



ISMJ 2015; 18(3): 547-555

دوماهنامه طب 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)

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

مریم السادات طبون^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 زیست‌شناسی، 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 katG ۳۱۵ 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. علاوه بر 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 (CI: ۰/۸۵-۰/۹۸) و ویژگی ۱۰۰ درصد (CI: ۰/۹۱-۰/۱) 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 دارویی به ایزونیازید در سویه‌های کلینیکی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مورد استفاده قرار گیرد.

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

* گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور

مقدمه

بیماری سل هنوز هم به عنوان یک عامل عفونی با مرگ و میر بالا در سراسر جهان در نظر گرفته می شود. به طور کلی یک سوم از جمعیت جهان در حال حاضر با باسیل سل آلوده اند. متأسفانه، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (MTB) با تقریباً ۹ میلیون مورد جدید در هر سال، همچنان به عنوان 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 می شود (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 می باشد (۹).

در ایران شیوع مقاومت در دست کم یک دارو ۵ درصد و شیوع MDR-TB با موارد قبلاً درمان شده ۴۸/۲ درصد می باشد (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 به عنوان یک عامل کنترل بیماری در جمعیت‌ها کاهش داده است. ایزونیازید یک پیش داروست که توسط باکتری فعال می شود. آنزیم کاتالاز- پراکسیداز که توسط ژن *katG* کد می شود، 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* و *iniC* نیز در سویه‌های مقاوم در برابر ایزونیازید مشاهده شده است (۱۱).

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

بافر (۱x) TAE محتوی ۷۰ میلی گرم Chelex ۱۰۰ حل گردید. در مرحله بعد به مدت ۴۵ دقیقه در ۹۷ درجه سانتی‌گراد گرمادهی شد. سپس سه مرتبه سانتریفوژ با دور ۱۴۰۰۰ به مدت 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

به منظور 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 از DNA 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 پلیمرز (شرکت سیناژن) انجام گرفت.

سیکل حرارتی برای تکثیر katG شامل دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۵ دقیقه و ۴۰ سیکل به صورت 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.

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 به دست آمده با نتایج تعیین توالی مقایسه شد.

استخراج DNA

جهت استخراج DNA از روش Chelex100 استفاده شد. به طور خلاصه ۳-۴ کلنی جوان در ۲۷۰ میلی‌لیتر

PCR-RFLP

تعیین موتاسیون در $KatG^{315}$ با کمک RFLP و با استفاده از آنزیم برش گر HpaII، محل برش (AGC:ACC) انجام شد. بدین منظور ۱۲ میکرولیتر از محصول PCR با 5 واحد اندونوکلاز HpaII (شرکت فرمتاز) برش داده شد و محصولات حاصل از هضم آنزیم بر روی ژل پلی آکریل آمید ۱۲ درصد الکتروفورز گردید. با کمک نرم افزار Genetix باندهای مورد انتظار برای قطعه مورد نظر این آنزیم تعیین شدند (۵).

تعیین توالی ژن (انجام سکونس)

به منظور بررسی جهش های نقطه ای که با روش PCR-RFLP شناسایی شده اند، ۲۰ تا از سویه های MTB (۱۰ سویه حساس ۱۰ سویه مقاوم) به صورت

تصادفی انتخاب شد. برای ارزیابی صحت روش PCR-RFLP، از روش تعیین توالی، به عنوان 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.

یافته ها

نتایج PCR

انجام PCR ژن $KatG^{315}$ روی تمامی نمونه های مورد مطالعه، باند ۶۲۰bp را ارائه نمود که نشان دهنده انتخاب صحیح پرایمرها و تعیین برنامه مناسب PCR بود. وجود قطعه ۶۲۰bp ژن $katG$ به عنوان مایکوباکتریوم توبرکلوزیس شناسایی شدند (شکل ۱).



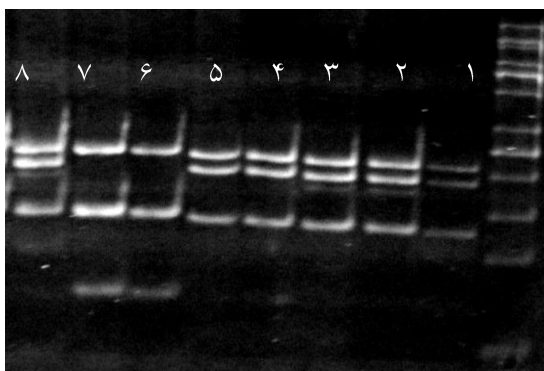
شکل ۱) ژل الکتروفورز قطعه 620bp حاصل از $KatG^{315}$ شماره های ۱-۶ سویه های کلینیکی، ۷ کنترل منفی و ۸ سویه استاندارد

نتایج PCR-RFLP

در این روش محصول برش آنزیمی به کمک PCR-RFLP همان گونه که با نرم افزار Genetix پیش بینی شده بود، برای سویه های فاقد جهش الگوی A و B و برای سویه های دارای جهش، الگوی C و D را نشان داد (جدول ۱).

در شکل ۱ محصول PCR برای ۸ نمونه نشان داده شده است. ستون شماره ۱ سائز مارکر ۱۰۰bp شرکت سیناژن، ستون ۲ تا ۷ نمونه های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مورد مطالعه که باند ۶۲۰ bp را نشان دادند، ستون شماره ۸ به عنوان کنترل منفی فاقد DNA و ستون شماره ۹ سویه استاندارد H37Rv به عنوان کنترل مثبت بررسی شد.

ایزونیازید، با روش PCR-RFLP، ۴۴ سویه دارای موتاسیون در Ser315Thr ژن *katG* بودند. ۴۱ سویه حساس هیچ کدام در کدون *katG* ۳۱۵ موتاسیون نداشتند. حساسیت ۹۵/۶ درصد (۹۵ درصد- ۹۸-۰/۹۸ CI) و ویژگی ۱۰۰ درصد (۹۵ درصد- ۱-۰/۹۸ CI) با نرم افزار محاسباتی On Line محاسبه گردید. نتیجه هضم قطعه ۶۲۰bp محصول PCR ژن *KatG* در نمونه های مختلف، متفاوت بوده و الگوهای متنوعی را نشان می دهد. نتایج این یافته ها در شکل های ۲ و ۳ نشان داده شده است.

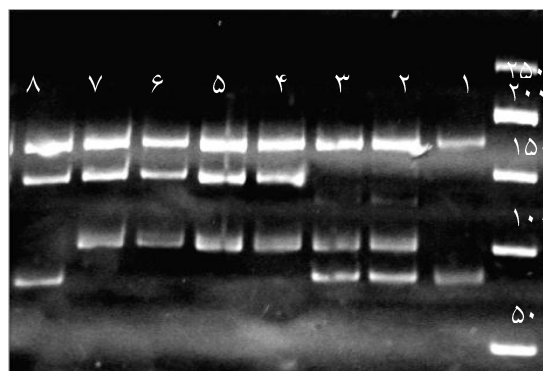


شکل ۳) الگوهای (C و D) و PCR-RFLP

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

اندازه قطعات RFLP حاصل برش با آنزیم <i>HpaII</i>	۶۲۰ (bp)	۲۰۲ (bp)	۱۵۳ (bp)	۱۳۷ (bp)	۱۳۲ (bp)	۶۵ (bp)
A	+	+	+	+	+	+
B	+	+	+	+	+	+
C	+	+	+	+	+	+
D	+	+	+	+	+	+

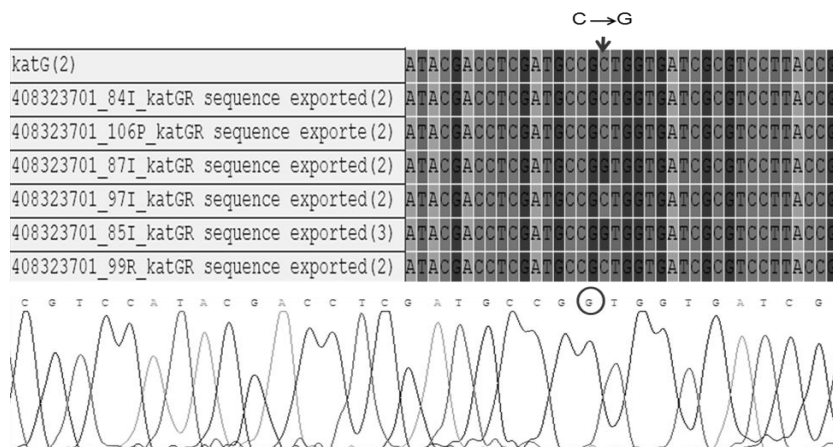
در این مطالعه تمامی سویه های مورد مطالعه باند ۶۲۰bp را تشکیل دادند که تأیید کننده مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بود. علاوه بر این، از ۴۶ سویه مقاوم به



شکل ۲) الگوهای (A و B) و PCR-RFLP

دارای جهش را نشان می دهد.

شکل ۲ الگوی A و الگوی B برای سویه های فاقد جهش و شکل ۳، الگوی C و الگوی D سویه های



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 نوکلئوتیدی بیان شده معرف جهش ایجاد شده‌ی G۹۴C 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

در آن‌ها بالاست، مانند آفریقای جنوبی با میزان مرگ و میر 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 استاندارد برای درمان سویه‌هایی با مقاومت بالا وجود ندارد (۹).

علاوه بر این، نتایج تعیین توالی وجود موتاسیون در کدون *katG* ۴۶۳ را در تعدادی از سویه‌های مورد مطالعه نشان داد. باید توجه داشت که موتاسیون در کدون *katG* ۴۶۳ صرفاً یک پلی مورفیسم است که همراه با بررسی کدون *GyrA* ۹۵ در تعیین گروه ژنتیکی باکتری کاربرد داشته و در ایجاد مقاومت دارویی نقشی ندارد، ولی موتاسیون در کدون *katG* ۳۱۵ وابسته به مقاومت به ایزونیاژید می‌باشد. از نتایج تعیین توالی اثبات می‌شود وجود یا عدم وجود جهش در *katG* ۳۱۵ در تعیین حساسیت مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به ایزونیاژید 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. بدین وسیله از آزمایشگاه میکروبیشناسی و کلیه همکارانی که ما را در این پژوهش یاری نموده‌اند صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نمایم.

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*

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 اپیدمیولوژیک بسیار حائز اهمیت است. از آنجا که جهش در ژن *KatG* آنزیم کاتالاز-پراکسیداز در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (*MTB*) عامل اصلی مقاومت به ایزونیاژید (*INH*) به حساب می‌آید، هدف از این مطالعه ارائه روشی سریع و مناسب برای شناسایی موتاسیون‌های مرتبط با مقاومت به ایزونیاژید 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. به عنوان مقاومت به فلوروکینولون به همراه حداقل یکی از داروهای تزریقی خط دوم (*SLDs*) کانامایسین، آمیکاسین و یا کاپرئومایسین تعریف می‌شود *XDR-TB* به خصوص در کشورهایی که بار *HIV*

(*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 et al, 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.

Original 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, 87 clinical 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 *katG315*. 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