دوماهنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست-پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال هجدهم، شماره ۲، صفحه ۳۰۳ - ۲۹۶ (خرداد و تیر ۱۳۹۴)

ISMJ 2015; 18(2): 296-303

بررسی مقایسه‌ای روش‌های مولکولی PCR-RFLP، آلل اسپسیفیک PCR و سکوئنس جهت تشخیص سریع مقاومت به ایزونیازید در سویه‌های کلینیکی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس

حمید برناسی [۱]، محمد ارجمندزادگان [۱و۲*]، احمدرضا بهرمند [۳]، علیرضا هادی‌زاده تثبیتی [۳]، اعظم احمدی [۲]، مریم طیبون [۲]

[۱] گروه میکروب‌شناسی و ایمنی‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک
[۲] مرکز تحقیقات سل و عفونی کودکان، دانشگاه علوم پزشکی اراک
[۳] بخش سل و تحقیقات ریوی، انستیتو پاستور ایران، تهران

(دریافت مقاله: ۹۲/۹/۱۴- پذیرش مقاله: ۹۲/۱۱/۱۲)

چکیده

زمینه: ایزونیازید یکی از داروهای خط اول درمان سل می‌باشد که مقاومت به آن به‌صورت فزاینده‌ای گزارش می‌شود. در مطالعه حاضر دو روش مولکولی جهت تشخیص سریع مقاومت سویه‌های کلینیکی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به ایزونیازید طراحی و با نتایج سکوئنس مورد مقایسه قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه ۶۰ سویه کلینیکی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، که با روش تعیین حساسیت دارویی (DST) مقاومت به ایزونیازید در آن‌ها اثبات شده، استفاده گردید. سه روش مولکولی Sequencing، PCR-RFLP و Allele Specific-PCR جهت تعیین موتاسیون در کدون ۳۱۵ مرتبط با مقاومت به ژن katG مقایسه شدند. بدین منظور با کمک پرایمرهای اختصاصی که قادر به تشخیص موتاسیون در این کدون بودند، روش آلل اسپسفیک اجرا گردید. علاوه بر این، در روش PCR-RFLP از آنزیم HpaII جهت برش آنزیمی محصول PCR استفاده شد، عدم برش توسط آنزیم به‌عنوان رخداد موتاسیون در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: بدین‌منظور سویه‌های حساس، مقاوم به دارو و سویه استاندارد H37Rv مورد استفاده قرار گرفتند. از سویه‌های مورد مطالعه، تعداد ۲۷ سویه مقاوم و ۳۳ سویه حساس به ایزونیازید بودند. نتایج سکوئنس به‌عنوان استاندارد طلایی مشخص نمود که AS-PCR و PCR-RFLP به‌خوبی قادر به تشخیص موتاسیون در کدون ۳۱۵ در سویه‌های مقاوم فنوتیپی با حساسیت و ویژگی به‌ترتیب ۸۱/۴۸ درصد و ۱۰۰ درصد بودند.

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که روش‌های PCR-RFLP و AS-PCR طراحی شده می‌توانند به‌عنوان روش‌های ساده و سریع برای تعیین حساسیت و مقاومت به ایزونیازید در سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مورد استفاده قرارگیرند. پیشنهاد می‌شود جهت کاهش ریسک خطا، با توجه به ساده و کم هزینه بودن به‌صورت همزمان از هر دو تست برای تشخیص مقاومت به ایزونیازید استفاده شود.

واژگان کلیدی: ایزونیازید، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، PCR-RFLP، Allele Specific-PCR

*اراک، مرکز تحقیقات سل و عفونی کودکان و گروه میکروب‌شناسی و ایمنی‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
E-mail: arjomandzadegan@arakmu.ac.ir

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-10]

مقدمه

علیرغم پیشرفت‌های فراوان در تشخیص، واکسیناسیون و درمان سل، امروزه این بیماری جزء بزرگ‌ترین مسائل بهداشتی جهان و به‌عنوان یکی از عمده‌ترین عوامل مرگ ومیر ناشی از بیماری‌های عفونی، در دنیا مطرح است (۱).

مایکوباکتریوم توبرکلوزیس دومین عامل مرگ و میر در بین عوامل عفونی پس از ویروس نقص سیستم ایمنی HIV می‌باشد (۲). طبق آخرین گزارش سازمان بهداشت جهانی فقط در سال ۲۰۱۱ حدود ۸/۷ میلیون نفر به بیماری سل مبتلا شده و ۱/۴ میلیون نفر معادل ۳۸۰۰ نفر در هر روز جان خود را از دست داده‌اند (۳).

سل مقاوم به چند دارو به‌عنوان یک مشکل بزرگ در کنترل بیماری سل در کشورهای مختلف محسوب می‌شود. مایکو باکتریوم توبرکلوزیس دارای مقاومت به ایزونیازید و ریفامپین، درمان سل را پیچیده و مشکل می‌کند. که نیاز به استفاده از داروهای خط دوم دارد، این داروها دارای تأثیر کم، پرهزینه و سمی‌تر هستند. و همچنین دوره درمان به ۲۴–۱۸ ماه افزایش می‌یابد (۴ و ۵).

ایزونیازید و ریفامپین از مهم‌ترین داروهای خط اول درمان سل محسوب می‌شوند. مکانیسم مقاومت به ایزونیازید در واقع ایجاد موتاسیون در ژن‌های متعددی است. از جمله مهم‌ترین این ژن‌ها، ژن katG به‌ویژه کدون ۳۱۵ است (۴). و در موارد محدودتر موتاسیون در پروموتور inhA–۱۵ و سپس موتاسیون در ژن kasA و ژن ahpC می‌باشد (۹–۵). جهش کدون ۳۱۵ از ژن KatG باعث کاهش در فعال کردن ایزونیازید شده و در نتیجه مقاومت به ایزونیازید ایجاد می‌گردد. در میان جهش‌های مختلف، جهش KatG۳۱۵ از شایع‌ترین است. به‌طوری که عامل ۹۵–۵۰ درصد از مقاومت به ایزونیازید می‌باشد (۱۱–۶).

مسئله مهم در سل مقاوم به چند دارو تشخیص آن با استفاده از روش‌های مولکولی مطمئن، به‌عنوان جایگزینی برای روش‌های قدیمی کشت جهت تشخیص سریع بیماری سل و مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن می‌باشد. زیرا عدم تشخیص به موقع باعث می‌شود تا بیمار دارای سل مقاوم به دارو افراد دیگر را آلوده نماید (۷).

لذا در این مطالعه با مقایسه روش‌های مولکولی مختلف مانند Allele Specific-PCR(AS-PCR)، Sequencing و PCR-RFLP دستیابی به روشی سریع، ارزان و مطمئن جهت تعیین مقاومت در این باکتری مورد ارزیابی قرار گرفت (۸).

مواد و روش‌ها

در این مطالعه از ژنوم ۶۰ سویه موجود در بانک ژنوم مرکز تحقیقات سل و عفونی کودکان اراک که به روش‌های کشت و بیوشیمیایی، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بودن و مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها در انیستیتو پاستور ایران اثبات شده بود، استفاده شد. بدین منظور ژنوم سویه‌های حساس، مقاوم به دارو و سویه استاندارد H37Rv مورد استفاده قرار گرفتند. از سویه‌های مورد مطالعه، تعداد ۳۳ سویه حساس و ۲۷ سویه مقاوم به ایزونیازید بودند.

استخراج DNA

استخراج DNA ژنومی از سویه‌ها به روش Chelex۱۰۰ انجام شد. به‌طور خلاصه، ۴ تا ۵ کلنی تازه از باکتری رشد کرده بر سطح محیط کشت لونشتاین جانسون جمع‌آوری، در میکروتیوپ‌های

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-10]

حاوی ۲۷۰ میکرولیتر بافر TAE1X (Tris-Acetic acid- EDTA) و ۰/۰۷ گرم Chelex۱۰۰sodium مخلوط گردید، سپس در بن ماری با دمای ۹۵°C به‌مدت ۴۵ دقیقه قرار داده شد، در سانتریفوژ با ۱۲۰۰۰ دور در دمای ۴°C به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ گردید، مایع رویی را در میکروتیوپ استریل ریخته دوباره در ۱۲۰۰۰ دور به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ می‌کنیم (این عمل را دو بار تکرار می‌کنیم). سپس مایع رویی حاوی DNA برای انجام PCR مورد استفاده قرار گرفت (۹).

انجام PCR جهت تعیین توالی

برای اثبات جهش نقطه‌ای در کدون KatG۳۱۵، از روش تعیین توالی به‌عنوان استاندارد طلایی برای روش‌های ملکولی استفاده شد. بدین‌منظور با استفاده از پرایمرهای اختصاصی katGR و katGF، در واکنش PCR استفاده شد (جدول ۱).

جدول ۱) توالی پرایمر مورد استفاده جهت تعیین توالی ژن katG (۱۰)

پرایمر	توالی پرایمر	سایز
katGF	AGCTCGTATGGCACCGGAAC	۲۶۰bp
katGR	TTGACCTCCCACCCGACTTG	

واکنش آمپلیفیکاسیون در حجم نهائی ۲۵ میکرولیتر شامل ۴ میکرولیتر DNA تخلیص شده، ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰Xحاوی MgCl2، ۰/۷ میکرولیتر dNTPs، ۰/۷ واحد آنزیم taq و ۲ میکرولیتر از هر دو نوع پرایمر می‌باشد. بعد از اطمینان از وجود قطعه ۶۲۰bp محصول PCR برای انجام تعیین توالی به شرکت Source Bioscience انگلستان فرستاده شد.

PCR-RFLP

به‌منظور بررسی وجود موتاسیون در کدون ۳۱۵ katG، محصول PCR واکنش تعیین توالی قطعه ۶۲۰bp تحت تأثیر آنزیم اندوکلئاز HpaII شرکت فرمنتاز قرار گرفت (سایت برش این آنزیم C:CGG و دقیقاً در محل کدون ۳۱۵ می‌باشد که با کمک نرم‌افزار Genetix مشخص گردید) جهت انجام RFLP آنزیم مذکور در دمای ۳۷°C به‌مدت ۳ ساعت روی قطعه ۶۲۰ bp تأثیر داده شد. توقف آنزیمی در دمای ۶۴° C به‌مدت ۲۰ دقیقه انجام گردید.

Allele Specific-PCR

برای تشخیص وجود موتاسیون در کدون katG۱۵ به‌روش AS-PCR، DNA استخراج شده به همراه پرایمرهای اختصاصی KatOF و Kat 5R (طراحی شده برای کدون katG۳۱۵ نمونه حساس (قطعه ۲۹۰bp) و پرایمرهای اختصاصی katGR و katGF جهت اطمینان از وجود ژن katG و انجام واکنش PCR (قطعه ۶۲۰bp)، در واکنش PCR استفاده شد (جدول ۲).

جدول ۲) توالی پرایمر مورد استفاده در واکنش AS-PCR (۱۱)

پرایمر	توالی پرایمر	سایز
KatOF	GCAGAGGGGCTGATCTACG	۲۹۰ bp
Kat5R	ATACGACCTGATGCCGC	
katGF	AGCTCGTATGGCACCGGAA C	۶۲۰bp
katGR	TTGACCTCCCACCCGACTTG	

واکنش آمپلیفیکاسیون در حجم نهائی ۲۵ میکرولیتر شامل ۴ میکرولیتر DNA تخلیص شده، ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰X حاوی Mg، ۰/۷ میکرولیتر dNTPs، ۰/۷ واحد آنزیم taq و ۴ میکرولیتر از هر چهار نوع پرایمر Forward و Reverse می‌باشد.

پس از انجام واکنش، محصول PCR در ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز گردید، وجود یا عدم وجود باند ۲۹۰bp تعیین کننده رخداد موتاسیون و یا عدم آن می‌باشد. در نمونه حساس به ایزونیازید باید دو باند

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-10]

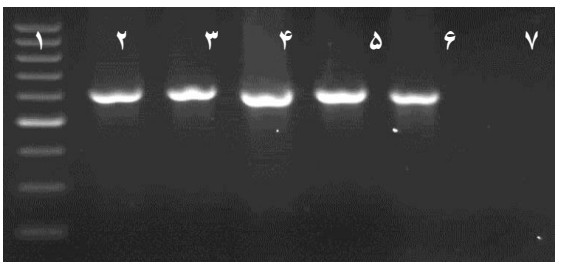
۲۹۰bp و ۶۲۰bp و در نمونه مقاوم به ایزونیازید فقط یک باند ۶۲۰bp مربوط به ژن KatG مشاهده شود.

یافته‌ها

بررسی ژنوم ۶۰ سویه از نمونه‌های بالینی، با روش‌های مولکولی تعیین توالی، PCR-RFLP و AS-PCR انجام گردید، تمامی نمونه‌ها، باند ۶۲۰bp که اثبات کننده مایکوباکتریوم توبرکلوزیس است را تشکیل دادند (شکل ۱).

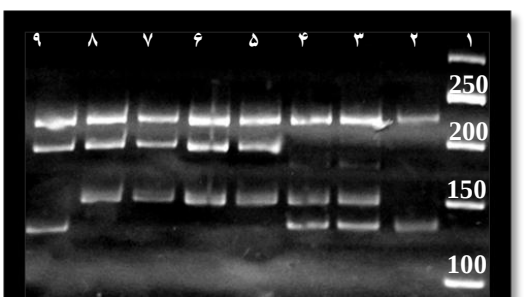
از ۶۰ سویه که به‌روش استاندارد کشت ۳۳ سویه حساس و ۲۷ سویه مقاوم به ایزونیازید گزارش شده بود. نتایج آزمایش تعیین توالی نشان داد، که در ۳۳ نمونه حساس هیچ موتاسیونی در کدون KatG۶۱۵ وجود ندارد. در حالی که در نمونه‌های مقاوم به ایزونیازید موتاسیون در ۲۲ نمونه از ۲۷ نمونه مشاهده شد.

شایع‌ترین این موتاسیون‌ها در کدون KatG۳۱۵، در ۱۹ نمونه (۸۹/۴۷ درصد). به‌علت تغییر کدون AGC→ACC و در ۱ نمونه تغییر کدون AGC→ACA و تبدیل اسید آمینه S→T، و در ۲ نمونه موتاسیون مربوط به تغییر کدون AGC→ACC و تبدیل اسید آمینه S→G می‌باشد.

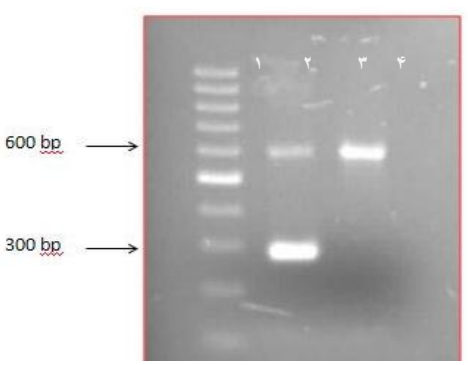


شکل ۱): ژل الکتروفورز قطعه ۶۲۰ bp حاصل از ژن katG. از سمت چپ ستون (۱): مارکر (۱۰۰ bp)، ستون های (۲ تا ۵): وجود باند ۶۲۰bp، اثبات مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بودن نمونه‌ها، (۶) سویه استاندارد H37Rv به‌عنوان کنترل مثبت ارائه‌کننده باند ۶۲۰bp و ستون (۷): کنترل منفی (فاقد DNA)

روش‌های PCR-RFLP و AS-PCR جهت شناسایی موتاسیون در کدون KatG۳۱۵ طراحی گردید، بررسی موتاسیون در کدون KatG۳۱۵ به دو روش AS-PCR (شکل ۲) و PCR-RFLP (شکل ۳) در ۶۰ نمونه که توالی نوکلئوتیدی در آن‌ها مشخص شده بود، انجام گردید. نتایج در مقایسه با روش تعیین توالی کاملاً مشابه هم بود. به‌طوری که در ۳۳ نمونه حساس و ۲۲ نمونه مقاوم به ایزونیازید در روش‌های PCR-RFLP و AS-PCR نیز به‌ترتیب ۳۳ نمونه حساس و فاقد موتاسیون و ۲۲ نمونه مقاوم به ایزونیازید و دارای موتاسیون در کدون KatG۳۱۵ تشخیص داده شد. نتایج نشان داد که دو روش AS-PCRو PCR-RFLP با دقت بالائی قادر به تشخیص موتاسیون در کدون KatG۳۱۵ می‌باشند.



شکل۲) الگوهای (A، B، C، D)PCR-RFLP در نمونه‌های حساس و مقاوم به ایزونیازید. از سمت راست ستون (۱): مارکر (۵۰ bp)، ستون (۲): نمونه مقاوم به ایزونیازید با الگوی C، ستون (۳ و۴): نمونه‌های حساس به ایزونیازید با الگوی A، ستون (۵ تا ۸): نمونه‌های حساس به ایزونیازید با الگوی B، ستون (۹): نمونه مقاوم به ایزونیازید با الگوی D



شکل ۳) ژل الکتروفورز حاصل از واکنش AS-PCR کدون ۳۱۵ KatG. از سمت چپ ستون (۱): مارکر ۱۰۰bp، ستون (۲): شامل باند مادر ۶۲۰ bp و باند ۲۹۰ bp مربوط به یک نمونه حساس به ایزونیازید، ستون (۳): فقط شامل باند مادر ۶۲۰ bp مربوط به نمونه مقاوم به ایزونیازید، ستون (۴): کنترل منفی (فاقد DNA)

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-10]

بحث

طبق گزارشات سازمان بهداشت جهانی سل مقاوم به چند دارو در جهان در حال افزایش است، این یک مشکل بزرگ بهداشتی محسوب می‌گردد. نیاز به استفاده از روش‌های سریع، ارزان و با دقت بالا در کشورهای در حال توسعه امری ضروری و اجتناب‌ناپذیر است (۱۵-۱۲).

در این مطالعه سعی شد انواع روش‌های مولکولی مبتنی بر PCR به‌کار گرفته شود و با مقایسه آن‌ها حساسیت و ویژگی به‌دست آید.

روش مولکولی سکوئنسینگ در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت، این روش با دقت بالا توانست موتاسیون‌های عامل مقاومت به ایزونیازید را در مقایسه با روش استاندارد طلائی کشت با دقت بالا شناسایی کند، ولی متأسفانه روش سکوئنسینگ به‌علت زمان بر بودن و بالا رفتن هزینه تمام شده آزمایش جهت استفاده روتین به‌عنوان یک روش تشخیصی رضایت‌بخش نیست. لذا سعی شد تا از روش‌های دیگری مانند AS-PCR و RFLPPCR- استفاده شود و نتایج این دو روش با روش کشت و نتایج سکوئنسینگ مقایسه گردد.

در روش‌های PCR-RFLP و AS-PCR همان‌طور که در نتایج جدول مشاهده می‌شود، این دو روش در مقایسه با روش سکوئنسینگ، دارای حساسیت ۸۱/۴۸ درصد و ویژگی ۱۰۰ درصد می‌باشد.

در مطالعه صورت پذیرفته توسط گودرزی و همکاران در سال ۹۱-۹۰ در شهر اهواز، روش AS-PCR در مقایسه با روش سکوئنسینگ با حساسیت بسیار بالا قادر به تشخیص مقاومت به ایزونیازید می‌باشد (۱۶).

در مطالعه‌ای دیگر که توسط بینگ شاو (Bing-shao) و همکاران در سال ۲۰۱۲ در کشور پاناما انجام گرفت، مقایسه حساسیت و ویژگی دو روش مولکولی AS-PCR و سکوئنسینگ با روش استاندارد کشت در تشخیص مقاومت به ایزونیازید به‌ترتیب در حدود ۸۳/۶ درصد و ۱۰۰ درصد گزارش شد (۱۷).

در مطالعه‌ای که توسط ایمپریال (Imperiale) و همکاران در سال ۲۰۱۱ در کشور آرژانتین انجام گرفت، روش AS-PCR در مقایسه با روش کشت، با دقت و سرعت بالا حدود ۸۰ درصد از مقاومت‌ها به ایزونیازید را تشخیص داد (۱۸).

بررسی مطالعات صورت پذیرفته نشان دهنده‌ی این موضوع است که روش‌های مولکولی با دقت و سرعت بالایی قادر به تشخیص مقاومت به ایزونیازید می‌باشند (۱۹). در مطالعه حاضر، علاوه بر روش‌های مورد استفاده در مطالعات قبلی، از انواع روش‌های مبتنی بر PCR برای تشخیص مقاومت به ایزونیازید استفاده شد.

در مقایسه دو روش PCR-RFLP و AS-PCR باید به این نکته اشاره کرد که در روش PCR-RFLP به‌علت استفاده از آنزیم جهت برش و ژل ارکریل آمید در الکتروفورز عمودی برای مشاهده باندها مدت زمان انجام آزمایش نسبت به روش AS-PCR حداقل یک روز افزایش می‌یابد و همچنین باید خطرات استفاده از ژل اکریل آمید به جهت سرطان‌زا بودن آن را مورد توجه قرار داد، لذا به‌نظر می‌رسد روش AS-PCR با حساسیت و ویژگی یکسان با روش PCR-RFLP و زمان کمتر آزمایش و استفاده از ژل آگارز جهت مشاهده باندها، مناسب‌تر و کم‌هزینه‌تر نسبت به سایر روش‌های مولکولی برای استفاده روتین باشد.

تأئید مولکولی ماهیت باکتری و متعاقباً تائید وجود بیماری سل به همراه تعیین سریع مقاومت سویه به ایزونیازید به‌صورت همزمان با اجرای تست‌های ساده

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-10]

و کم هزینه، ارزش زیادی در ارائه نتایج توسط آزمایشگاه به پزشک دارد. که این مسئله نقش مهمی در تشخیص سریع و تجویز آنتی‌بیوتیک مناسب و از طرف دیگر کنترل اپیدمیولوژی بیماری و تعیین استراتژی‌های مناسب کنترل از دیدگاه سلامت جامعه را دارد.

همچنین مطالعه حاضر نشان می‌دهد که روش‌های PCR-RFLP و AS-PCR طراحی شده می‌توانند، به‌عنوان روش‌های ساده، سریع و کم هزینه به‌صورت همزمان برای کاهش ریسک خطا جهت تعیین حساسیت و مقاومت به ایزونیازید در سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مورد استفاده قرار گیرند.

سپاس و قدردانی

این پژوهش حاصل بخشی از پایان‌نامه دانشجویی آقای حمید برناسی دانشجوی دوره کارشناسی ارشد دانشگاه علوم پزشکی اراک می‌باشد. لذا بدین‌وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه و مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی اراک به دلیل تأمین هزینه‌های مالی و پشتیبانی تجهیزات و امکانات و کلیه کسانی که مجریان را در انجام این طرح یاری نمودند، تشکر به‌عمل می‌آید.

References:

1.Palomino JC, Martin A, Portaels F. Rapid drug resistance detection in *Mycobacterium tuberculosis*: a review of colourimetric methods. Clin Microbiol Infect 2007; 13: 754-62.
2.World Health Organization (WHO). Global tuberculosis report 2013: World Health Organization; 2013.
3.O'BRIEN RJ, Nunn PP. The need for new drugs against tuberculosis: obstacles, opportunities, and next steps. Am J Respir Crit Care Med 2001; 163: 1055-58.
4.Zhang Y, Heym B, Allen B, et al. The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. Nature 1992; 358: 591-3.
5.Karakousis PC. Mechanisms of action and resistance of antimycobacterial agents. Antimicrobial drug resistance: Springer; 2009:271-91.
6.Johnson R, Streicher EM, Louw GE, et al. Drug resistance in M. tuberculosis. Understanding the mechanisms of drug resistance in enhancing rapid molecular detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* 2007;7.
7.Afanas' ev MV, Ikryannikova LN, Il'ina EN, et al. Molecular characteristics of rifampicin-and isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from the Russian Federation. J Antimicrob Chemother 2007; 59: 1057-64.
8.Yang Z, Durmaz R, Yang D, et al. Simultaneous detection of isoniazid, rifampin, and ethambutol resistance of *Mycobacterium tuberculosis* by a single multiplex allele-specific polymerase chain reaction (PCR) assay. Diagn Microbiol Infect Dis 2005; 53: 201-8.
9.Mokrousov I, Otten T, Filipenko M, et al. Detection of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains by a multiplex allele-specific PCR assay targeting katG codon 315 variation. J Clin Microbiol 2002; 40: 2509-12.
10.Perdigão J, Macedo R, Silva C, et al. Tuberculosis drug-resistance in Lisbon, Portugal: a 6-year overview. Clin Microbiol Infect 2011; 17: 1397-1402.
11.Nasehi M, Mirhaghani L. *Mycobacterium Tuberculosis*. National Tuberculosis Control Guide. Sanandaj: Andishmand Co, 2009, 12-14.
12.Morlock GP, Metchock B, Sikes D, et al. ethA, inhA, and katG loci of ethionamide-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 3799-805
13.Velayati AA, Farnia P, Masjedi MR, et al. Totally drug-resistant tuberculosis strains: evidence of adaptation at the cellular level. Eur Respir J, 2009; 34: 1202-3.
14.Fassihi A, Azadpour Z, Delbari N, et al. Synthesis and antitubercular activity of novel 4-substituted imidazolyl-2, 6-dimethyl-N 3, N 5-bisaryl-1, 4-dihydropyridine-3, 5-dicarboxamides. Eur J Med Chem 2009; 44: 3253-8.
15.Khoshneviszadeh M, Edraki N, Javidnia K, et al. Synthesis and biological evaluation of some new 1, 4-dihydropyridines containing different ester substitute and diethyl carbamoyl group as anti-tubercular agents. Bioorg Med Chem 2009; 17: 1579-86.
16.Khosravi AD, Goodarzi H, Alavi SM.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-10]

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. Braz J Infect Dis 2012; 16: 57-62.

17.Chia BS, Lanzas F, Rifat D, et al. Use of multiplex allele-specific polymerase chain reaction (MAS-PCR) to detect multidrug-resistant tuberculosis in Panama. PloS one 2012; 7: e40456.

18.Imperiale BR, Cataldi AA, Morcillo NS. Rapid detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by multiplex allele-specific polymerase chain reaction. Int J Tuberc Lung Dis 2011; 15: 496-501.

19.Wang X, Jiao J, Xu Chia, et al. A simple, rapid and economic method for detecting multidrug-resistant tuberculosis. Braz J Infect Dis 2013; 17: 667-71.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-10]

ISMJ 2015; 18(2): 296-303

Original Article

Comparison of PCR-RFLP and Allele Specific-PCR and sequencing in rapid diagnosis of isoniazid resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*

H. Bornasi [1], M. Arjomandzadegan [1,2*], AR. Bahrmand [3], AR. Hadizadeh Tasbiti [3], A. Ahmadi [2], M. Tayeboon [2]

[1] Department of Immunology and Microbiology, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran
[2] Tuberculosis and Pediatric Infectious Diseases Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran
[3] Mycobacteriology Dept, Pasteur Institute of Iran, Tehran

(Received 5 Dec, 2013 Accepted 1 Feb, 2014)

Abstract

Background: Isoniazid is from the first-line drugs for treatment of tuberculosis. Resistance to Isoniazid is increasingly reported. In the study, molecular methods for rapid detection of isoniazid resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* were compared.

Materials and Methods : Sixty clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* were selected and their resistance and susceptibility were determined by proportional method. Molecular methods of PCR-RFLP and Allele Specific-PCR (AS-PCR) for determination of probably mutation in codon 315 of *katG* gene that related to Isoniazid resistance were used and compared by sequencing results as gold standard. In AS-PCR specific primers by proper PCR conditions were used. RFLP analysis of the PCR products was performed using the enzyme HpaII.

Results: From 60 studied strains, 27 isolates were resistant and 33 strains were susceptible to isoniazid. Sequencing results showed that AS-PCR and PCR-RFLP well able to detect mutations in codon 315 of the strains by 81.48% sensitivity and 100% specificity respectively. None of the susceptible strains harbored mutation in katG315.

Conclusion: Our results indicated that PCR-RFLP and AS - PCR methods were simple and fast methods for determination of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. These rapid and low cost methods is recommended simultaneously to reduce the risk of error in routine work.

Key words: Isoniazid, *Mycobacterium tuberculosis*, PCR-RFLP, Allele Specific-PCR

***Address for correspondence*: Tuberculosis and Pediatric Infectious Research Center and Department of Microbiology, Arak University of Medical Sciences, Arak, IRAN, E.mail: arjomandzadegan@arakmu.ac.ir

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-10]