دوماهنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست- پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال هجدهم، شماره ۶، صفحه ۱۱۲۳– ۱۱۱۵ (بهمن و اسفند ۱۳۹۴)
ISMJ 2016; 18(6): 1115-1123

تشخیص سریع موتاسیون در کدون ۴۳ ژن rpsL مرتبط با مقاومت به استرپتومایسین توسط تکنیک RFLP با آنزیم‌های اندونوکلئازی BsajI و MbooII در سویه‌های کلینیکی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس

محمد ارجمندزادگان [۱]، سمیه گراوند [۲]، اعظم احمدی [۳*]، مریم صدرنیا [۴]، منیژه کهبازی [۵]

[۱] گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
[۲] گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی علوم تحقیقات تهران (مرکزی)، ایران
[۳] گروه ژنتیک مولکولی، دانشگاه تربیت مدرس تهران، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
[۴] گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
[۵] بخش اطفال، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

(دریافت مقاله: ۹۳/۷/۲۹- پذیرش مقاله: ۹۳/۹/۴)

چکیده

زمینه: استرپتومایسین یکی از مهم‌ترین داروهای مؤثر جهت درمان بیماری سل می‌باشد که مقاومت به آن به طور فزاینده‌ای گزارش می‌شود. شایع‌ترین موتاسیون‌های مرتبط با مقاومت به داروی استرپتومایسین در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در کدون‌های ۴۳ و ۸۸ ژن rpsL (NC_000962.3) اتفاق می‌افتد. هدف از این مطالعه بررسی تغییرات ژن rpsL در سویه‌های کلینیکی این باکتری با استفاده از دو آنزیم BsajI و MbooII است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه ۷۱ سویه کلینیکی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس استفاده شد. روش مولکولی PCR-RFLP با دو آنزیم BsajI و MboII جهت تعیین موتاسیون در کدون ۴۳ ژن rpsL، به ترتیب در سویه‌های مقاوم و حساس، طراحی و نتایج به‌دست آمده با روش توالی‌یابی و فنوتیپ سویه‌ها مقایسه گردید.

یافته‌ها: در این مطالعه از کل سویه‌های موجود، ۲۵ سویه توسط آنزیم BsajI بررسی شدند که از این تعداد، ۶۴ درصد سویه‌های مقاوم تشخیص داده شد. ۴۶ سویه نیز توسط آنزیم MboII بررسی و حدود ۹۱ درصد سویه‌های حساس فاقد موتاسیون تشخیص داده شد. این آنزیم (برخلاف BsajI) برای تشخیص سویه‌های حساس طراحی شده بود. نتایج توالی‌یابی انطباق کامل با نتایج PCR-RFLP را نشان داد و وجود جهش در کدون‌های ۴۳ این ژن را در سویه‌های مورد مطالعه اثبات نمود.

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که روش RFLP با آنزیم‌های اندونوکلئازی طراحی شده می‌تواند به عنوان روشی سریع، ساده و دارای حساسیت بالا برای تمایز سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم و حساس به استرپتومایسین مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: مقاومت دارویی، استرپتومایسین، PCR-RFLP، BsajI

* اراک، گروه ژنتیک مولکولی، دانشگاه تربیت مدرس تهران، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
E-mail:azam.ahmadi@modares.ac.ir

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-06]
[DOI: 10.7508/ismj.1394.06.001]

مقدمه

سل از بیماری‌های همه‌گیر در جهان و ایران می‌باشد. بر اساس برآورد سازمان جهانی بهداشت (WHO) یک سوم جمعیت جهان به بیماری سل آلوده‌اند و سالانه حدود ۹ میلیون مورد جدید نیز به این بیماری مبتلا می‌شوند. سرعت آلوده شدن افراد در حال حاضر یک نفر در هر ثانیه است. WHO تخمین زده است که در آینده نزدیک ۱ میلیارد نفر دیگر نیز به این باسیل آلوده می‌شوند که از این میان ۲۰۰ میلیون نفرشان به بیماری مبتلا می‌شوند و ۳۵ میلیون نفر از این بیماری می‌میرند. اکثر موارد ابتلا به سل و مرگ و میرهای ناشی از این بیماری در کشورهای در حال توسعه دیده می‌شوند (۱).

درمان عفونت‌های مایکوباکتریومی، برخلاف سایر عفونت‌های باکتریایی پیچیده و بحث‌برانگیز است. بیماران باید چندین آنتی‌بیوتیک را برای دوره‌های طولانی، حداقل از ۶ تا ۹ ماه، دریافت نمایند در غیر این صورت سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک به‌وجود خواهند آمد (۲). مهم‌ترین داروهایی که علیه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به‌کار گرفته می‌شوند شامل ریفامپین، ایزونیازید، اتامبوتول، پیرازین آمید و استرپتومایسین هستند (۵-۳). مقاومت دارویی به سل با معرفی اولین داروی ضد سل در دنیا در سال ۱۹۴۳ مشخص شد و سپس با ادامه استفاده از این دارو و پیدایش داروهای جدیدتر شروع به افزایش کرد (۶-۴). از دهه ۷۰ قرن بیستم ظهور سویه‌های مقاوم به چند دارو یا MDR به معضلی اساسی و تهدیدکننده برای برنامه کنترل سل در جهان مبدل شد تا جایی که سازمان جهانی بهداشت در سال ۱۹۹۳سل را به عنوان یک مسئله جهانی معرفی کرد (۲، ۷ و ۸).

اهمیت این موضوع زمانی احساس شد که موارد MDR تبدیل به XDR (سویه‌های مقاومت به داروهای خط اول و دوم) گردید. به طوری که از سال ۲۰۰۵ سویه‌های XDR از برخی نقاط دنیا به خصوص مناطقی که با بیماری ایدز درگیر هستند گزارش شده است (۱۱-۹). در سال‌های قبل از پیدایش داروی ضد سل فقدان دارو عامل عمده مرگ بیماران بود و اکنون در شروع قرن ۲۱ مقاومت دارویی یکی از عوامل مهم مرگ ومیر بیماران سلی به شمار می‌رود (۱۵-۱۲).

استرپتومایسین، یک آنتی‌بیوتیک آمینوگلیکوزیدی و باکتریسیدال و اولین داروی مورد استفاده در درمان سل، از سال ۱۹۴۴ بوده است (۱۰ و ۱۶). مکانیسم عمل این دارو همانند آمینوگلیکوزیدها است به گونه‌ای که از اتصال آمینواسیل- tRNA به جایگاه A ریبوزوم حین فرآیند ترجمه جلوگیری کرده و باعث مرگ باکتری می‌شود. مقاومت به استرپتومایسین، وابسته به وجود موتاسیون در ژن rpsL و به میزان خیلی اندکی در ژن rrs است. مطالعات انجام شده اهمیت تغییر در دو کدون ۴۳ و ۸۸ از ژن rpsL (و بخصوص کدون ۴۳) را در ایجاد مقاومت به استرپتومایسین بیان کرده‌اند. در این مطالعه برای اولین بار تکنیک RFLP-PCR با دو آنزیم BsajI و MboII جهت تشخیص تغییر در کدون ۴۳ ژن rpsL استفاده شد.

مواد و روش‌ها

انتخاب نمونه و تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی

نمونه‌های مورد بررسی از بانک DNA موجود در مرکز تحقیقات سل و عفونی کودکان انتخاب شدند. از ۷۱ سویه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس انتخاب شده، ۱۴ سویه مقاوم و ۱۱ سویه حساس به استرپتومایسین که

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-06]

[DOI: 10.7508/ismj.1394.06.001]

بر روی محیط کشت رشد کرده بودند برای بررسی توسط آنزیم BsajI (Fermentas) و ۳۵ نمونه مقاوم و ۱۱ نمونه حساس به منظور مطالعه با آنزیم MboII (Fermentas) مورد استفاده قرار گرفت. BsajI به‌منظور تشخیص سویه‌های مقاوم و MboII برای شناسایی سویه‌های حساس مورد استفاده قرار گرفتند. نمونه‌های کلینیکی مورد مطالعه با استفاده از تست‌های معمول شامل بررسی‌های میکروسکوپی کشت و تست‌های بیوشیمیایی باکتری‌ها به‌عنوان مایکوباکتریوم توبرکلوزیس شناسایی شدند. این مطالعه تأیید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی اراک را اخذ نموده و کلیه داده‌های جمع‌آوری شده از بیماران در آن به‌صورت محرمانه بوده است. این نمونه‌ها محدود به استان مرکزی نبوده و از سایر استان‌ها نیز جمع‌آوری گردیده‌اند. تعداد کل سویه‌ها ۷۱ سویه بود.

استخراج DNA

برای استخراج DNA از باکتری‌هایی که قبلا تعیین مقاومت شده بودند، از کیت Chelex (Sigma) استفاده شد (۱۷) و سوپرناتانت نهایی به عنوان DNA در فرآیند PCR مورد استفاده قرارگرفت.

PCR-RFLP

برای اجرای تکنیک PCR-RFLP طراحی پرایمر به منظور تولید آمپلیکون ۵۰۲ جفت بازی انجام گرفت.

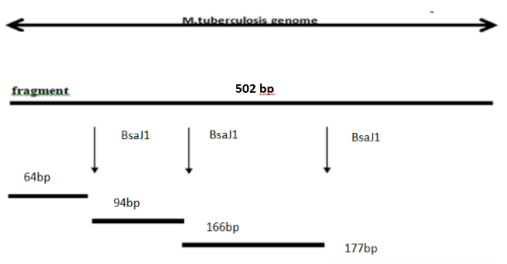
طراحی پرایمر

قطعه ۵۰۲ bp از ژن rpsL با استفاده از پرایمرهای 5’- F–GGCCGACAAACAGAACGT -3’ rpsL و R–rpsL (5’-GTTCACCAACTGGGTGAC-3) تکثیر شد. پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق با کمک نرم افزارهای MEGA4، oligo6، Blast و IDT طراحی گردیدند.

انتخاب آنزیم برش

محصول PCR ۵۰۲ جفت بازی در برنامه Genetyx-win ویرایش ۵/۱ قرار داده شده و آنزیم‌های Bsaj1 و MboII برای تشخیص حالات حساس و مقاوم انتخاب شدند.

آنزیم Bsaj1 قادر است که حالت موتانت کدون ۴۳ را شناسایی نماید. در صورتی که باکتری حساس به استرپتومایسین باشد (عدم جهش در کدون ۴۳) این آنزیم قادر است که قطعه ۵۰۲ جفت بازی را در دو نقطه برش داده و سه قطعه ۹۴، ۲۳۰ و ۱۷۸ جفت بازی به‌دست می‌آید. در حالتی که باکتری مقاوم باشد و در کدون ۴۳ موتاسیون داشته باشد سه قطعه و در سویه‌های حساس چهار قطعه (با طول‌های ۹۴، ۶۴، ۱۶۶ و ۱۷۸) ایجاد خواهد شد. عملاً قطعه ۲۳۰ جفت بازی در سویه‌های حساس به دو باند ۶۴ و ۱۶۶ شکسته می‌شود. در صورت رخداد موتاسیون در کدون ۸۸ در وضعیت موجود تغییری ایجاد نخواهد شد. در برش آنزیمی محصول PCR ۵۰۲ جفت بازی به کمک MboII برای سویه‌های موتانت دو قطعه و برای سویه‌های غیر موتانت یک قطعه ۵۰۲ جفت بازی ایجاد می‌شود.



شکل ۱) نمایی شماتیک از برش یک سویه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به استرپتومایسن حاوی جهش در ژن rpsL توسط آنزیم BsajI

انجام PCR-RFLP

پروتکل حرارتی PCR با دمای اتصال ۵۹ درجه به مدت ۱ دقیقه انجام شد. هر ۲۵ میکرولیتر از مخلوط

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-06]

[DOI: 10.7508/ismj.1394.06.001]

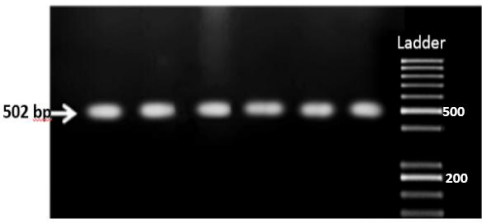
واکنش حاوی ۲ میکرولیتر از DNA، ۲/۵ میکرولیتر MgCl2 (50mM)، ۱/۵ میکرولیتر از هر پرایمر (10pmol)، ۰/۷ میکرولیتر از هر داکسی نوکلئوتیدتری فسفات (سیناژن)، و ۱ واحد Taq (سیناژن) بود. وجود DNA تکثیر شده ۵۰۲bp توسط الکتروفورز در ژل ۱ درصد آگارز (سیناکلون) تأیید شد. سپس محصولات حاصل از PCR به وسیله آنزیم‌های برش طراحی شده Bsaj۱ و MboII هضم شدند. برای انجام واکنش هضم مخلوط، ۱۰ میکرولیتر محصول PCR، ۲ میکرولیتر بافر، ۱ واحد از آنزیم اندونوکلئاز BsajI، ۷ میکرولیتر آب مقطر تهیه و به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در دستگاه ترمومیکسر (اپندورف) قرار داده شد. واکنش برش با قرار دادن در دمای ۶۵ درجه به مدت ۲۰ دقیقه متوقف گردید. قطعات حاصل از واکنش برش با الکتروفور بر روی ژل آگارز و رنگ‌آمیزی با ماده safstain (سیناکلون) توسط ترانس لومیناتور مشاهده و الگوهای حساس و مقاوم حاصل از برش با آنزیم‌های فوق، مقایسه گردیدند.

تعیین توالی

جهت بررسی دقیق نتایج، تعیین توالی DNA به‌عنوان استاندارد طلایی استفاده شد. بدین منظور نمونه‌ها به شرکت ژن فناوران (ایران) ارسال شدند و آنالیز نتایج توالی‌یابی توسط نرم‌افزارهای Mega4، Megalign، Chromas و Bioedit (BLOSUM62) انجام گردید.

یافته‌ها

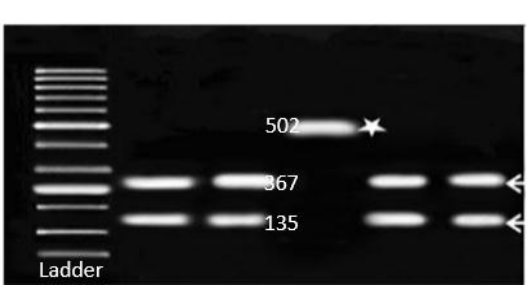
انجام PCR ژن rpsL روی تمامی نمونه‌های مورد مطالعه، باند ۵۰۲ bp را ارائه نمود که نشان دهنده طراحی صحیح پرایمرها و تعیین برنامه مناسب آمپلی‌فیکاسیون بود. شکل ۲ محصول ۵۰۲ جفت بازی حاصل از تکثیر این ژن را نشان می‌دهد.



شکل ۲) قطعه ۵۰۲ bp حاصل پرایمرهای F-rpsL و r-RPSL، محل فلش جایگاه ۵۰۲ جفت بازی را نشان می‌دهد.

نتایج PCR-RFLP

همان‌گونه که با نرم‌افزار Genetyx پیش‌بینی شده بود، برش محصول ۵۰۲ جفت بازی با آنزیم Bsaj1 برای سویه‌های موتانت باندهای ۹۴bp، ۶۴bp، bp۱۶۶ و bp ۱۷۸ و برای سویه‌های غیر موتانت باندهای ۹۴bp، bp ۲۳۰ و bp ۱۷۸ را ایجاد نمود از ۲۵ سویه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس که برای بررسی موتاسیون در ژن rpsL انتخاب شدند، ۱۴ سویه از نظر فنوتیپی مقاوم و ۱۱ سویه حساس بودند. آنزیم BsajI قادر به تشخیص ۹ سویه موتانت از میان ۱۴ سویه مقاوم فنوتیپی (۶۴ درصد سویه‌های مقاوم) بود. آنزیم MboII نیز از میان ۱۱ سویه حساس، ۱۰ سویه را فاقد موتاسیون تشخیص داد (شکل ۳). حساسیت این روش ۹۰ درصد و ویژگی آن ۶۸ درصد بوده است.



شکل ۳) آنزیم MboII در مورد سویه‌های موتانت باندهای ۳۶۷bp و bp ۱۳۵ (مکان‌های نشان داده شده توسط فلش) و برای سویه‌های غیر موتانت باند 502bp (جایگاهی که توسط ستاره مشخص شده است) را نشان می‌دهد.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-06]
[DOI: 10.7508/ismj.1394.06.001]

نتایج توالی‌یابی

برای ارزیابی صحت نتایج PCR-RFLP، از روش تعیین توالی به‌عنوان استاندارد طلایی مولکولی استفاده شد. انطباق کامل (۱۰۰ درصد) نتایج سکوئنس با PCR-RFLP نشانگر دقت در طراحی روش مورد استفاده از دیدگاه مولکولی بود.

جدول ۱) مقایسه حساسیت و ویژگی دوآنزیم برش مورد استفاده در این مطالعه

آنزیم‌های برش	تعداد سویه‌های کلینیکی		تعداد ژنوتیپ‌هایی که با RFLP تشخیص داده شدند		کل سویه‌ها	حساسیت	اختصاصیت
	حساس	مقاوم	نوع وحشی	حاوی جهش			
MbooII	-	۳۵	۱۴	۲۱	۴۶	٪۹۰	٪۹۵
	۱۱	-	۱۰	۱			
BsajI	-	۱۴	۵	۹	۲۵	٪۱۰۰	٪۶۸
	۱۱	-	۱۱	-			

بحث

در حال حاضر یکی از مشکلات اساسی در درمان بیماری سل موضوع مقاومت دارویی است. از نظر میکروب شناسی، مقاومت دارویی نسبت به باسیل سل زمانی صورت می‌گیرد که یک جهش ژنتیکی در باسیل به وجود آید (۱۸ و ۱۹). درمان ناقص یا اشتباه باعث می‌شود که باسیل‌های جهش یافته‌ای که به داروها مقاوم شده اند به سوش غالب در بدن فرد مبتلا تبدیل شوند. به نحوی که باسیل‌های حساس به دارو در اثر مصرف داروهای ضد سل مصرفی از بین رفته، اما موتانت‌های مقاوم تکثیر یافته و به سوش‌های غالب در بدن بیماران مبدل شوند. متأسفانه این امر باعث می‌شود بیمارانی که از ابتدا به باسیل‌های مقاوم به دارو آلوده شدند، نه تنها توسط رژیم کوتاه مدت و استاندارد درمان نشوند، بلکه دچار مقاومت بیشتر به طیف وسیع‌تری از داروهای ضد سل گردند (۱، ۸ و ۱۶). استرپتومایسین اولین آنتی‌بیوتیک مورد استفاده در درمان سل است. این دارو با تأثیر بر جایگاه‌های اتصال در ریبوزوم، A، P و E، از سنتز پروتئین ممانعت می‌کند. این اثر عمدتاً با ممانعت از اتصال آمینواسیل-tRNA به جایگاه A در فرآیند طویل شدن و نهایتاً با توقف سنتز پروتئین، باکتری را از بین می‌برد. مکانیسم مقاومت به استرپتومایسین عمدتاً وابسته به موتاسیون در ژن rpsL و به میزان خیلی ناچیز در ژن rrs می‌باشد. این دو ژن با توجه به مکانیسم خاص خودشان در سنتز پروتئین‌های ریبوزومی 16s rRNA، 12s rRNA، 15s rRNA و نقش در پروتئین سازی دیواره سلولی باکتری اهمیت پیدا می‌کنند و با ایجاد جهش در ژن کد کننده آن‌ها مقاومت ایجاد می‌شود. در ایجاد مقاومت به استرپتومایسین ژن rpsL بیشتر مورد توجه است و بیشترین میزان جهش در این ژن در کدون ۴۳ گزارش شده است. مطالعه حاضر برای اولین بار به بررسی وجود جهش در کدون ۴۳ ژن rpsL با آنزیم BsajI و MboII پرداخته است و با نتایج مطالعات گذشته انطباق دارد. تاتجارد تراسسکا (Tatjard Tracevska) در سال۲۰۰۴ بر روی ۶۶ ایزوله مقاوم به SM (استرپتومایسین) مطالعه کرد. وی نمونه‌هایش را با دو روش RFLP و سکونس مورد ارزیابی قرار داد و نتایج حاصل در ۴۰ نمونه به

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-06]

[DOI: 10.7508/ismj.1394.06.001]

تغییر در نوکلئوتید ۴۳ اشاره داشت. موتاسیون در نوکلئوتید ۴۳ از ژن rpsL حاصل تغییر شکل کدون (K→R)AAG→AGG بود (۲۰). در مطالعه حاضر نیز با توجه به اهمیت کدون ۴۳ و احتمال وجود بیشترین جهش‌ها در آن به بررسی کدون ۴۳ از ژن rpsL پراخته شده است که با این نتایج مطابقت داشت. با استفاده از گزارشات قبل که به‌صورت آلترناتیو به‌دست آمده بود بیان داشتند که به‌طور کلی ۵۲ تا ۵۸ درصد از مقاومت به استرپتومایسین حاصل موتاسیون در کدون ۴۳ ژن rpsL و ۸ تا ۱۴ درصد حاصل موتاسیون در ژن rrs بودند (۲۳-۲۱).

فوکودا (Fukuda) در سال ۱۹۹۹ تأثیر تغییرات ژنتیکی روی ژن rpsL در مقاومت به استرپتومایسین را در سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مورد بررسی قرار داد (۲۴). از ۱۲۱ سویه مورد بررسی توسط این شخص ۲۳ سویه دارای تغییرات ژنتیکی و دارای موتاسیون در کدون ۴۳ (AAG→CAG) و تغییر آمینواسید (تبدیل لیزین به آرژینین) گزارش شد. شابهادا (Shubhada) در سال ۲۰۰۸ به شناسایی سریع مقاومت به ایزونیازید، ریفامپین واسترپتومایسین در میان ایزوله‌های کلینیکی مایکوباکتریوم دارای موتاسیون پرداخت که در این میان ۷۵ درصد دارای جهش در کدون ۴۳ ژن rpsL بودند (۲۵). در مطالعه ذکر شده روش‌های مالتیپلکس-PCR و توالی یابی انجام و موتاسیون در کدون‌های (۴۳ و ۸۸) ژن rpsL در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس دیده شد. در سراسر جهان جهش در کدون‌های ۴۳ (AAG→AGG) و ۸۸ (AAA→AAG) به‌عنوان فراوان‌ترین جهش‌های ژن rpsL گزارش شده‌اند که باعث تبدیل اسید آمینه لیزین به اسید آمینه آرژینین می‌شود. این اسید آمینه‌ها جزء اسید آمینه‌های بازی با بار مثبت متفاوت هستند. مطالعه حاضر نیز نشان داد که تکنیک RFLP با دو آنزیم BsajI و MboII برای تشخیص جهش‌های نقطه‌ای در کدون ۴۳ ژن rpsL مفید است و برای تأیید این روش توالی یابی انجام گرفت. حساسیت و ویژگی روش‌های انجام شده نیز در جدول ۱ بیان شده است.

نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق مبین این است که روش RFLP با استفاده از دو آنزیم BsajI و MboII با دقت بالایی قادر به تشخیص موتاسیون در کدون ۴۳ ژن rpsL در نمونه‌های بالینی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می‌باشد. هر چند به منظور بررسی بیشتر مکانیسم مقاومتی می‌توان ساختارهای پروتئینی مدنظر را قبل و بعد از اعمال جهش توسط نرم‌افزارهای بررسی ساختاری (مانند Molegro و Pymol) پیشگویی نمود. درک بهتر این مکانیسم‌ها می‌تواند گامی در جهت غلبه مقاومت به آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین باشد. تشخیص دقیق و در دسترس سویه‌های مقاوم باکتری مولد سل، درمان به موقع بیماران مسلول و جلوگیری از افزایش هزینه‌های بیماران مذکور می‌تواند از نتایج این مطالعه باشد. علاوه‌بر این نتایج این تحقیق از نظر اپیدمیولوژیک نیز بسیار حائز اهمیت است.

سپاس و قدردانی

این پژوهش بخشی از طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی اراک (کد ۹۹۵) است. بنابراین بدین‌وسیله از معاونت پژوهشی، مرکز تحقیقات سل و عفونی کودکان و مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-06]

[DOI: 10.7508/ismj.1394.06.001]

دانشگاه علوم پزشکی اراک به خاطر پشتیبانی تجهیزات و امکانات و از کلیه همکارانی که ما را در این پژوهش یاری نموده‌اند صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

References:

1.World Health Organization. Extensively drug-resistant tuberculosis (XDR-TB): recommendations for prevention and control. Wkly Epidemiol Rec 2006; 81: 430–2.

2.Silke F, Barbara O, Abu G, et al. Sequence analysis for detection of first-line drug resistance in Mycobacterium tuberculosis strains from a high-incidence setting. BMC Microbiol 2012; 12: 90.

3.World Health Organization. Global Tuberculosis Control. WHO report, 2010.

4.Sharifi-Mood B, Khalili M, Alavi-Naini R, et al. Failure rate of treatment among smoker children with new case pulmonary tuberculosis, Zahedan, southeastern Iran. 27th annual meeting of the European society for paediatric infectious diseases. Belgium, 2009.

5.Sharifi-Mood B, Hemmati H, Ziaian B. Prevalence of pulmonary TB in patients with anthracofibrosis. Iran J Infect Dis Trop Med 2006; 11: 45–7. (Persian)

6.Springer B, Kidan YG, Prammananan T, et al. Mechanisms of streptomycin resistance: selection of mutations in the 16S rRNA gene conferring resistance. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 2877–84.

7.Johnson R. Understanding the mechanisms of drug resistance in enhancing rapid molecular detection of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis [Dissertation]. South Africa: Stellenbosch University, 2007, p: 97–112.

8.Abbasi A, Golalipour MJ. Tuberculosis drug resistant in smear positive pulmonary tuberculosis. Ofogh 2005; 10: 38–41. (Persian)

9.Bwanga F, Hoffner S, Haile M, et al. Direct susceptibility testing for multi-drug resistant tuberculosis: a meta-analysis. BMC Infect Dis 2009; 9: 67.

10.Brzostek A, Sajduda A, Sliwinski T, et al. Molecular characterisation ofstreptomycin-resistant Mycobacterium tuberculosis strains isolated in Poland. Int J Tuberc Lung Dis 2004; 8: 1032–5.

11.Perdigao J, Macedo R, Joao I, et al. Multidrug-resistant tuberculosis in Lisbon, Portugal: a molecular epidemiological perspective. Microb Drug Resist 2008; 14: 133–43.

12.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.

13.Sun YJ, Luo JT, Wong SY, et al. Analysis of rpsL and rrs mutations in Beijing and non-Beijing streptomycin-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates from Singapore. Clin Microbiol Infect 2010; 16: 287–9.

14.Spies FS, Da Silva PE, Ribeiro MO, et al. Identification of mutations related to streptomycin resistance in clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis and possible involvement of efflux mechanism. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52: 2947–9.

15.Tudo G, Rey E, Borrel S, et al. Characterization of mutations in streptomycin-resistant Mycobacterium tuberculosis clinical isolates in the area of Barcelona. J Antimicrob Chemother 2010; 65: 2341–6.

16.Bolotin S, Alexander DC, Chedore P, et al. Molecular characterization of drug-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates from Ontario, Canada. J Antimicrob Chemother 2009; 64: 263–6.

17.Ahmady A, Poolad T, Rafee P, et al. Study of Pyrazinamidase structural changes in Pyrazinamide resistant and susceptible isolates of Mycobacterium tuberculosis. Tuberc Thorax 2013; 61: 110–4.

18.Isakova Z, Goncharova ZK, Iusupova EU, et al. Analysis of mutations of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis strains in patients with tuberculosis in the Kyrghyz Republic. Probl Tuberk Bolezn Legk 2006; 4: 17–21.

19.Shi R, Zhang J, Li C, et al. Detection of streptomycin resistance in Mycobacterium

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-06]

[DOI: 10.7508/ismj.1394.06.001]

tuberculosis clinical isolates from China as determined by denaturing HPLC analysis and DNA sequencing. Microbes Infect 2007; 9: 1538–44.

20.Tracevska T; Jansone I; Nodieva A; et al. Characterization of rpsL, rrs and embB mutations associated with streptomycin and ethambutol resistance in Mycobacterium tuberculosis. Res Microbiol 2004; 155: 830–4.

21.Huang HN, Han JX, Wang JH, et al. rpsL gene analysis associated with Streptomycin resistance in Mycobacterium tuberculosis. Yi Chuan Xue Bao 2003; 30: 376–81.

22.Finken M, Kirschner P, Meier A, et al. Molecular basis of streptomycin resistance in Mycobacterium tuberculosis: alterations of the ribosomal protein S12 gene and point mutations within a functional 16S ribosomal RNA pseudoknot. Mol Microbiol 1993; 9: 1239–46.

23.Dobner P, Bretzel G, Rüsch-Gerdes S, et al. Geographic variation of the predictive values of genomic mutations associated with streptomycin resistance in Mycobacterium tuberculosis. Mol Cell Probes 1997; 11:123–6.

24.Fukuda M, Koga H, Ohno H, et al. Relationship between genetic alteration of the rpsL gene and streptomycin susceptibility of Mycobacterium tuberculosis in Japan. J Antimicrob Chemother 1999; 43: 281–4.

25.Shenai S, Rodrigues C, Mehta A. Rapid speciation of 15 clinically relevant mycobacteria with simultaneous detection of resistance to rifampin, isoniazid, and streptomycin in Mycobacterium tuberculosis complex. Int J Infect Dis 2009; 13: 46–58.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-06]

[DOI: 10.7508/ismj.1394.06.001]

ISMJ 2016; 18(6): 1115-1123

Original Article

Rapid detection of mutations in codon 43 of rpsL gene by RFLP method with BsajI and MbooII restriction enzymes associated with resistance to Streptomycin in clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis

M. Arjomandzadegan [1], S. Geravand [2], A. Ahmadi [3*], M. Sadrnia [4], M. Kahbazi [5]

[1] Department of Microbiology and Immunology, Infectious Disease Research Center (IDRC), Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

[2] Department of Microbiology, Islamic Azad University, Tehran (Markazi), Iran

[3] Department of molecular genetics, Tarbiat modares University, Infectious Disease Research Center (IDRC), Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

[4] Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran

[5]Department of Pediatrics, Infectious Disease Research Center (IDRC), Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

(Received 21 Oct, 2014 Accepted 25 Nov, 2014)

Abstract

Background: Streptomycin is one of the most efficient treatments of tuberculosis that increasingly reported its drug resistance. The most common mutations associated with drug resistance to streptomycin of Mycobacterium Tuberculosis, causes tuberculosis, and occurs at codons 43 and 88 of rpsL gene. The purpose of this study is study of alterations in rpsL gene with two restriction enzymes BsajI and MbooII related to drug resistant to streptomycin in clinical isolates of mycobacterium tuberculosis.

Materials and Methods: This study was performed using 71 clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis. Molecular PCR-RFLP methods were designed with two enzymes BsajI and MbooII for mutation analysis at codon 43 of rpsL, in resistant and susceptible strains, respectively. Finally, the results were compared with sequencing and phenotype strains.

Results: 25 subjects were studied with enzyme BsajI. This enzyme is capable of detection 64 percent of resistant and all sensitive strains. 46 strains were examined by enzyme MboII. This enzyme detected almost 91 percent of sensitive strains. MboII is selected for detection of sensitive strains (unlike BsajI). Results of sequencing rpsL genes in investigated strains, showed fully consistent with the results of PCR-RFLP and proved mutation in codon of 43 of thin genes in studied strains.

Conclusion: The results showed that the PCR-RFLP with designed restriction enzymes can be used as a rapid, simple assay, and has high sensitivity for differentiation of Mycobacterium tuberculosis strains that are resistance to Streptomycin.

Key word: Drug resistance, Streptomycin, PCR-RFLP, BsajI

**Address for correspondence:* Department of molecular genetics, Tarbiat Modares University, Infectious Disease Research Center (IDRC), Arak University of Medical Sciences, Arak, IR of Iran. Email: azam.ahmadi@modares.ac.ir

Website: http://bpums.ac.ir
Journal Address: http://ismj.bpums.ac.ir

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-06]

[DOI: 10.7508/ismj.1394.06.001]