دوماهنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست-پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال هجدهم، شماره ۳، صفحه ۵۵۵ – ۵۴۷ (مرداد و شهریور ۱۳۹۴)

ISMJ 2015; 18(3): 547-555

تشخیص همزمان سل ریوی و تعیین مقاومت داروئی به ایزونیازید در سویه‌های کلینیکی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با استفاده از روش PCR-RFLP

مریم السادات طیبون [۱]، مریم صدرنیا [۲*]، حمیدرضا مهاجرانی [۳]

[۱] مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
[۲] گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور
[۳] گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اراک، اراک، ایران

(دریافت مقاله: ۹۲/۲/۲۲- پذیرش مقاله: ۹۳/۲/۲۷)

چکیده

زمینه: تشخیص سریع و درمان دارویی مناسب اولین اقدام برای کنترل اپیدمی سل و سل مقاوم به دارو است. در مطالعه حاضر روش مولکولی **PCR-RFLP** جهت تشخیص سریع سویه‌های کلینیکی و تعیین مقاومت آن به ایزونیازید مورد استفاده قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: در مطالعه حاضر تعداد ۸۷ نمونه کلینیکی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا با کمک **PCR** جستجو و تکثیر ژن **katG** قطعه **۶۲۰bp** برای تأیید مولکولی در تشخیص باکتری صورت گرفت. سپس محصول **PCR** با کمک **RFLP** و با استفاده از آنزیم مناسب برش داده شده و الگوهای به‌دست آمده در الکتروفورز، به منظور تشخیص موتاسیون در **۳۱۵ katG** مورد بررسی قرار گرفت. جهت تأیید نهایی، تعدادی از نمونه‌ها تعیین توالی شدند.

یافته‌ها: در مطالعه حاضر تمامی سویه‌های مورد مطالعه باند **۶۲۰bp** را نشان دادند که مؤید مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بود. علاوه‌بر این، از ۴۶ سویه مقاوم به ایزونیازید، در روش **PCR-RFLP** نشان داده شد که ۴۴ سویه دارای موتاسیون در **Ser315Thr** ژن **katG** بودند. از ۴۱ سویه حساس هیچ کدام در کدون **۳۱۵ katG** موتاسیون نداشتند. از طرفی نتایج تعیین توالی، تأیید کننده‌ی تعیین موتاسیون به‌روش مولکولی مورد استفاده بود. در این تحقیق برای تست **PCR-RFLP** حساسیت ۹۵/۶ درصد (۰/۹۸-۰/۸۵:**CI** ۹۵ درصد) و ویژگی ۱۰۰ درصد (۰/۱-۰/۹۱:**CI** ۹۵ درصد) محاسبه گردید.

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که روش **PCR-RFLP** قادر به شناسایی مقاومت به ایزونیازید در ۹۵ درصد موارد بوده و می‌تواند در یک آزمایش به‌صورت همزمان جهت تشخیص سل ریوی و تعیین مقاومت داروئی به ایزونیازید در سویه‌های کلینیکی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، تشخیص، مقاومت داروئی، **katG**، **PCR-RFLP**

* گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور

Email :msadrnia@yahoo.com

مقدمه

بیماری سل هنوز هم به‌عنوان یک عامل عفونی با مرگ ومیر بالا در سراسر جهان در نظر گرفته می‌شود. به‌طور کلی یک سوم از جمعیت جهان در حال حاضر با باسیل سل آلوده‌اند. متأسفانه، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (MTB) با تقریباً ۹ میلیون مورد جدید در هر سال، همچنان به‌عنوان یک تهدید جهانی برای بهداشت عمومی باقی مانده است (۴-۱).

این مشکل با ظهور سل مقاوم به چند دارو (MDR) که نتیجه‌ی استفاده گسترده و بدون ملاحظه‌ی آنتی‌بیوتیک‌هاست با پیچیده‌تر کردن موفقیت در درمان منجر به شکست در ریشه کن کردن بیماری سل شد (۲ و ۴).

امروزه، ایزونیازید (INH)، اتامبوتول (EMB)، ریفامپیسین (RIF) و پیرازینامید (PZA) از اجزای مهم رژیم درمانی ضد سل خط اول هستند. این داروها برای راهبرد درمان کوتاه مدت تحت نظارت مستقیم، یا DOTS، به منزله ستون فقرات درمان سل (TB) می باشد (۲، ۳ و ۵).

طبق توصیه سازمان بهداشت جهانی قبل از تجویز هر گونه آنتی‌بیوتیک باید حساسیت باکتری به انواع داروهای نامبرده مشخص گردد. در سال‌های اخیر تعداد افراد مبتلا به سل مقاوم به چند دارو بالا رفته و دامنه‌ای بین ۷۷-۱۵ درصد را شامل می‌شود (۶ و ۷).

سازمان بهداشت جهانی تخمین زده است که حدود ۶۵۰/۰۰۰ از ۱۲ میلیون مورد سل شایع در سال ۲۰۱۰، MDR-TB(Multi Drug -Resistance) شناسایی شده است. مقاومت چند دارویی (MDR) مقاومتی است که در آن سویه جدا شده، حداقل به دو داروی اصلی و مهم ضد سل یعنی ایزونیازید و ریفامپین مقاوم باشد. این موضوع برنامه جهانی درمان سل را به شدت به خطر انداخته است (۳، ۴ و ۸).

تشخیص سریع و دارو درمانی مناسب به اولین اولویت در کنترل این بیماری همه گیر و در حال رشد تبدیل شده است. تعیین سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم در برابر درمان (MDR) با استفاده از تکنیک‌های مولکولی یک روش سریع برای تشخیص و کنترل بیماری است و برای درمان موفق و کنترل شیوع سویه‌های مقاوم در جامعه، امری ضروری می‌باشد (۹).

در ایران شیوع مقاومت در دست کم یک دارو ۵ درصد و شیوع MDR-TB با موارد قبلاً درمان شده ۴۸/۲ درصد می‌باشد (۷).

ایزونیازید یک داروی ضد سل خط اول، بسیار کارآمد برای از بین بردن باسیل سل است، با این حال، افزایش سویه‌های مقاوم به ایزونیازید، اثر بخشی این دارو را به‌عنوان یک عامل کنترل بیماری در جمعیت‌ها کاهش داده است. ایزونیازید یک پیش داروست که توسط باکتری فعال می‌شود. آنزیم کاتالاز- پراکسیداز که توسط ژن katG کد می‌شود، با فعال کردن ایزونیازید باعث ایجاد رادیکال‌های آزاد شده که به نوبه خود برای باکتری سمی هستند (۱۰).

مکانیسم‌های مرتبط با مقاومت به ایزونیازید در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس ناشی از جهش در ژن‌های مختلف است. این تغییرات عمدتاً در ژن‌های katG، ژن inhA، ژن kasA، ژن ahpC و ژن ndh شناسایی شده است. علاوه بر این، جهش در ژن‌های furA، iniA، iniB وiniC نیز در سویه‌های مقاوم در برابر ایزونیازید مشاهده شده است (۱۱).

مطالعات اخیر نشان داده که احتمالاً به‌علت اهمیت جزء پراکسیداز برای قابلیت زیست سلول، حذف کامل ژن نادر است. به همین دلیل بیشترین مقاومتی

که از طریق تغییر در KatG ایجاد می شود، انتخاب جهش‌های خاصی است که باعث کاهش فعالیت کاتالاز در سطحی است که ارگانیزم‌های مقاوم به ایزونیازید قادر به زیست باشد. طبق مطالعات گذشته، جانشینی در کدون Ser315Thr بیشترین میزان جهش را شامل می‌شود. جهش‌های ایجاد شده، توازن بهینه بین کاهش فعالیت کاتالاز و بالاترین سطح مورد نیاز از فعالیت پراکسیداز KatG را فراهم می‌کند (۱۲).

شیوع جهش در ژن katG در بین مناطق مختلف جهان با نرخ‌های مختلف از ۷ درصد در فنلاند تا ۹۴ درصد در شمال غرب روسیه متفاوت است. به هر حال، یک جهش غالب در ژن katG، Ser315Thr، برای بیش از ۹۰-۷۰ درصد از فنوتیپ‌ها با مقاومت بالا به ایزونیازید (MIC>5 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، عامل مقاومت به ایزونیازید فرض شده است، که بیشترین نوع جهش در جایگزینی سرین به ترئونین (AGC:ACC) می‌باشد (۸ و ۱۰).

هدف از این مطالعه ارائه روشی سریع و مناسب برای تشخیص سریع و شناسایی جهش مرتبط با مقاومت به ایزونیازید در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش، تعداد ۸۷ سویه بررسی شد که از این میان، ۴۱ سویه حساس و ۴۶ سویه از نظر فنوتیپی مقاوم به ایزونیازید بودند. مجموعاً در ۸۷ نمونه MTB حساسیت و ویژگی روش PCR-RFLP مورد بررسی قرار گرفت و نتایج به‌دست آمده با نتایج تعیین توالی مقایسه شد.

استخراج DNA

جهت استخراج DNA از روش Chelex100 استفاده شد. به‌طور خلاصه ۴-۳ کلنی جوان در ۲۷۰ میلی‌لیتر بافر (1x) TAE محتوی ۷۰ میلی‌گرم Chelex ۱۰۰ حل گردید. در مرحله بعد به مدت ۴۵ دقیقه در ۹۷ درجه سانتی‌گراد گرمادهی شد. سپس سه مرتبه سانتریفوژ با دور ۱۴۰۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه (به منظور حذف Chelex) انجام شد. در نهایت سوپرناتانت محتوی DNA در فریزر نگه‌داری شد. بدین منظور سویه‌های حساس، مقاوم به دارو و سویه استاندارد H37Rv مورد استفاده قرار گرفتند (۱۳ و ۱۴).

پروتکل PCR

به‌منظور بررسی وجود موتاسیون در ژن KatG315، DNA استخراج شده به همراه پرایمرهای اختصاصی KatG۹۰۴ و KatG۱۵۲۳ برای تکثیر ناحیه ۶۲۰bp استفاده شد (۵).

واکنش PCR در حجم نهائی ۲۵ میکرولیتر صورت گرفت. شرایط PCR به میزان ۵ نانوگرم ازDNA استخراج شده، ۲ ماکرومول از بافر و ۰/۵ ماکرومول MgCl2، میزان ۱۵ پیکومول از هر جفت پرایمرهای رفت و برگشت، ۰/۱۵ ماکرومول از مخلوط دزوکسی نوکلئوتید (dNTP)، ۱/۵ واحد از آنزیم Taq پلیمراز (شرکت سیناژن) انجام گرفت.

سیکل حرارتی برای تکثیر katG شامل دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۵ دقیقه و۴۰ سیکل به‌صورت ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۱ دقیقه، ۵۸ درجه سانتی‌گراد برای ۱ دقیقه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۱ دقیقه و بعد از پایان ۴۰ سیکل دمای پایانی ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۱۰ دقیقه بود. وجود قطعه ۶۲۰bp در محصول PCR با کمک الکتروفورز روی ژل آگارز ۲ درصد تأیید شد. جهت تعیین جهش در کدون KatG۳۱۵، عامل مقاومت به ایزونیازید، محصول PCR جهت انجام PCR-RFLP مورد استفاده قرار گرفت.

PCR-RFLP

تعیین موتاسیون در KatG۳۱۵ با کمک RFLP و با استفاده از آنزیم برش‌گر HpaII، محل برش (AGC:ACC) انجام شد. بدین منظور ۱۲ میکرولیتر از محصول PCR با 5 واحد اندونوکلئاز HpaII (شرکت فرمنتاز) برش داده شد و محصولات حاصل از هضم آنزیم بر روی ژل پلی آکریل آمید ۱۲ درصد الکتروفورز گردید. با کمک نرم‌افزار Genetix باندهای مورد انتظار برای قطعه مورد نظر این آنزیم تعیین شدند (۵).

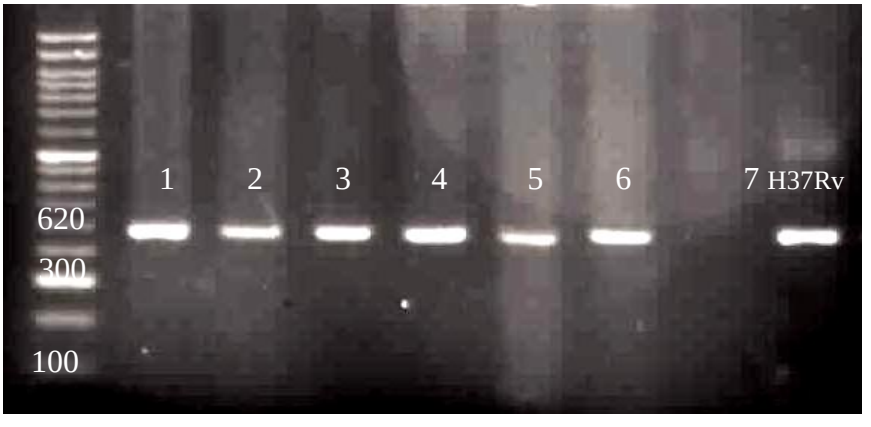
تعیین توالی ژن (انجام سکوئنس)

به‌منظور بررسی جهش‌های نقطه‌ای که با روش PCR-RFLP شناسایی شده‌اند، ۲۰ تا از سویه‌های MTB (۱۰ سویه حساس ۱۰ سویه مقاوم) به‌صورت تصادفی انتخاب شد. برای ارزیابی صحت روش PCR-RFLP، از روش تعیین توالی، به‌عنوان استاندارد طلایی استفاده شد. در این روش، محصول PCR برای تعیین توالی و تجزیه و تحلیل ژنتیکی (Applied Bio systems) به شرکت Source Bioscience انگلستان فرستاده شد.

یافته‌ها

نتایج PCR

انجام PCR ژن *KatG*۳۱۵، روی تمامی نمونه‌های مورد مطالعه، باند ۶۲۰bp را ارائه نمود که نشان دهنده انتخاب صحیح پرایمرها و تعیین برنامه مناسب PCR بود. وجود قطعه ۶۲۰bp ژن *katG* به‌عنوان مایکوباکتریوم توبرکلوزیس شناسایی شدند (شکل ۱).



شکل ۱) ژل الکتروفورز قطعه 620bp حاصل از *KatG*۳۱۵
شماره‌های ۶-۱ سویه‌های کلینیکی، ۷ کنترل منفی و ۸ سویه استاندارد

در شکل ۱ محصول PCR برای ۸ نمونه نشان داده شده است. ستون شماره ۱سایز مارکر ۱۰۰bp شرکت سیناژن، ستون ۲ تا ۷ نمونه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مورد مطالعه که باند۶۲۰ bp را نشان دادند، ستون شماره ۸ به‌عنوان کنترل منفی فاقد DNA و ستون شماره ۹ سویه استاندارد H37Rv به‌عنوان کنترل مثبت بررسی شد.

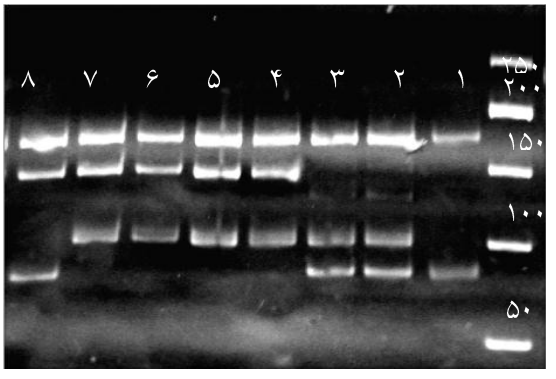
نتایج PCR-RFLP

در این روش محصول برش آنزیمی به کمک PCR-RFLP همان‌گونه که با نرم‌افزار Genetix پیش‌بینی شده بود، برای سویه‌های فاقد جهش الگوی A و B و برای سویه‌های دارای جهش، الگویC و D را نشان داد (جدول ۱).

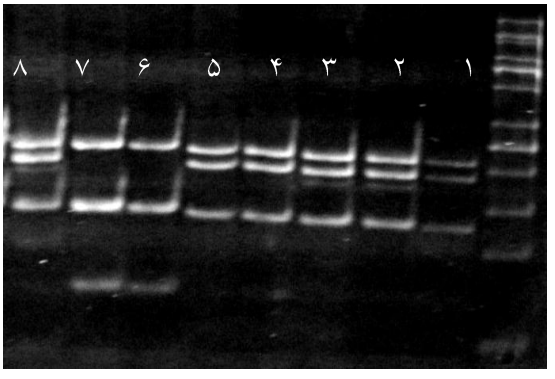
جدول ۱) الگوی PCR-RFLP قطعه‌ی ۶۲۰bp برای ۸۶ نمونه بعد از برش با آنزیم HpaII

الگو	اندازه قطعات RFLP حاصل برش با آنزیم HpaII					
	۲۲۸(bp)	۲۰۲(bp)	۱۵۳(bp)	۱۳۷(bp)	۱۳۲(bp)	۶۵(bp)
A	+		+	+		+
B	+	+	+			
C	+			+	+	+
D	+	+			+	

در این مطالعه تمامی سویه‌های مورد مطالعه باند ۶۲۰bp را تشکیل دادند که تأیید کننده مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بود. علاوه‌بر این، از ۴۶ سویه مقاوم به ایزونیازید، با روش PCR-RFLP، ۴۴ سویه دارای موتاسیون در Ser315Thr ژن *katG* بودند. ۴۱ سویه حساس هیچ‌کدام در کدون ۳۱۵*katG* موتاسیون نداشتند. حساسیت ۹۵/۶ درصد (۹۵ درصد–CI:۰/۸۵–۰/۹۸) و ویژگی ۱۰۰ درصد (۹۵ درصد–CI:۰/۹۱–۱) با نرم‌افزار محاسباتی On Line محاسبه گردید. نتیجه هضم قطعه ۶۲۰bp، محصول PCR ژن *KatG* در نمونه‌های مختلف، متفاوت بوده و الگوهای متنوعی را نشان می‌دهد. نتایج این یافته‌ها در شکل‌های ۲ و ۳ نشان داده شده است.

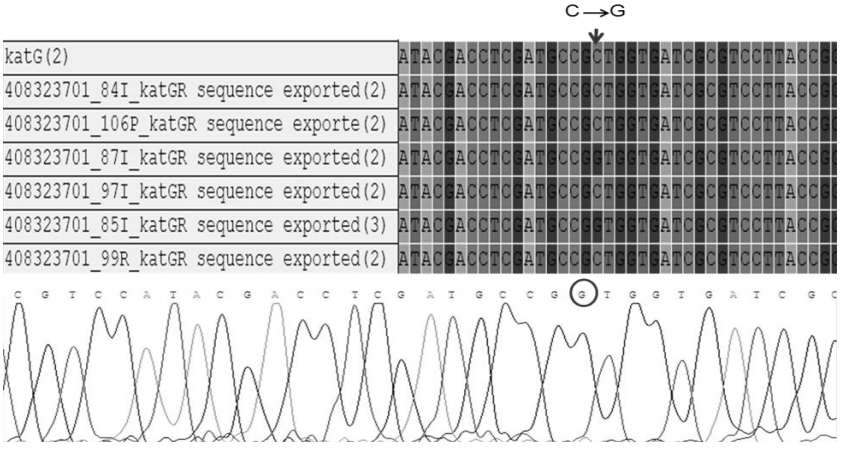


شکل ۲) الگوهای (A و B) PCR-RFLP



شکل ۳) الگوهای (C و D) و PCR-RFLP

شکل ۲ الگوی A و الگوی B برای سویه‌های فاقد جهش و شکل ۳، الگوی C و الگوی D سویه‌های دارای جهش را نشان می‌دهد.



شکل ۴) نتایج تعیین توالی

نتایج تعیین توالی

نتایج حاصل از توالی‌یابی به‌منظور شناسایی جهش در کدون ۳۱۵ ژن *KatG* با نرم‌افزار MEGA۴ و Chromas بررسی شد. همان‌طور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود در سطر اول توالی ژن *KatG* و در ادامه برخی از نمونه‌هایی که تعیین توالی شده‌اند، مورد بررسی قرار گرفت. به‌عنوان مثال در نمونه ۸۴I در مقایسه با توالی ژن اصلی نوکلئوتید سیتوزین به گوانین تبدیل شده است (در این شکل توالی نوکلئوتیدها ریورس شده و تغییر نوکلوتیدی بیان شده معرف جهش ایجاد شده‌ی G۹۴۵C مرتبط با کدون ۳۱۵ می‌باشد). نتایج تعیین توالی، تعیین موتاسیون به روش مولکولی را تأیید کرد. از نتایج به‌دست آمده، رخداد موتاسیون در کدون *KatG*۳۱۵ در سویه‌های مقاوم استنباط گردید. به این ترتیب با اجرای یک تست تشخیص هم زمان بیماری سل و تعیین مقاومت دارویی به ایزونیازید محقق گردید.

بحث

به علت گسترش روز افزون سل مقاوم به دارو، و با توجه به متد درمانی سل، فراهم نمودن روش‌هایی برای تشخیص سریع حساسیت یا مقاومت سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به دارو امری ضروری به‌نظر می‌رسد.

بر اساس پروتکل درمانی WHO، بعد از اثبات علائم بالینی شامل ۲ هفته سرفه مداوم، کاهش وزن، تب با عرق شبانه خلط، خلط خونی و درد قفسه سینه، پزشک تقاضای آزمایش‌هایی از جمله بررسی میکروسکوپی خلط و کشت را می‌دهد. بررسی میکروسکوپی خلط به‌روش زیل- نلسن سریع بوده ولی در حدود ۸۰-۲۰ درصد کارایی دارد (۳ و ۴).

نتایج کشت ۴۵ روز بعد (۳ تا ۶ هفته) اعلام می‌شود. درصورت مثبت بودن خلط، پزشک درمان حمله‌ای را برای ۲ ماه با ۴ داروی ایزونیازید، ریفامپیسین، پیرازینامید و اتامبوتول را شروع می‌کند. پس از منفی شدن خلط، ۶ ماه درمان ۲ دارویی ایزونیازید و ریفامپیسین را ادامه می‌دهد (۱۵).

طبیعتاً با توجه به حساسیت تعریف شده برای زیل- نلسن و طولانی بودن زمان کشت، استفاده از کیت‌های تشخیصی و روش‌های مولکولی به‌عنوان استاندارد طلایی بسیار ارزشمند می‌باشد.

استفاده از کیت‌ها، اغلب نیاز به تأمین دستگاه‌های پرهزینه داشته و وابستگی همیشگی آزمایشگاه را به کیت به دنبال دارند. ضمن اینکه هزینه اجرای تست را نیز بسیار افزایش می‌دهند. این روش‌ها پرهزینه و وقت‌گیر بوده و امکان استفاده از آن به‌صورت روتین وجود ندارد، لذا روش‌های مناسب‌تر به لحاظ زمانی و اقتصادی در استفاده روتین ترجیح داده می‌شوند.

در اجرای روتین، روش‌های موسوم به In-house، که شامل انواع روش‌های PCR می‌باشند، مناسب‌تر به نظر می‌رسند. در اینجا از تعیین توالی به‌عنوان استاندارد طلایی مولکولی استفاده به عمل آمده است. نتایج به دست آمده، انطباق قابل قبولی به لحاظ حساسیت و ویژگی، بین نتایج مذکور را نشان می‌دهد که اثبات کننده کارایی روش در استفاده روتین می‌باشد.

سرعت عمل در اجرای این روش، قابل قبول بوده و از طرفی نتیجه تست در زمان بسیار کوتاه‌تری به‌دست می‌آید. بنابراین امکان اجرای آن، به‌عنوان تست روتین آزمایشگاهی، حتی در آزمایشگاه‌هایی که تعداد نمونه‌های مورد پذیرش بالایی به‌صورت روزانه دارند، می‌باشد.

نتیجه‌گیری

روش PCR-RFLP برای تعیین موتاسیون در ژن *KatG*۳۱۵ در سویه‌های مقاوم به داروی ایزونیازید

مایکوباکتریوم توبرکلوزیس روشی سریع و در دسترس و همچنین با قدرت تشخیصی و دقت بالا می‌باشد.

این روش جهت تشخیص سریع و در دسترس سویه‌های مقاوم باکتری و درمان به موقع بیماران مبتلا و جلوگیری از افزایش هزینه بیماران مسلول انجام گرفت. همچنین استفاده از این روش می‌تواند منجر به تشخیص به موقع یک بیمار مقاوم به دارو شود که این مسأله از دیدگاه اپیدیمیولوژیک بسیار حائز اهمیت است. از آنجا که جهش در ژن KatG آنزیم کاتالاز- پراکسیداز در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (MTB) عامل اصلی مقاومت به ایزونیازید (INH) به حساب می‌آید، هدف از این مطالعه ارائه روشی سریع و مناسب برای شناسایی موتاسیون‌های مرتبط با مقاومت به ایزونیازید در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می‌باشد (۵).

استفاده از روش‌های ملکولی سریع برای تشخیص مقاومت به داروهای خط اول، تأخیر زمانی در تشخیص سل مقاوم در برابر دارو (MDR-TB) را به نحو چشمگیری کاهش خواهد داد.

استفاده نابجا از داروهای پرهزینه و سمی خط دوم (SLDs) برای درمان MDR-TB ممکن است به ظهور گسترده سویه‌های سل مقاوم در برابر دارو (XDR-TB) منجر شود XDR-TB. به‌عنوان مقاومت به فلوروکینولون به همراه حداقل یکی از داروهای تزریقی خط دوم (SLDs) کانامایسین، آمیکاسین و یا کاپرئومایسین تعریف می‌شود XDR-TB به‌خصوص در کشورهایی که بار HIV در آن‌ها بالاست، مانند آفریقای جنوبی با میزان مرگ ومیر بالا همراه است (۹).

مدت درمان طولانی سویه‌های مقاوم مایکوباکتریوم توبرکلوزیس منجر به از دست رفتن زمان قابل توجهی در درمان بیمار می‌شود. در حال حاضر هیچ دستورالعمل استانداردی برای درمان سویه‌هایی با مقاومت بالا وجود ندارد (۹).

علاوه‌بر این، نتایج تعیین توالی وجود موتاسیون در کدون ۴۶۳ *katG* را در تعدادی از سویه‌های مورد مطالعه نشان داد. باید توجه داشت که موتاسیون در کدون ۴۶۳ *katG* صرفاً یک پلی‌مورفیسم است که همراه با بررسی کدون ۹۵ *Gyr* در تعیین گروه ژنتیکی باکتری کاربرد داشته و در ایجاد مقاومت داروئی نقشی ندارد، ولی موتاسیون در کدون ۳۱۵ *katG* وابسته به مقاومت به ایزونیازید می‌باشد. از نتایج تعیین توالی اثبات می‌شود وجود یا عدم وجود جهش در ۳۱۵ *katG* در تعیین حساسیت مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به ایزونیازید نقش اصلی دارد.

سپاس و قدردانی

این پژوهش حاصل بخشی از پایان‌نامه دانشجویی سرکار خانم مریم طیبون (دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات اراک) می‌باشد. بدین‌وسیله از آزمایشگاه میکروبشناسی و کلیه همکارانی که ما را در این پژوهش یاری نموده‌اند صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نماییم.

References:

1.Ahmad S, Mokaddas E. Contribution of AGC to ACC and other mutations at codon 315 of the katG gene in isoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates from the Middle East. Int J Antimicrob Agents. 2004; 23: 473-9.

2.Marahatta SB, Gautam S, Dhital S, et al. katG (SER 315 THR) gene mutation in isoniazid resistant Mycobacterium tuberculosis. Kathmandu Univ Med J 2011; 9: 19-23.

3.WHO. Anti-Tuberculosis Drug Resistance in the World: Report No. 4. 2008. http://whqlibdoc.who.int/hq/2008/WHO_HTM_TB_2008.394_eng. pdf (Accessed at:

13 Jan, 2010).
4.WHO. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing.WHO report 2008. Geneva, World Health Organization, 2008.
5.Leung ET, Kam KM, Chiu A, et al. Detection of katG Ser315Thr substitution in respiratory specimens from patients with isoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosis using PCR-RFLP. J Med Microbiol 2003; 52: 999-1003.
6.Setareh M, Titov LP, Surkova LK. High level association of mutation in KatG315 with MDR and XDR clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis in Belarus. Acta Microbiol Immunol Hung 2009; 56:313-25.
7.Kim SY, Park YJ, Song E, et al. Evaluation of the CombiChip Mycobacteria Drug-Resistance detection DNA chip for identifying mutations associated with resistance to isoniazid and rifampin in Mycobacterium tuberculosis. Diagn Microbiol Infect Dis 2006; 54: 203-10.
8.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.
9.Pirayandeh M, Nazari R, Zolfaghari MR, Arjmandzadegan M etal, Evaluation of conservation in carD sequence's gene and its application in rapid detection of Mycobacterium tuberculosis.Iranian South Medical Journal 2014; 17 (3) : 263-271.
10.Varela G, González S, Gadea P, et al. Prevalence and dissemination of the Ser315Thr substitution within the KatG enzyme in isoniazid-resistant strains of Mycobacterium tuberculosis isolated in Uruguay. J Med Microbiol 2008; 57: 1518-22.
11.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.
12.Piatek AS, Telenti A, Murray MR, et al. Genotypic analysis of Mycobacterium tuberculosis in two distinct populations using molecular beacons: implications for rapid susceptibility testing. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44: 103-10.
13.Eshghinejad Fard A, Farazi AA, Eshrati B, et al. Detection of Major Genetic Groups of Mycobacterium tuberculosis isolated from tuberculosis patients in Markazi province by polymorphism determination in kat G and gyr A genes. Arak Med Univ J 2012; 15: 26-34.(Persian)
14.Vadwai V, Shetty A, Rodrigues C. Multiplex allele specific PCR for rapid detection of extensively drug resistant tuberculosis. Tuberculosis 2012; 92: 236-42.
15.Johnson R, Streicher EM, Louw GE, et al. Drug resistance in Mycobacterium tuberculosis [dissertation]. Stellenbosch University; 2007, pp. 97-111.

ISMJ 2015; 18(3): 547-555

Orjinal Article

Simultaneous detection of TB and drug resistance to Isoniazid in Mycobacterium tuberculosis clinical isolates using PCR-RFLP method

M. Tayeboon [1], M. Sadrnia [2*], HR. Mohajerani [3]

[1] Infectious Diseases Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

[2] Department of Biology, Payame Noor University, I.R. of Iran

[3] Department of Microbiology, Islamic Azad University, Arak Branch, Arak, Iran

(Received 12 May, 2013 Accepted 17 May, 2014)

Abstract

Background: Early detection and suitable drug admission are the first attempts to control of TB and MDR-TB. In this study, PCR-RFLP method was used for rapid detection of Mycobacterium tuberculosis and resistance to isoniazid.

Materials and Methods: In the present study, 87clinical isolates of MTB were used in a PCR-RFLP method. The RFLP-PCR assay by specific primer was used for two purposes; In the first, PCR of *katG* gene for diagnosis of bacteria and in the second step, PCR product by endonuclease enzyme in a RFLP reaction produced a pattern in electrophoresis for mutation detection in *katG*315. Sequencing method was used for confirmation of RFLP results.

Results: The study showed that all studied strains produced band 620bp that confirmed MTB. From the 46 resistant strains to isoniazid, the RFLP-PCR method showed that 44 strains had mutations in the *katG* gene Ser315Thr. The 41 susceptible strains had not any mutation at the codon. Results of sequencing were confirmed results of the molecular method. Sensitivity of RFLP-PCR test was 95.6% (95% CI :0.85-0 .98) and specificity was 100% (95% CI :0.91-1 .0).

Conclusion: RFLP-PCR test is a good tool for simultaneous diagnosis and detection of *katG315* mutation in clinical isolates of MTB.

Key Words: Mycobacterium tuberculosis, diagnosis, drug resistance, katG, PCR-RFLP

******Address for correspondence***:** Department of Biology, Payame Noor University, I.R. of Iran, E-mail: msadrnia@yahoo.com