیلوژنتیک مشخص شد آللها در نقاط متفاوتی جهش پیدا کرده‌اند، اما برای پاسخ قطعی به ایجاد مقاومت به تتراسایکلین، تحقیقات تکمیلی لازم است. بر اساس یافته‌ها، آللهای دارای پتانسیل مقاومت به تتراسایکلین جهش پیدا کرده‌اند.

کلید واژه‌ها: آللهای rrs_3 و rrs_4، بیماری مولتیپل اسکلروزیس، تتراسایکلین، مایکوپلاسما، مقاومت آنتی بیوتیکی.

نحوه استناد به این مقاله: نقیب م، محبی ر، خیرخواه ب. شناسایی مولکولی جهشهای ایجاد کننده مقاومت به تتراسایکلین در باکتریهای مایکوپلاسمای جدا شده از بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس (ام اس) استان کرمان. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تبریز. ۱۳۹۸؛ ۴۱(۱):۱۰۰-۱۰۷

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است.
این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تبریز تحت مجوز کریتیو کامنز (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد

مقدمه

مایکوپلاسماها کوچکترین باکتری‌هایی هستند که زندگی مستقل دارند و به دلیل حجم کم ژنوم، زندگی انگلی را پذیرفته‌اند. غشای پلاسمایی و پروتئین های سطحی ویژه مایکوپلاسما، مانند یک پوشش عمل کرده و از غشاء سلولی میزبان تقلید می‌کنند. باکتری باعث تحریک سیستم دفاعی میزبان می‌شود، این سیستم قادر نیست سلول خودی و باکتری را از هم تشخیص دهد و منجر به ایجاد التهاب در بافتهای مختلف می‌شود (۱،۲). مانند آنچه در بیماریهای روماتوئید، منتژیت، آنسفالیت، پلی رادیو کولیتیس، آتاکسی مغزی، التهاب نخاع، روان پریشی، صرع، سندرم گیلن باره و مولتیپل اسکلروزیس مشاهده می‌شود (۳،۴). مولتیپل اسکلروزیس (MS)، یک بیماری خود ایمنی یا التهابی مزمنی است که در آن دمیلینه شدن سیستم عصبی مرکزی رخ می‌دهد (۷–۵). بسته به سایز و موقعیت زخم‌ها (پلاکهای اسکلروتیک)، نتایج کلینیکی به صورت کاهش یا از دست دادن عملکرد نورولوژیکی بخش مربوطه است و در نتیجه ناتوانی‌هایی از جزئی تا پیشرفته را ایجاد می‌کند (۸): اختلالاتی در بینایی، شنوایی، تکلم، دفع ادرار و مدفوع، ناتوانی در حفظ کنترل بدن، فلج عضلات، افسردگی (۱۲–۹). همان طور که اشاره شد، مایکوپلاسما در ایجاد بیماری مولتیپل اسکلروزیس نقش دارد. و این باکتری در تمام جهان به وفور وجود داشته و بی توجهی به آن با توجه به این نکته که این باکتری توانایی لازم را با توجه به خصوصیات ساختمانی در بقای خود ندارد، موجب عدم توجه کافی به وجود مقاومت آنتی‌بیوتیکی در مایکوپلاسما شده است (۱۳). در حال حاضر مایکوپلاسما نسبت به آنتی بیوتیک‌های ماکرولید که به عنوان بهترین درمان، استفاده می‌شدند، مقاومت پیدا کرده و گزارشهای زیادی از شکست ماکرولیدها از ژاپن، چین، تایوان، کره، آمریکا و اروپا (اسکاتلند، اسپانیا، آلمان) با توجه به تفاوت‌های منطقه‌ای، به علت تداوم نشانه‌های بیماری شامل تب طولانی مدت و سرفه مداوم وجود دارد (۲،۱۴،۱۵). این مقاومت، غالباً به علت وقوع جهش هایی در ژن SrRNA ۲۳، که تعامل ماکرولید را با زیرواحد بزرگ ریبوزومی مهار کرده، رخ می‌دهد (۱۶،۱۷). از طرفی ریسک ابتلا به ام اس ۱۰۰۰۰۰ :۱۰ تا ۱۰۰۰۰۰ :۱۰۰ و تعداد بیماران بیشتر از ۲۵۰۰۰۰۰ نفر اعلام شده (۱۴). در ایران بیش از ۴۰۰۰۰ نفر مبتلا به ام اس وجود دارد (۱۸). اکنون آنتی بیوتیک های جایگزین ماکرولید، تتراسایکلین و کوئینولونها معرفی شده‌اند (۱۵). اتیولوژی دقیق ام اس هنوز شناخته شده نیست، اما یک اثر متقابل پیچیده بین استعداد ژنتیکی و فاکتورهای محیطی وجود دارد (۱۹). از آنجا که درمان عفونت در کنترل ام اس می‌تواند نقش داشته باشد، انجام تست‌های تشخیص عفونت و درمان آنتی بیوتیکی در کشورهای غربی مورد توجه قرار گرفته است (۹). از سال ۲۰۱۳ روند فزاینده ای از عفونت مایکوپلاسما دیده شد که می‌تواند، مربوط به احتمال وقوع یک اپیدمی مثلاً در مورد *مایکوپلاسما نومونیه*، اطلاعات کمی از مکانیسم‌های کشندگی و مقاومت باکتری در میزبان، عدم اطلاعات کافی در مورد مقاومت ژنی و استفاده از PCR برای شناسایی مایکوپلاسما که منجر به شناسایی موارد بیشتر از آن شده است، وجود دارد (۱۰،۲۰). بقاء باکتری در بدن و حضور مداوم آنتی‌ژن در آن، منجر به تحریکات خود ایمنی مانند ام اس می‌شود (۱۵). از آنجا که مایکوپلاسماها را نمی‌توان فقط براساس نشانه های کلینیکی تشخیص داد و عفونت نتیجه تعامل بین میزبان و مایکوپلاسما است، جایگزینی پی سی آر به جای تست‌های سرولوژیکی، سریع، حساس و یک انتخاب امید بخش است (۲۰). تحقیقات مداوم روی مکانیسم‌های مقاومت دارویی از جهت مهم بودن زمان در درمان برخی از بیماریها افزایش یافته، و موجب کشف داروهای ضدمیکروبی جدید و موثر برای درمان مایکوپلاسما به ویژه با تمرکز بر روی نسل جدید تتراسایکلین، شده است (۲۱). استفاده تنها از روش‌های سرولوژیک که اطلاعاتی از مقاومت ژنی فراهم نمی‌کند و عدم تحقیق روی مکانیسم‌های مقاومت دارویی و بی توجهی نسبت به عفونت‌ها در بیماران مبتلا به ام اس، از جمله نقاط ضعف بعضی از تحقیقات بوده است (۲،۹). از آنجا که شواهدی دال بر مقاومت مایکوپلاسما به تتراسایکلین بدست آمده (۲۲)، لذا در این تحقیق به جهت افزایش حساسیت و اختصاصیت در شناسایی مایکوپلاسما، در نمونه‌های مایع مغزی نخاعی و ادرار بیماران ام اس از تکنیک Nested-PCR و به جهت جستجوی آللهای دارای پتانسیل مقاومت به تتراسایکلین (*rrs*$_3$ و *rrs*$_4$) در ژن SrRNA۱۶ از تکنیک Duplex PCR استفاده و سپس تعیین توالی نوکلئوتیدی این آلل‌ها انجام گردید. با توجه به نبود سوابقی مبنی بر تحقیقات قبلی، هدف از این تحقیق تعیین هویت مولکولی جهش‌های ژنی ایجاد کننده مقاومت دارویی به تتراسایکلین در مایکوپلاسماهای موجود در مایع مغزی نخاعی و ادرار بیماران مبتلا به ام اس استان کرمان در تابستان ۱۳۹۴ بود.

روش کار

این پژوهش توصیفی – مقطعی و بر اساس مطالعات قبلی و سطح اطمینان ۹۵٪، بر روی ۸۰ نمونه، شامل ۳۲ نمونه مایع مغزی نخاعی و ۴۸ نمونه ادراری از بیماران مبتلا به ام اس استان کرمان (انجمن ام اس کرمان) که به صورت مبتنی بر هدف و غیرتصادفی تهیه شده بود، به آزمایشگاه میکروبیولوژی پاسارگاد منتقل و انجام شد. ابتدا نیم میلی لیتر از هر نمونه، به محیط PPLO براث استریل انتقال داده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C انکوباسیون گردید. محیط‌های PPLO براث توسط فیلتر مخصوص PVDF صاف شد، سپس ۲ میلی‌لیتر از محلول براث جدا و به محیط کشت دوم شامل PPLO براث با pH ۷/۶ منتقل و در شرایط CO_2 ۵ تا ۱۰ درصد، برای ۳ تا ۵ روز در گرمخانه نگهداری شد (۲۳).

از هر کدام از محیط ها دو پاساژ، به محیط PPLO مایع و محیط PPLO آگار گرفته شد. محیط PPLO آگار دار به مدت ۷ روز در انکوباتور CO2 دار و دمای ۳۷C° و محیط PPLO مایع هم به مدت ۲ تا ۳ روز گرمخانه گذاری شد و بعد از این مدت، ۲ پاساژ از آن یکی به محیط مایع و دیگری به محیط PPLO آگاردار، منتقل شد. پس از ظهور کلنی‌ها، جهت تایید جنس مایکوپلاسما، تست های مولکولی انجام شد (۲۴). استخراج DNA با استفاده از پروتکل کیت استخراج DNA شرکت کیاژن با نام ۱۰۰- kia spin PCR template (sample ۱۰۰) CAT.NO.K1014 purification kit ساخت کشور آلمان انجام شد. در این پژوهش جهت بالا بردن حساسیت و اختصاصیت کار از Nested-PCR استفاده گردید (۲۵). مخلوط واکنش در مرحله اول PCR که در جدول شماره ۲ نشان داده شده است تهیه و در دستگاه ترموسایکلر مدل BIO-RAD T100 ساخت آلمان قرار گرفت و برنامه PCR برای آن اعمال شد (جدول شماره ۲). برای کنترل مثبت از جنس استاندارد مایکوپلاسما تهیه شده از موسسه پژوهشی میکروبیولوژی پاسارگاد و برای کنترل منفی از آب مقطر استریل استفاده شد. سپس مخلوط واکنش در مرحله دوم، تهیه شد (جدول ۲). برای شناسایی اختصاصی جنس مایکوپلاسما از پرایمرهای GSO و MASO برای تکثیر ناحیه ۱۶۳ bp ژن *SrRNA*۱۶ استفاده شد (جدول ۱). برنامه PCR بدین شرح انجام شد: برای انجام Nested PCR با پرایمر اولیه، واسرشت اولیه ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، واسرشت ثانویه ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه (به تعداد ۳۵ سیکل)، بسط ۷۵ درجه سانتیگراد به مدت ۹۰ ثانیه، بسط نهایی ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۹۰ ثانیه، برای انجام Nested PCR با پرایمر دوم، واسرشت اولیه ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۶ دقیقه، واسرشت ثانویه ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال ۵۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه (به تعداد ۳۳ سیکل)، بسط ۷۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه و بسط نهایی ۷۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، انجام شد. برای اناج آزمون Douplex PCR برنامه زمانی شامل واسرشت اولیه ۹۸ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، واسرشت ثانویه ۹۸ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال ۶۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه (به تعداد ۳۵ سیکل)، بسط ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، بسط نهایی ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت. برای کنترل مثبت از استاندارد مایکوپلاسما و برای کنترل منفی از استاندارد *E.coli* و آب مقطر استریل استفاده شد. سپس یک Duplex PCR که نوعی Multiplex PCR بود، برای شناسایی آلل-های rrs_3 و rrs_4 در ژن *SrRNA*۱۶ انجام و مخلوط واکنش تهیه شد (جدول ۲). برای شناسایی آلل rrs_3 از پرایمرهای MB-282-F و MB-tet 3/4R برای تکثیر ناحیه ۱۸۵۷ bp و برای شناسایی الل rrs_4 از پرایمرهای MB-rrs-3F و MB-287-R برای تکثیر ناحیه ۵۲۹۴ bp استفاده شد (جدول ۱).

سپس نمایان‌سازی محصولات با رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید و الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۲ درصد انجام شد. بعد از اطمینان از تکثیر محصول پی سی آرو تشکیل باند، عمل خالص سازی DNA با استفاده از پروتکل کیت خالص‌سازی DNA شرکت Vivantis (Vivantis Nucleic Acid Extraction Kit) کشور مالزی انجام شد. محصولات بدست آمده با پرایمرهای *rrs3* و rrs_4 جهت تعیین توالی به شرکت پیشگام (نماینده Bioneer کشور کره جنوبی) ارسال و سپس با نرم افزارهای Bio Edit و MEFGA (۵/۰۴ version)، اطلاعات بدست آمده تحلیل شد.

جدول ۱: پرایمرهای استفاده شده در Nested PCR و Douplex PCR (۲۵).

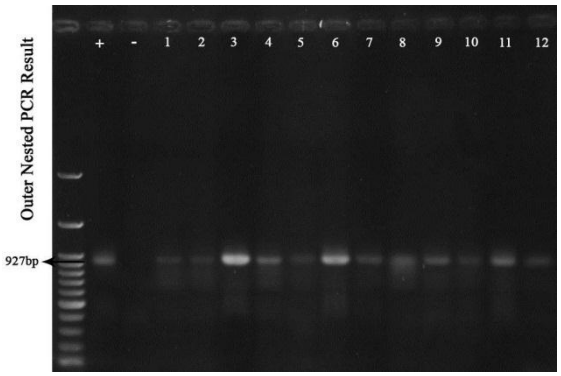
Nested PCR 1	AB	s rRNA۱۶	F= 5´GCAGTGAAGAACGAGGGG=3´
	ABO		R= 5´GTCCTCGCTTCGGTCCTCTCG=3´
Nested PCR2	GSO	s rRNA۱۶	F= 5´GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT=3´
	MGSO		R= 5´TGCACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC=3´
Doublex PCR	MB-282-F	*rrs3*	F= 5´GGATATCTAACGCCGTGTCT=3´
	MB-tet ¾-R		R= 5´CGTTCTCGTAGGGATACCT=3´
	MB-rrs-3F	rrs_4	F= 5 CGAGTTTGACCTCCTGGCTC=3
	MB-287-R		R= 5´CTAATTCCAAGTGCCACTAGCG=3´

جدول ۲: مخلوط واکنش‌های Nested PCR و Douplex PCR (۲۵)

ترکیبات حجم			
آب مقطر	۶/۷µl	۹/۷µl	۶/۷µl
بافر X۱۰	۲µl	۲µl	۲µl
۵۰ mM $MgCl_2$	۱µl	۱/۵µl	۱µl
dNTP mix (5Mm)	۱µl	۱/۵µl	۱µl
پرایمر رفت ۰/۵ µM	۲µl	۱µl	۲µl
پرایمر برگشت ۰/۵ µM	۲µl	۱µl	۲µl
***Taq* 2.5unit**	۰/۳µl	۰/۳µl	۰/۳µl
DNA	۵µl (محصول مرحله دوم)	۳µl (محصول **مرحله** اول)	۵µl (استخراج شده)

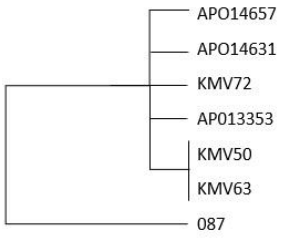
یافته‌ها

از ۸۰ نمونه موجود، ۱۲ نمونه، شامل یک نمونه مایع مغزی نخاعی و ۱۱ نمونه ادراری بیماران مبتلا به ام اس در محیط PPLO آگاردار رشد کردند. در دور اول واکنش Nested PCR، هر ۱۲ نمونه (۱ نمونه مایع مغزی نخاعی و ۱۱ نمونه ادراری) باند bp ۹۲۷ روی ژل آگارز نشان دادند. از جنس استاندارد *E.coli* با شماره دسترسی ۰۸۷ به عنوان کنترل منفی در تهیه درخت فیلوژنتیک استفاده شد. تنها جدایه‌های دارای آلل‌های rrs_3 و rrs_4 مربوط به باکتری مایکوپلاسما و ثبت شده در بانک ژن، به *مایکوپلاسما آرژنینی* (*Mycoplasma. Arginni*) با شماره دسترسی APO14657، *مایکوپلاسما کانادنس* (*Mycoplasma. canadense*) باشماره‌دسترسی APO14631،*مایکوپلاسماکالا ف.. نیکوم* (*Mycoplasma. californicum*) با شماره سی APO 13353 تعلق داشت که در سال ۲۰۱۵ در ژاپن از ش گاو مبتلا به التهاب پستان جدا شده بود و برای مقایسه مورد ا ده قرار گرفت. از بین آلل‌های rrs_3 و rrs_4 چهار نمونه ادراری بیماران مبتلا به ام اس، فقط سه نمونه با شماره های KMV72 و KMV63 و KMV50 قابلیت استفاده در تهیه درخت فیلوژنتیک ر شتند. جدایه های مورد نظر، از نظر آلل‌های جهش یافته قرابت فیلوژنتیک با جدایه های ثبت شده در بانک ژن را نداشته و بین جدایه‌های این پژوهش هم قرابت زیادی وجود نداشت. نتایج کلی بدست آمده در روشهای Nested-PCR و Duplex PCR، بدین صورت گزارش گردید، مایع مغزی و نخاعی از مجموع ۳۲ نمونه، یک نمونه واجد ژن بیرونی (پرایمر اول) و داخلی (پرایمر دوم) بوده و هیچ یک واجد آلل‌های rrs_3 و rrs_4 نبودند. از میان ۴۸ نمونه ادراری، ۱۱ نمونه واجد ژن بیرونی (پرایمر اول) و ۴ نمونه واجد ژن داخلی (پرایمر دوم) بوده، یک نمونه واجد آلل rrs_3 و ۲ نمونه واجد آلل rrs_4 و یک نمونه واجد هر دو آلل به طور همزمان تشخیص داده شد.



شکل ۱: ژل الکتروفوزر محصول با استفاده از آغازگر اختصاصی به ترتیب از چپ به راست، گوده اول نشانگر (مارکر): bp ۱۰۰، +: کنترل مثبت، –: کنترل منفی، گوده‌های شماره ۱ تا ۱۲ نمونه‌های جداسازی شده.

در مرحله اول واکنش Nested-PCR، تنها ۵ نمونه شامل ۱ نمونه مایع مغزی نخاعی و ۴ نمونه ادراری باند bp ۱۶۳ مشاهده شد. در واکنش PCR نهایی (Duplex PCR) تنها ۴ نمونه ادراری باند bp ۱۸۵۷ و bp ۵۲۹۴ را نشان دادند و نمونه مایع مغزی نخاعی هیچ باندی را نشان نداد. در مرحله دوم واکنش Nested-PCR، تنها ۵ نمونه شامل ۱ نمونه مایع مغزی نخاعی و ۴ نمونه ادراری باند bp ۱۶۳ مشاهده شد. در واکنش PCR نهایی (Duplex PCR) تنها ۴ نمونه ادراری باند bp ۱۸۵۷ و bp ۵۲۹۴ را نشان دادند و نمونه مایع مغزی نخاعی هیچ باندی را نشان نداد. نتیجه تحلیل بیوانفورماتیک توالی‌های نوکلئوتیدی نمونه‌های مورد بررسی به صورت الگوی زیر ترسیم گردید (نمودار ۱).



نمودار ۱: درخت فیلوژنتیک نمونه‌های مورد بررسی

بحث

در این پژوهش شناسایی آلل‌های rrs_3و rrs_4در مایکوپلاسمای انسانی برای اولین بار انجام شد و نشان داد که مایکوپلاسماهای جدا شده از ادرار افراد مبتلا به ام اس دارای آلل‌های rrs_3 و rrs_4 در ژن *SrRNA*۱۶ بوده که جهش یافته‌اند و در نتیجه پتانسیل مقاومت به آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین را دارند. اما این آلل‌ها در ژن *SrRNA*۱۶ باکتری مایکوپلاسمای جدا شده از مایع مغزی نخاعی بیماران مبتلا به ام اس وجود نداشت. یک تجزیه و تحلیل دقیق از بروز بیماری ام اس در جزیره فارو در طول و بعد از جنگ جهانی دوم انجام شد و به آسانترین شکل ارتباط بین بیماری ام اس با پاتوژنها را نشان دادند (۲۳). این پژوهش به ارتباط بین بیماری ام اس با باکتری مایکوپلاسما پرداخته و روی نمونه‌های مایع مغزی نخاعی و ادراری این بیماران انجام شد. در تحقیقی که توسط Booth در سال ۲۰۱۳ انجام شد، به ارتباط بین مایکوپلاسما و بیماری ام اس اشاره گردیده است (۲۵). همچنین در پژوهشی که توسط Stephen و همکاران در سال ۲۰۰۵ انجام شد، ارتباط بین *مایکوپلاسما نومونیه* با دمیلیناسیون شدید تشخیص داده شد (۲۶). Pakpoor در سال ۲۰۱۳ انجام و ارتباط بین *مایکوپلاسما نومونیه* و بیماری خود ایمنی ام اس را عنوان کردند (۲۷). در پژوهشی که توسط Bahar و همکاران در سال ۲۰۱۲ انجام و بررسی سرولوژیکی حضور مایکوپلاسما در مایع مغزی نخاعی بیماران مبتلا به ام اس بررسی شد، نقش احتمالی تأثیر *مایکوپلاسما*

نومونیه در ایجاد ام اس در زنان بیان شد (۲۲). اما در پژوهشی که توسط Darken و همکاران در سال ۱۹۶۰ انجام شد، *مایکوپلاسما نومونیه* در خون، ادرار و مایع مغزی نخاعی بیماران ام اس با استفاده از تکنیک PCR مشاهده نشد ولی به این نکته اشاره گردید که به دلیل تمایل مایکوپلاسما به ایجاد بیماریهای نورولوژیک خود ایمنی، باید در ارگان‌ها و مکان‌های عصبی دورتر از مغز به جستجوی این باکتری پرداخت (۹). می‌توان در یک پیشگویی گفت که شفایی برای بیماری ام اس وجود ندارد، اما با بهبود و افزایش کیفیت داروهای کاهش دهنده شدت بیماری، بطور امیدوارانه‌ای، ام اس به یک بیماری با پیامد خیلی بهتر، نسبت به گذشته تبدیل شده است، اما بطور کلی، شاید تعبیر این بیماری، به عنوان یک مسیر اجتناب ناپذیر به سمت افزایش ناتوانی در بخش های مختلف بدن، زیاد اغراق آمیز نباشد (۲۸). بنابراین از تعامل بین عامل پاتوژن و بیماری ام اس به جهت درمان آن باید حداکثر استفاده را کرد (۲۹). در پژوهشی که توسط Hames و همکاران در سال ۲۰۰۹ انجام شد، عده ای بیمار مبتلا به ایدز و ام اس همزمان بررسی شدند، درمانها علیه ویروس HIV، نه تنها شدت بیماری ام اس را کاهش داد، بلکه از بازگشت مجدد آن نیز جلوگیری کرد (۳۰). داروهای ضد میکروبی و واکسیناسیون در برابر پاتوژنها می‌تواند از پیشرفت ام اس و در واقع پیشرفت ناتوانی بدن جلوگیری کند، شناسایی عفونت‌ها در بیماران مبتلا به ام اس و توجه به درمان صحیح و سریع آن ها دارای ضرورت است. یک تکنیک سریع و قابل اعتماد جهت تأئید محصول PCR و شناسایی پاتوژن، واکنش Nested-PCR است، که حساسیت شناسایی محصول را چند برابر افزایش می‌دهد. در این پژوهش برای شناسایی جنس مایکوپلاسما از این تکنیک استفاده شد، البته به دلیل کمبود باکتری تعیین گونه صورت نگرفت. در این پژوهش، حضور آلل‌های rrs_3 و rrs_4 در ژن *SrRNA*۱۶ به جهت بررسی پتانسیل مقاومت به آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین بررسی شد. تتراسایکلین با اتصال به زیر واحد S ۳۰ ریبوزومی از گسترش زنجیره پلی‌پپتیدی در حال ساخت و رهاسازی آن جلوگیری می کند، اما با افزایش فزاینده استفاده از این آنتی‌بیوتیک، مقاومت نسبت به آن هم رو به گسترش گذاشت. آلل‌های rrs_3 و rrs_4 در ژن *SrRNA*۱۶ ریبوزومی از جمله نقاط چسبندگی ابتدایی تتراسایکلین به ریبوزوم می‌باشند که جهش در آنها می‌تواند به عدم اتصال تتراسایکلین و ایجاد مقاومت کمک کند (۲۲). در پژوهشی که در سال ۲۰۱۴ انجام شد، وجود جهش در آلل‌های rrs_3 و rrs_4 در ژن *SrRNA*۱۶ در *مایکوپلاسما بوویس* و مقاومت به تتراسایکلین بررسی و اثبات شد (۲۲). آنچه مهم می نماید، ایجاد آگاهی فزاینده در میان پزشکان، درباره گونه‌های مایکوپلاسمای مختلف مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها است تا استفاده از آنتی‌بیوتیک های غیرضروری و غیرمناسب کاهش و به دنبال آن دوره و شدت بیماری و انتشار عفونت در جامعه کاهش یابد.

کشف به هنگام این نوع حقایق و درمان مناسب آنها پیشگیری از شیوع آنها را در بر دارد. در این پژوهش با روش Duplex PCR این آلل‌های شناسایی شدند. با استفاده از این تکنیک می‌توان چند جایگاه ژنی را مورد بررسی قرار داد و از چندین پرایمر اختصاصی جهت تکثیر DNA استفاده کرد. با این روش می‌توان بخش‌های بزرگی از DNA را به جهت پیدا کردن تغییرات بررسی کرد و حتی می‌توان بخش‌های غیر مرتبط را در ژنوم جستجو کرد (۲۲). در تحلیل نتایج حاصل از رسم درخت فیلوژنتیکی باید گفت که از جمله محدودیت‌های موجود، حضور تنها سه جدایه ثبت شده بانک ژن بود، جدایه‌های ثبت شده و جدایه‌های پژوهش از نظر نقاط جهش یافته، شباهت فیلوژنتیکی نداشتند. به علت وقوع جهش در آلل‌های rrs_3 و rrs_4 جدایه‌های مایکوپلاسمای انسانی جدا شده از ادرار بیماران مبتلا به ام اس احتمالاً نسبت به تتراسایکلین مقاوم شده باشند که البته پژوهش‌های تکمیلی دیگری برای پاسخ قطعی در این زمینه لازم است.

نتیجه‌گیری

باکتری مایکوپلاسما در ادرار و مایع مغزی نخاعی افراد مبتلا به ام اس، می تواند وجود داشته باشد و با شروع بیماری یا شدت یافتن آن در ارتباط باشد. تکنیک Nested-PCR جهت افزایش حساسیت و اختصاصیت در شناسایی باکتری و تکنیک Duplex PCR در شناسایی دو آلل مجزا از هم مفید واقع شدند. حضور آلل‌های rrs_3 و rrs_4 در ژن *SrRNA*۱۶ مایکوپلاسمای ادراری و عدم حضور آنها در مایکوپلاسمای مغزی نخاعی بیمار ام اس، شاید حاکی از این باشد که باکتری موجود در ادرار به علت حضور در شرایط سخت مقاوم شده و از طرفی امکان دارد به عدم توانایی عبور تتراسایکلین از سد خونی مغزی اشاره داشته باشد. آلل‌های rrs_3 و rrs_4 در مایکوپلاسمای ادراری جهش پیدا کرده‌اند.

قدردانی

این مقاله حاصل یک پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمان مصوب سال ۱۳۹۳، با کد ۶۴۵ تحت عنوان شناسایی هویت مولکولی جهش‌های ایجاد کننده مقاومت به تتراسایکلین در باکتریهای مایکوپلاسمای جداشده از بیماران مبتلا به ام اس در استان کرمان می‌باشد که در تابستان ۱۳۹۴ در پژوهش دانشگاه به تصویب رسید، انجام شد.

منافع متقابل

مؤلف اظهار می‌دارد که منافع متقابلی از تالیف یا انتشار این مقاله ندارد.

مشارکت مؤلفان

م، ن. ر، م و استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرمان، طراحی، اجرا و تحلیل نتایج مطالعه را بر عهده داشت. همچنین مقاله را تالیف نموده و نسخه نهایی آن را خوانده و تایید کرده است.

ملاحظات اخلاقی

این مقاله ملاحظات اخلاقی را شامل نمی‌شود.

منابع مالی

این مقاله منابع مالی ندارد.

References

1. Ammar A, Gad G, Hasan A, Lamia A. Virulence Factors in Mycoplasma of Human Origin. *Egypt J Med Microbial* 2014; **23**(3): 29-36. doi: 10.12816/0024349
2. Kakalacheva K, Münz C, Lünemann J D. Viral triggers of multiple sclerosis. Biochimica et Biophysica Acta (BBA). *Molecular Basis Dis* 2011; **1812**(2): 132-140. doi: 10.1016/j.bbadis. 2010.06.012
3. Chakraborty S, Kumar A, Tiwari R, Rahal A, Malik Y, Dhama K, et al. Advances in diagnosis of respiratory diseases of small ruminants. *Vet Med Int* 2014; **15**: 2014. doi: 10.1155/2014/ 508304
4. Thomas F J, Wiles C M. Dysphagia and nutritional status in multiple sclerosis. *J Neurol* 1999; **246**(8): 677-682. doi: 10.1007/s0041500 50431
5. Kriesel J D, Hobbs M R, Jones B B, Milash B, Nagra RM, Fischer K F. Deep sequencing for the detection of virus-like sequences in the brains of patients with multiple sclerosis: detection of GBV-C in human brain. *PLoS One* 2012; **7**(3): 31886. doi: 10.1371/journal.pone.0031886
6. Westall F C. Molecular mimicry revisited: gut bacteria and multiple sclerosis. *J Clin Microbiol* 2006; **44**(6): 2099-2104. doi: 10.1128/JCM. 02532-05
7. Fitzgerald S. Levels of Risk Identified for MS Patients Taking Natalizumab. *Neurology Today* 2012; **12**(13): 18-19. doi: 10.1097/01.NT. 0000416334.61692.94
8. Ashtaria F, Mohammadali B. Serum uric acid level in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Clin Neuroscience* 2013; **20**(5): 676-678. doi: 10.1016/j.jocn.2012.05.054
9. Darken M A, Berenson H, Shirk R J, Sjolander N O. Production of tetracycline by Streptomyces aureofaciens in synthetic media. *Appl Microbiol* 1960; **8**(1): 46-51.
10. Morozumi M, Ito A, Murayama S Y, Hasegawa K, Kobayashi R, Iwata S, et al. Assessment of real-time PCR for diagnosis of Mycoplasma pneumoniae pneumonia in pediatric patients. *Canadian J Microbiol* 2006; **52**(2): 125-129. doi: 10.1139/w05-118
11. Narita M. Classification of Extra pulmonary Manifestations Due to Mycoplasma pneumoniae Infection on the Basis of Possible Pathogenesis. *Frontiers Microbiol* 2016; **23**. doi: 10.3389/ fmicb.2016.00023
12. Tsai V, Pritzker B B, Diaz M H, Winchell J M, Hicks L A, Petrone B, et al. Cluster of macrolide-resistant Mycoplasma pneumoniae infections in Illinois in 2012. *J Clin Microbiol* 2013; **51**(11): 3889-3892. doi: 10.1128/JCM.01613-13
13. Amram E, Mikula I, Schnee C, Ayling R D, Nicholas R A, Rosales RS, et al. 16S rRNA gene mutations associated with decreased susceptibility to tetracycline in Mycoplasma bovis. *Antimicrobial Agents chem* 2015; **59**(2): 796-802. doi: 10.1128/AAC.03876-14
14. Yamada M, Buller R, Bledsoe S, Storch G A. Rising rates of macrolide-resistant Mycoplasma pneumoniae in the central United States. *Pediatric Infect Dis J* 2012; **31**(4): 409-411. doi: 10.1097/INF.0b013e318247f3e0
15. Wekerle H. Remote Control: The Early Extra cerebral Phase of MS Plaque Development. *Rev Neurol* 2012; **168**. doi: 10.1016/S0035-3787(12)70024-3
16. Ellis J A, Kemp A S, Ponsonby A L. Gene–environment interaction in autoimmune disease. *Expert Rev Molecule Med* 2014; **16**: 4. doi: 10.1017/erm.2014.5
17. Schmidl S R, Otto A, Lluch-Senar M, Piñol J, Busse J, Becher D, et al. A trigger enzyme in Mycoplasma pneumoniae: impact of the glycerophosphodiesterase GlpQ on virulence and gene expression. *PLoS Pathog* 2011; **7**(9): 1002263. doi: 10.1371/journal.ppat.1002263
18. Zhao F, Liu G, Wu J, Cao B, Tao X, He L, et al. Surveillance of macrolide-resistant Mycoplasma pneumoniae in Beijing, China, from 2008 to 2012. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; **57**(3): 1521-1523. doi: 10.1128/AAC.02060-12
19. Buzzard K A, Broadley S A. Whatdo effective treatments for multiple sclerosis tells us about the molecular mechanisms involved in pathogenesis. *Int J Mol Sci* 2012; **13**(12): 665-709. doi: 10.3390/ijms131012665
20. Gandhi K S, McKay F C. The multiple sclerosis whole blood mRNA transcriptome and genetic associations indicate dysregulation of specific T cell pathways in

pathogenesis. *Hum Mol Genet* 2010; **19**: 2134-2143. doi: 10.1093/hmg/ddq090
21. Arbuckle M R, McClain M T, Rubertone M V, Scofield R H, Dennis G J, James J A, et al. Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *New England J Med* 2003; **349**(16): 1526-33. doi: 10.1056/NEJMoa021933
22. Bahar M, Ashtari F, Aghaei M, Akbari M, Salari M, Ghalamkari S. Mycoplasma pneumonia seroposivity in Iranian patients with relapsing-remitting multipl sclerosis: a randomized case–control study. *J Pak Med Assoc* 2012; **62**(3): 6-8.
23. Damal K, Stoker E, Foley J F. Optimizing therapeutics in the management of patients with multiple sclerosis: a review of drug efficacy, dosing, and mechanisms of action. *Biologics* 2013; **7**: 247-258. doi: 10.2147/BTT.S53007
24. Tran H, Allworth A, Bennett C. A case of Mycoplasma pneumoniae-associated encephalomyelitis in a 16-year-old female presenting to an adult teaching hospital. *Clin Med insights* 2013; **6**: 209. doi: 10.4137/CCRep. S13309
25. Booth D. Do pathogens contribute to multiple sclerosis etiology? *Microbial Australia* 2013; **34**(3): 144-146.
26. Stephens D S, Zughaier S M, Whitney C G, Baughman W S, Barker L, Gay K, et al. Incidence of macrolide resistance in Streptococcus pneumoniae after introduction of the pneumococcal conjugate vaccine: population-based assessment. *The Lancet* 2005; **365**(9462): 855-863. doi: 10.1016/S0140-6736 (05)71043-6
27. Pakpoor J, Giovannoni G, Ramagopalan S V. Epstein–Barr virus and multiple sclerosis: association or causation. *Expert Rev Neuro* 2013; **13**(3): 287-297. doi: 10.1586/ern.13.6
28. Kawai Y, Miyashita N, Kubo M, Akaike H, Kato A, Nishizawa Y, et al. Nationwide surveillance of macrolide-resistant Mycoplasma pneumoniae infection in pediatric patients. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 2013; **57**(8): 4046-4049. doi: 10.1128/AAC.00663-13
29. Libbey J E, Cusick M F, Fujinami R S. Role of pathogens in multiple sclerosis. *Int Rev Immunol* 2014; **33**(4): 266-283. doi: 10.3109/08830185. 2013.823422
30. Hames C, Halbedel S, Hoppert M, Frey J, Stülke J. Glycerol metabolism is important for cytotoxicity of Mycoplasma pneumoniae. *J Bacterial* 2009; **191**(3): 747-75.