

شناسایی موتاسیونهای مرتبط با مقاومت به ایزونیازید در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس

بیماران مسلول با استفاده از روش PCR-RFLP و MAS PCR

فریده دین محمدی^۱، پریسا فرنیآ^۲، علیرضا بیگلری^۳، مهدی کاظمپور^۴، رشید رمضانزاده^۵، محمد رضا مسجدی^۶، علی اکبر ولایتی^۷

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، زنجان، ایران

۲- دانشیار گروه میکروبیولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی - تهران، مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی، تهران، ایران
(مؤلف مسؤول) تلفن: ۰۲۱-۲۰۱۰۹۵۰۵ pfarnia@hotmail.com

۳- استادیار گروه ژنتیک انسانی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران

۴- مربی گروه آمار دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی - تهران، مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی، تهران، ایران

۵- استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی کردستان، سنندج، ایران

۶- استاد گروه داخلی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی - تهران، مرکز تحقیقات سل و بیماریهای ریوی، تهران، ایران

۷- استاد گروه اطفال، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی - تهران، مرکز تحقیقات سل و بیماریهای ریوی، تهران، ایران

چکیده

زمینه و هدف: ایزونیازید یکی از داروهای مهم خط اول درمان سل می باشد. مقاومت به این دارو در بسیاری از نقاط جهان رو به افزایش است. جهش های ایجاد شده در ژن *KatG* و *inhA* در اغلب موارد عامل مقاومت به ایزونیازید می باشند. هدف از این مطالعه ارائه روشی مناسب و سریع برای شناسایی موتاسیونهای مرتبط با مقاومت به ایزونیازید در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می باشد.

روش بررسی: در این مطالعه وجود جهش در نواحی خاصی از ژنهای *katG* و *inhA* در ۹۰ نمونه کشت مثبت بیماران مسلول ریوی پس از انجام تست های حساسیت دارویی بررسی شد. برای تعیین جهش های کدون ۳۱۵ *KatG* از تکنیک PCR-RFLP استفاده گردید. محصول PCR حاصل از تکثیر این قطعه ژنی (۶۲۰bp) توسط آنزیم محدودالانر *MspI* برش داده شد. برای شناسایی جهش در ژن *inhA* نیز از تکنیک MAS-PCR استفاده شد.

یافته ها: ۳۴/۵ درصد از نمونه های مقاوم به ایزونیازید فنوتیپ Thr315 و ۶۵/۵ درصد از نمونه های مقاوم فنوتیپ Ser315 را نشان دادند. اختصاصیت Thr315 برای نمونه های مقاوم ۱۰۰٪ می باشد. همچنین در این مطالعه از ۵۲ نمونه مقاوم به ایزونیازید ۳۴/۶ درصد کدون ۴۶۳ دارای اسید آمینه Arg و ۶۵/۴ دارای اسید آمینه Leu بودند. فراوانی جهش در لوکوس ($-15C \rightarrow T$) *inhA* نمونه های MDR و غیر MDR به ترتیب ۲۰٪ و ۱۶/۷ درصد بود.

نتیجه گیری: با استفاده از روش PCR-RFLP (آنزیم *MSPI*) و MAS PCR جهش های ایجاد شده در کدون ۳۱۵ ژن *KatG* و ناحیه پروموتور *inhA* شناسایی می شوند. این روشها علاوه بر سادگی و ارزان بودن نسبت به روشهای دیگر در مدت زمان کمتری نتایج دقیق و مطمئنی را فراهم می آورند.

کلید واژه ها: مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، مقاومت به ایزونیازید، PCR-RFLP، *KatG*، *inhA*، MAS PCR

وصول مقاله: ۸۸/۱۰/۹ اصلاح نهایی: ۸۸/۱۰/۱۶ پذیرش مقاله: ۸۸/۱۱/۱۷

مقدمه

سل مقاوم به دارو، شیمی درمانی استاندارد کوتاه مدت با داروهای ضد سل مرحله اول درمان را می‌کاهد و عامل مرگ و میر بالا و میزان درمان ناکارآمد و افزایش دوره سرایت بیماری می‌باشد (۱). طبق توصیه سازمان بهداشت جهانی قبل از تجویز آنتی‌بیوتیک باید حساسیت باکتری به انواع داروهای نامبرده مشخص گردد. در سالهای اخیر افراد مبتلا به سل مقاوم به چند دارو بالا رفته و دامنه‌ای بین ۷۷-۱۵ درصد را شامل می‌شود (۲). در ایران شیوع مقاومت در دست کم یک دارو ۵ درصد و شیوع^۱ MDR-TB با موارد قبلاً درمان شده ۴۸/۲ درصد می‌باشد (۳). طبق مطالعه‌ای که در ایران در سال ۲۰۰۷ انجام گرفت میزان مقاومت چند دارویی در بیماران جدید ۲/۶٪ در مقابل ۵۶٪ بیماران قبلاً درمان شده بود (۴).

انجام آزمایش‌های مرسوم تعیین حساسیت در مورد مایکوباکتریوم توبرکلوزیس علاوه بر مشکلات موجود در مسیر خالص‌سازی کلنی و غلظت‌های مختلف دارو، نیاز به حداقل ۳-۴ هفته زمان دارد. لذا بهتر است روش‌های مطمئن مولکولی جانشین روش‌های مرسوم گردد. برخی از این روش‌ها سریع، ارزان و در عین حال دقیق هستند (۳). یکی از داروهای مؤثر سل، ایزونیاژید می‌باشد. ایزونیاژید یک پیش دارو است و فعالیت آنتی‌بیوتیکی آن به فعال‌سازی باکتریایی به وسیله آنزیم کاتالاز- پراکسیداز (KatG) بستگی دارد که موجب ایجاد رادیکالهای فعالی می‌شود که نواحی بسیاری را در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مورد هدف قرار می‌دهند (۵). مطالعات اخیر نشان داده که احتمالاً به علت اهمیت جزء پراکسیداز برای قابلیت زیست سلول حذف کامل

ژن نادر است (۶). به این دلیل بیشترین مقاومتی که از طریق تغییر در KatG ایجاد می‌شود، انتخاب جهش‌های خاصی است که باعث کاهش فعالیت کاتالاز در سطحی است که ارگانیزم‌های مقاوم به ایزونیاژید قادر به زیست باشد. طبق مطالعات گذشته، جانشینی در کدون ۳۱۵ AGC→ACG (Ser→Thr) بیشترین میزان جهش را شامل می‌شود. این جهش‌های ایجاد شده، توازن بهینه بین کاهش فعالیت کاتالاز و بالاترین سطح مورد نیاز از فعالیت پراکسیداز KatG را فراهم می‌کند (۷). جهش‌های مرتبط با مقاومت به ایزونیاژید نسبت به سایر عوامل ضد سلی، مانند ریفامپین بسیار پیچیده‌تر است و ژنهای متعددی kasA, inhA, (ahpC), KatG و (mabA-inhA promoter) در این میان دخیل هستند (۸). inhA (انول-Acp ردکتاز) که یک پروتئین دخیل در مایکولیک اسید می‌باشد و در بیوسنتز دیواره سلولی دخیل است، هدف دیگری برای ایزونیاژید می‌باشد و جهش‌های مرتبط با مقاومت فتوتیبی ایزونیاژید در دو لوکوس inhA در مطالعات پیشین توصیف شده است. بنابراین بیشترین موتاسیون‌هایی که مرتبط با مقاومت به ایزونیاژید می‌باشند، KatG و inhA است. در میان روش‌های مرتبط با PCR روش RFLP به دلیل سهولت انجام و به صرفه بودن از اهمیت خاصی برخوردار است (۸). در این روش محصول PCR به وسیله آنزیم‌های محدودالایر خاصی برش داده می‌شود، به طوری که تعداد باندها و وزن مولکولی آنها می‌تواند گویای نوع جهش روی داده در ژن مورد نظر باشد. در روش MAS PCR از ترکیبات چند پرایمری جهت تکثیر بیش از یک ناحیه خاص در ژنوم در هر واکنش استفاده می‌شود. در ایران طی مطالعه‌ای، فراوانی جهش در کدون ۳۱۵ ژن KatG (Ser → Thr) ایزوله‌های مقاوم به

1. Multi Drug Resistance-TB

ایزونیازید (۲۱۱ g/ml)، ریفامپین (۴۰ g/ml)، استریتومایسین (۱۰۱۱ g/ml) و اتامبوتول (۲۱۱ g/ml) به روش تناسبی انجام و سویه‌ها به سه گروه حساس، MDR و غیر MDR تقسیم بندی شدند (۱۳).

استخراج DNA برای PCR

باکتری‌های رشد کرده بر سطح محیط کشت لونشتاین جانسون جمع‌آوری و پس از غیر فعال کردن با حرارت ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت، استخراج DNA از باکتری به روش CTAB به شرح ذیل انجام گرفت: ابتدا نمونه‌های حاوی سوسپانسیون باکتری غیر فعال به کمک بافر TE1x سه بار شستشو داده شد. در مرحله بعد TE1x و لیزوزیم را به نمونه‌ها اضافه کرده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس با استفاده از SDS ۱۰ درصد و پروتیناز K و انکوباسیون در دمای ۵۵-۵۶ درجه سانتی‌گراد عمل تخریب دیواره سلولی انجام گرفت. در مرحله بعد به همه رسوب‌ها ۵ NaCl مولار و بعد CTAB/NaCl اضافه شد و در ۶۰ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون شد. برای جداسازی پروتئین از کلرفرم/ایزوآمیل الکل به همراه سانتیفریژ (با دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه) استفاده شد. به فاز روئی ایزوپروپانل اضافه شد و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. مرحله بعد سانتیفریژ با دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه و اضافه کردن الکل ۷۰ درصد به رسوب و دوباره سانتیفریژ به مدت ۲-۱ دقیقه بود. مرحله آخر حذف RNA بود که توسط آنزیم RNAase انجام شد (۱۴).

PCR- RFLP

واکنش آمپلیفیکاسیون در حجم نهائی ۵۰ میکرولیتر، حاوی ۱۰ نانوگرم DNA استخراج شده، ۲۰ پیکومول از هر پرایمر، ۰/۲ ماکرومول از dNTP و ۰/۲

ایزونیازید در مراکز سل استان‌های اصفهان و تهران به روش PCR-RFLP بررسی شده است (۹). همچنین با استفاده از این روش شناسایی موتاسیونهای مرتبط با مقاومت به ایزونیازید در چین انجام گرفته است (۱۰). در مطالعه‌ای دیگر در ایران که در مرکز تحقیقات سل در تبریز انجام گرفت، از MAS PCR برای شناسایی موتاسیونهای ایجاد شده مرتبط با مقاومت به اتامبوتول استفاده شده است (۱۱). در تحقیق دیگری که توسط Maxine Caws و همکاران انجام گرفته برای بررسی موتاسیونهای مرتبط با مقاومت به ایزونیازید از روش PCR-RFLP و MAS-PCR استفاده گردیده است (۱۲).

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

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی - تحلیلی تلاش شد تا پس از تایید میکروبی سویه‌های جمع‌آوری شده از مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی پژوهشکده سل و بیماری‌های ریوی با استفاده از روش PCR-RFLP برای Kat G و MAS PCR برای inh A نوع جهش‌های مرتبط با مقاومت به ایزونیازید بررسی شود. ۳۰ سویه MDR و ۳۰ سویه غیر MDR و ۳۰ سویه حساس به ایزونیازید از سالهای ۸۷-۱۳۷۸ جمع‌آوری شد. جداسازی اولیه سویه‌های مایکوباکتریوم با روش بتروف ۴٪ و با استفاده از محیط Lowenstein Jensen (L.J) انجام شد و برای شناسایی سویه‌ها از تست‌های بیوشیمیایی از قبیل: تست‌های نیاسین، فعالیت کاتالاز، احیاء نترات استفاده شد. حساسیت داروئی در برابر

واکنش آمپلیفیکاسیون در حجم نهائی ۵۰ ماکرولیتر حاوی ۱۰ نانو گرم DNA استخراج شده، ۰/۱ ماکرومول dNTP، ۰/۲ ماکرومول Mgcl، ۱/۵ U Taq آنزیم Hot Stare انجام شد.

سیکل حرارتی برای انجام PCR شامل: ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، ۶۱/۸ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۷ دقیقه، ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه بود. محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS و Ness انجام گرفت.

یافته‌ها

محصول PCR ژن KatG قطعه ۶۲۰ bp است که در شکل ۱ نشان داده شده است. نتیجه هضم این قطعه ۶۲۰ در نمونه‌های حساس و مقاوم دارای الگوهای متفاوتی می‌باشد. جزئیات این یافته‌ها در جدول ۲ و شکل ۲ آمده است.

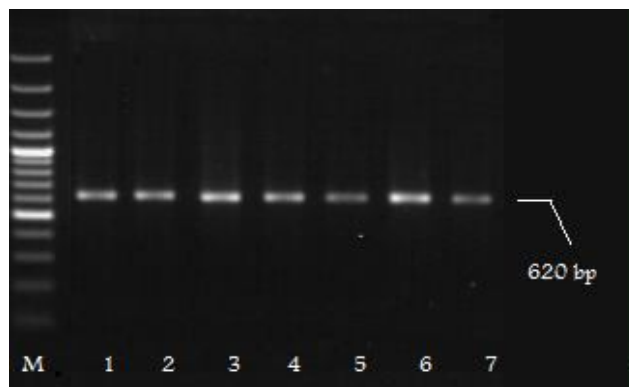
ماکرومول Mgcl و ۲/۵U آنزیم Taq انجام شد. پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه در جدول ۱ آمده است (۱۰).

سیکل حرارتی برای آمپلی فای ناحیه katG شامل: دمای اولیه؛ ۹۴ درجه سانتیگراد برای ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل بصورت ۹۴ درجه سانتیگراد برای ۱ دقیقه، ۶۱/۸ درجه سانتیگراد برای ۱ دقیقه، ۷۲ درجه سانتیگراد برای ۱ دقیقه، دمای پایانی؛ ۷۲ درجه سانتیگراد برای ۷ دقیقه و ۴ درجه سانتیگراد برای ۱ دقیقه.

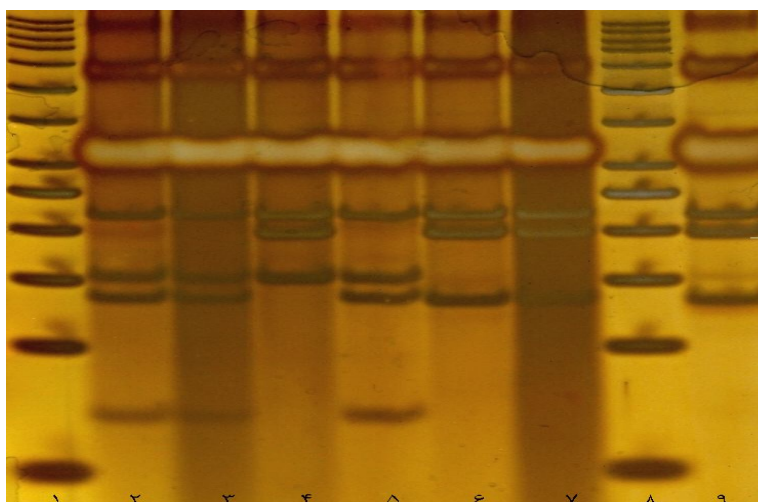
محصول PCR ژن katG به کمک آنزیم‌های محدودکننده MspI برش داده شد (این آنزیم امکان شناسایی جهش AGC→ACC را در KatG315 فراهم می‌آورد). محصولات حاصل از هضم آنزیم‌های محدودکننده مذکور به روی ژل پلی آکریل آمید الکتروفورز شد.

MAS PCR

تکنیک MAS PCR برای شناسایی موتاسیون در لوکوس inh A(-15C→T) بکار رفت. در این تکنیک از سه پرایمر، ۰/۲TB92 ماکرومول، پرایمر TB93 ۰/۵ ماکرومول و پرایمر Rmut ۰/۲۵ ماکرومول استفاده شد. توالی پرایمرهای استفاده شده در جدول ۱ آمده است (۱۲).



شکل ۱: ژل الکتروفورز قطعه ۶۲۰ bp حاصل از KatG PCR
ستون ۱ سویه استاندارد H37Rv، ستون ۲، ۳ و ۴ حساس و ۵، ۶ و ۷ مقاوم



شکل ۲: الگوهای RFLP ژن Kat G پس از هضم آنزیمی MspI. سه ایزوله دارای موتاسیون در کدون ۳۱۵ KatG (Thr→Ser) (ستون های ۶، ۷، ۹) و سه ایزوله فاقد موتاسیون (ستونهای ۳، ۴، ۵) و ایزوله Rv (ستون ۲) و ستون ۱ و ۸ مارکر ۵۰bp.

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

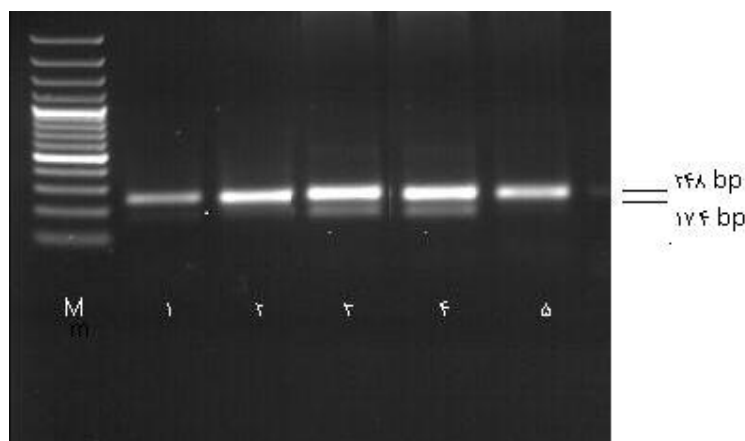
Location Allel	Primers	Sequence
(KatG315)	Kat G 904	5'-GCTCGTATGGCACCGGAAC-3'
	katG1523	5'-TTGACCTCCCACCCGACTTG-3'
inh A(-15C→T)	TB92	3'-CCTCGCTGCCCAGAAAGGGA-5'
	TB93	3' ATCCCCCGGTTTCCTCCGGT-5'
	Rmut	5'- AGTCACCCCGACAACCTATTA-5'

جدول ۲: الگوهای PCR-RFLP از قطعه ۶۲۰ bp برای ۹۰ نمونه MTB جدا شده بعد از هضم آنزیم MspI

pattern	MSPI RFLP DNA fragment(bp)						Amino acide	Phenotype	
	228	202	153	137	132	65		INH-suseptible (n=38)	INH-resistant (n=52)
A	+		+	+		+	Ser315+Arg463	23(60.5%)	17(32.7%)
B	+	+	+				Ser315+Leu463	15(39.5%)	17(32.7%)
C	+			+	+	+	Thr315+Arg463	0	1(2%)
D	+	+			+		Thr315+Leu463	0	17(32.7%)

از دیگر جهش‌های که در مقاومت به ایزونیازید نقش دارد موتاسیون ایجاد شده در ناحیه پروموتور inhA (inhA-15→T) می‌باشد. وجود دو باند ۱۷۴ bp و ۲۴۸ bp نشان دهنده الی موتانت (inhA-15C→T) است (شکل ۳). از ۹۰ نمونه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، فراوانی جهش در لوکوس (-15C→T) inhA نمونه‌های MDR و Non MDR به ترتیب ۲۰٪ و ۱۶٪ بود.

از میان ۹۰ ایزوله مایکوباکتریوم توبرکلوزیس ۳۸ ایزوله حساس به ایزونیازید و ۵۲ ایزوله مقاوم به ایزونیازید بود. از ۵۲ ایزوله مقاوم به ایزونیازید ۱۸ (۳۴/۷٪) ایزوله فنوتیپ Thr 315 (الگوی C, D) را نشان دادند. بقیه ۳۴ (۶۵/۴٪) ایزوله مقاوم، فنوتیپ Ser 315 (الگوی A, B) را نشان دادند. فنوتیپ Thr 315 ۱۰٪ اختصاصیت برای مقاومت به ایزونیازید دارد. Arg 463 و Leu 463 در ۵/۶۰٪ و ۳۹/۵٪ به ترتیب از ایزوله‌های مقاوم تشخیص داده شد.



شکل ۳: الکتروفورز قطعه ۲۴۸bp و ۱۷۴ bp
ستون ۱، H37RV و ستونهای ۲ و ۵ عدم موتاسیون و ستونهای ۳ و ۴ دارای موتاسیون در لوکوس
inhA(-15C → T)، مارکر ۱۰۰ b

بنابراین ظهور سویه‌های مقاوم به هر کدام از این دو دارو شرایط دشواری را به همراه خواهد داشت زیرا تنها چند داروی محدود دیگر با عوارض جانبی زیاد و اثرات به مراتب کمتر باقی می‌ماند. همچنین عدم درمان یک بیمار مبتلا به سل مقاوم به چند دارو با انتقال عفونت به اطرافیان باعث انتشار این نوع سل می‌شود. با مقایسه هزینه، طول مدت درمان و اثر بخشی رژیم‌های درمانی

بحث

بعثت گسترش روز افزون سل مقاوم به دارو، فراهم نمودن روشهایی برای تعیین میزان حساسیت سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به دارو امری ضروری به نظر می‌رسد. دو داروی ریفامپین و ایزونیازید بیشترین خاصیت ضد سلی را دارا هستند و در خلال دو ماه اول درمان بیش از ۹۹٪ باسیلهای سل را نابود می‌کنند.

(۵۴/۵٪) نسبت به اسیدامینه آرژنین (۴۵/۵٪) غالب می‌باشد.

در نتیجه جهش S315T KatG می‌تواند بعنوان یک نشانگر قابل اطمینان برای جداسازی مقاومت به ایزونیاژید در ایزوله‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در آزمون PCR-RFLP بکار رود. محدوده درصد فراوانی جهش‌های گزارش شده بسیار وسیع است: به طوری که برای KatG محدوده ۳۹/۴ تا ۹۱/۳ درصد، برای پروموتور inhA محدوده ۴/۳ تا ۳۴/۴ درصد گزارش شده است (۱۹).

در مطالعه حاضر جهش در ژن KatG بیشترین مقدار را به خود اختصاص داده است که مشابه با تحقیقات انجام گرفته در این زمینه می‌باشد. در مطالعه‌ای که در سال ۱۳۸۵ در ایران انجام گرفت، فراوانی جهش در کدون ۳۱۵ ژن KatG(Ser→Thr) با استفاده از روش PCR-RFLP، ۷۱/۹ درصد گزارش شده است. اختلاف موجود با مطالعه حاضر می‌تواند به علت متفاوت بودن نمونه‌های مورد بررسی در مقاطع زمانی و مکانی خاص باشد. در تحقیق دیگری که در چین انجام گرفته ۵۱ درصد از مقاومت‌های مربوط به ایزونیاژید توسط این روش شناسایی شده است که مشابه نتایج مطالعه حاضر می‌باشد. در مطالعه‌ای که توسط Maxin Caws و همکاران انجام شد، ۸۰ درصد از مقاومت‌های مربوط به کدون ۳۱۵ در KatG شناسایی شدند. درصد پایین در مطالعه حاضر نسبت به این مطالعه می‌تواند به این علت باشد که در مطالعه ما، تنها جانشینی Ser → Thr بررسی شده است. بعد از ژن KatG ژن پروموتور inhA دومین ناحیه از نظر موتاسیون در این مطالعه بود، همه جهش‌هایی که در ناحیه تنظیمی از اپرون mab-inhA با یک تغییر از C به T در ناحیه تنظیمی ۱۵ اتفاق می‌افتد،

موجود میان یک بیمار مبتلا به سل حساس به دارو و یک بیمار مبتلا به سل مقاوم به چند دارو می‌توان به ضرورت پیشگیری از بروز این نوع سل پی برد. ارزیابی تعداد محدودی از کدون‌های ژن در ژنوم مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به ویژه در مناطقی در جهان با شیوع بالای سل، مقاومت اکثریت استرین‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس را بصورت قابل اطمینانی پیش‌بینی می‌کند (۱۵). بیشتر محققین شایعترین و مهمترین جهش‌های ژنتیکی را که در سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس اتفاق می‌افتد، جانشینی اسید آمینه سرین با تره اونین می‌دانند که در کدون ۳۱۵ ژن KatG اتفاق می‌افتد (۱۶). روشهای توصیف شده برای شناسائی تغییرات کدون KatG315 شامل سکوانسنگ DNA (۱۳ و ۱۶ و ۸) SSCP (۱۷) و آزمونهای RFLP (۱۸) که برای همه جهش‌های KatG استفاده می‌شود و دات بلات هیبریداسیون (۱۵ و ۵) می‌باشد. اما بایستی توجه کرد که استفاده از آنالیز SSCP برای غربالگری جهش‌های KatG در یک مورد شکست خورده و آن شناسائی جهش S315T به علت جایگاه نامناسب پرایمرهای PCR می‌باشد که نتیجه آن عدم شناسائی این جهش رایج است (۱۶). جفت پرایمرهای دیگری برای تکثیر ناحیه بزرگی از KatG استفاده شده‌اند که قادر به شناسائی همزمان جهش‌ها در کدون KatG ۳۱۵ و ۴۶۳ بوسیله آنالیز PCR-RFLP می‌باشد (۱۷). این تغییرات ایجاد شده در کدون ۴۶۳ که یک پلی مرفیسم طبیعی غیر وابسته به مقاومت ایزونیاژید است مسئله‌ای پذیرفته شده است (۱۸). بر اساس مطالعات گذشته در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس جدا شده در منطقه چین جنوبی، لوسین ۴۶۳ و در جهان غرب میزان آرژنین ۴۶۳ غالب است (۱۰). در مطالعه حاضر اسیدامینه لوسین

منجر به مقاومت به ایزونیاژید می‌شوند (۲۰). در مطالعه حاضر موتاسیون در این ناحیه ۱۸/۳٪ بود که مشابه نتایج بدست آمده در تحقیق خانم دوستدار و همکاران می‌باشد (۲۱). دو ژن دیگر که در مقاومت ایزونیاژید تأثیر دارد شامل: ژن KasA که کدکننده بتا کتواسیل - Acp - سنتتاز و ناحیه تنظیمی ژن ahpC، که کدکننده الکیل هیدرو پراکسیداز است. جهش در این ژنها به نظر می‌رسد یک مکانیسم تکمیلی در مقاومت هستند و نیاز به تحقیقات بیشتری دارند (۲۲).

نتیجه‌گیری

با توجه به موارد مذکور معرفی آزمایش غربالگری مناسب برای بررسی سویه‌های مقاوم ایزونیاژید ضروری به نظر می‌رسد. با استفاده از روش PCR-RFLP (آنزیم MSPI) و MAS PCR جهش‌های ایجاد شده در ناحیه

۳۱۵ ژن KatG و ناحیه پروموتور inhA شناسایی می‌شوند. این روش‌ها علاوه بر سادگی و ارزان بودن نسبت به روش‌های دیگر در مدت زمان کمتری نتایج دقیق و مطمئنی را فراهم می‌آورند. بدین ترتیب ارائه روشی مناسب و سریع برای شناسایی چنین مقاومت‌هایی، باعث کاهش تولید و انتشار سویه‌های مقاوم به دارو می‌شود.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از همکاری مرکز تحقیقات میکوباکتریولوژی آزمایشگاه رفرانس سل کشوری واقع در بیمارستان مسیح دانشوری جهت فراهم نمودن منابع مالی و همچنین از پرسنل این مرکز به خاطر کمک‌های آزمایشگاهی روتین تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

1. Cheng X, Zhang J, Yang L, Xu X, Liu J, Yu W, and et al. A new multi-PCR-SSCP assay for simultaneous detection of isoniazid and rifampin resistance in mycobacterium tuberculosis. *Journal of Microbiological Methods* 2007; 70: 301-305.
2. Soo-Young K, Yeon-Joon P, Eunsil S, Hyunjung J, Cheolmin K. Evaluation of the CombiChip mycobacteriaki drug-resistance detection DNA chip for identifying mutations associated with resistance to isoniazid and rifampin in mycobacterium tuberculosis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2006; 54: 203-210.
3. Doustdar F. High frequency of mutations in the rpoB gene in rifampicin-resistant clinical isolates of mycobacterium tuberculosis from Iran. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2007; 2542: 2.
4. Mirsaeidi MS, Tabarsi P, Farnia P, Ebrahimi G. Trends of drug resistant mycobacterium tuberculosis in a tertiary tuberculosis center in Iran. *Saudi Med. J*, 2007; 28: 544-50.
5. Limeschenko E, Tsalaki X, Jian M, Qian G. 2008. *Hand book of TB*, New York City, Wiley. 2008. p. 610-616.
6. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Lowrie D, Cole S, Colston MJ, and et al. Detection of rifampicin-resistance mutations in Mycobacterium tuberculosis. *Lancet* 1993; 341: 647-650.
7. Piatek AS, Telenti A, Murray MR, El-Hajj H, Jacobs WR Jr, Kramer FR and et al. Genotypic analysis of mycobacterium tuberculosis in two distinct populations using molecular beacons: implication for rapid susceptibility testing. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 103-110.
8. Tavakoli A, Safaee HG, Navvabakbar F, Salehi M, Bahremand A, Isfahani BN. Mutations in the rpoB gene of rifampin resistant mycobacterium tuberculosis isolated from Isfahan by PCR-SSCP. *J Sci* 2005; 16: 131-8.

9. Tavakoli A, Mohajeri P, Shojai H, Yazdani R, Moghim Sh, Nasr Isfahani B. Study of mutation associated with isoniazid-resistance in clinical mycobacterium tuberculosis strains, Tehran and Isfahan province tuberculosis centers by PCR and RFLP-based technique. *Journal of Kerman University of medical science*, 2004, 11: 266-276.
10. Tung-Yiu Leung, Kai-Man Kam, Agatha Chiu, Pak-Leung Ho, Wing-Hong Seto, Kwok-Yung Yuen, and et al. Detection of katG Ser315Thr substitution in respiratory specimens from patients with isoniazid-resistant mycobacterium tuberculosis using PCR-RFLP. *Journal of Medical Microbiology* 2003; 52: 999-1003.
11. Asgharzadeh M, Jahantabi AR, Shahbabian K, Nahaei MR, Rafi A. Detection of ethambutol-resistant mycobacterium tuberculosis strains by MAS-PCR method and comparison with proportion. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences* 2007; 57: 50-56.
12. Caws M, Quang D, Minh Duy P, Thi Ngoc Lan N. PCR- Restriction fragment length polymorphism for rapid, low-cost identification of isoniazid-resistant mycobacterium tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology* 2007; 45: 1789-1793.
13. Ramazanzadeh R, Amirmozafari N, Farnia P, Ghazi F. Genotyping of mycobacterium tuberculosis isolates from TB patients with spoligotyping. *Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Science* 2006; 11: 50-59.
14. Amaro A, Duarte E, Amado A, Ferronha H and Botelho A. Comparison of three DNA extraction methods for mycobacterium bovis, mycobacterium tuberculosis and mycobacterium avium subsp avium. *Letters in Applied Microbiology* 2008; 8-11.
15. Pretorius GS, van Helden PD, Sirgel F, Eisenach KD, Victor TC. Mutations in katG gene sequences in isoniazid-resistant clinical isolates of mycobacterium tuberculosis are rare. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 2276-2281.
16. Temesgen Z, Satoh K, Uhl JR, Kline BC, Cockerill III FR. Use of polymerase chain reaction single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) analysis to detect a point mutation in the catalase-peroxidase gene (katG) of mycobacterium tuberculosis. *Mol Cell Probes* 1997; 11: 59-63.
17. Haas WH, Schilke K, Brand J, Amthor B, Weyer K, Fourie RB, and et al. Molecular analysis of katG gene mutations in strains of mycobacterium tuberculosis complex from Africa. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41:1601-1603.
18. Centers for Disease Control and Prevention. Estimates of future global tuberculosis. *MMWR Morb WKIY REP* 1993. p. 42-49.
19. Torres MJ, Criado A, Gonzalez N, Palomares JC, Aznar J. Rifampin and isoniazid resistance associated Mutation in mycobacterium tuberculosis clinical isolates in Seville, Spain. *Int J Tuber Lung Dis* 2002; 6: 160-3.
20. Raviglione MC, Smith IM. XDR Tuberculosis-implications for global public health. *New Engl J Med* 2007; 356: 356-359.
21. Doustdar F, Dokht Khosravi A, Farnia F, Masjedi M, Velayati A. Molecular analysis of isoniazid resistance in different genotypes of mycobacterium tuberculosis isolates from Iran. *Microbial Drug Resistance* 2008; 14: 273-277.
22. Escalante P, Ramaswamy S, Sanabria H, Soini H, Pan X, Valiente-Castillo O, and et al. Genotypic characterization of drug-resistant mycobacterium tuberculosis isolates from Peru. *Tuber Lung Dis* 1998; 79: 111-113.