تشخیص سریع مقاومت به ایزونیازید در سویه های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس ایزوله شده از بیماران استان آذر بایجان شرقی با روش مولکولی PCR-RFLP

سجاد زمانلو[۱]، صفر فرج نیا[۲،۴]*، رضا مودب[۳،۵]، محمد تقی اخی[۱]

[۱] گروه میکروبشناسی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز ، ایران. [۲] مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز ، ایران. [۳] مرکز تحقیقات سل و ریه، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز ، ایران. [۴] مرکز تحقیقات کاربردی داروئی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز ، ایران. [۵] دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز ، ایران.

تاریخ دریافت: ۸۷/۱۰/۲۶ ، تاریخ پذیرش: ۸۸/۳/۱۶

Rapid diagnosis of Isoniazid resistant Mycobacterium Tuberculosis, isolated from East Azerbaijanian patients by PCR-RFLP method

Zamanlou S.[1], Farajnia S. [2, 4]*, Moadab R [3,5], Akhi M.T.[1]

[1]Department of Microbiology, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran. [2] Biotechnology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran. [3]Tuberculosis and lung Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran. [4]Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran. [5]Paramedical Faculty, Tabriz university of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

Received: 15 Jan. 2009, Accepted: 6 May 2009

Objectives: The efforts on control of tuberculosis have been encountered with serious problems by emergence of drug resistant Mycobacterium Tuberculosis (MT), and rapid diagnosis of resistance can play an essential role in control and prevention of the disease. Isoniazid is a first line drug in treatment of TB and development of resistance against this drug are increasingly reported. In this study, rapid diagnosis of Isoniazid resistant MT was investigated by PCR-RFLP method. **Methods:** A total of 25 Isoniazid - resistant and 25 Isoniazid - susceptible MT isolated at Tuberculosis and lung disease research center were screened for Isoniazid resistance. In the first step MIC of isolates to INH was determined by proportion method. After that, genomic DNA was extracted from all isolates and a fragment of Kat G gene was amplified by PCR using specific primers. Screening for mutation on Ser 315 and Arg 463 codons in the Kat G gene was carried out by digestion of PCR product with restriction enzyme Msp I. **Results:** Among 25 INH- resistant isolates, 14 isolates (56%) had mutation in Ser315 locus and 5 isolates (20%) showed mutation in Arg 463 locus, whereas 6 strains (24%) didn't show any mutation in these codons. Mutation in both 315 and 463 codons were not found in any isolates. In the susceptible isolates, no any mutation was detected in the studied codons. **Conclusion:** The results of this study indicated that PCR-RFLP method is able to detect resistance to INH in 76% cases and so, it can be used for rapid diagnosis of Isoniazid resistant MT isolates.

Keywords: *Mycobacterium Tuberculosis, Isoniazid, Kat G gene, PCR-RFLP.*

زمینه و هدف: ظهور سویه های مقاوم به دارو کنترل بیماری سل را با مشکلات جدی همراه کرده و شناسایی سریع مقاومت می تواند نقش مهمی در کنترل انتشار بیماری سل ایفا نماید. ایزونیازید یکی از داروهای کلیدی جهت درمان بیماری سل بوده و بروز مقاومت به آن بصورت فزاینده ای گزارش میشود. در مطالعه حاضر ارزش تشخیصی روش PCR-RFLP در شناسایی سریع مقاومت سویه های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس نسبت به ایزونیازید مورد بررسی قرار گرفته است. **روشها:** تعداد ۲۵ سویه مقاوم و ۲۵ سویه حساس به ایزونیازید مایکوباکتریوم توبرکلوزیس ایزوله شده در مرکز تحقیقات سل و بیماریهای ریوی تبریز مورد بررسی قرار گرفت. تعیین MIC نسبت به ایزونیازید به روش proportion انجام شد سپس جهت بررسی وجود موتاسیون در ژن katG ، DNA ژنومی ایزوله ها استخراج گردیده و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تکثیر ژن katG انجام شد. در مرحله بعد با استفاده از برش آنزیمی محصولات PCR با آنزیم MspI وجود موتاسیون در جایگاههای Ser 315 و Arg 463 مورد بررسی قرار گرفت. **یافته ها:** از مجموع ۲۵ سویه مقاوم مورد بررسی، در ۱۴ سویه (۵۶٪) موتاسیون در جایگاه Ser 315 و در ۵ سویه (۲۰٪) موتاسیون در جایگاه Arg 463 مشاهده گردید. ۶ سویه مقاوم (۲۴٪) فاقد موتاسیون در جایگاههای فوق بودند. سویه ای که بطور همزمان دارای هر دو نوع موتاسیون در کدون های ۴۶۳ و۳۱۵ باشد در این مطالعه مشاهده نشد. در هیچکدام از ۲۵ سویه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس حساس به ایزونیازید موتاسیون در جایـــــگاه های مورد بررسی مشاهده نشد. **نتیجه گیری:** نتایج مطالعه حاضر نشان می دهد که روشPCR-RFLP قادر به شناسایی مقاومت به ایزونیازید در ۷۶٪ موارد بوده و می تواند جهت تشخیص سریع مقاومت به ایزونیازید در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مورد استفاده قرار گیرد.

واژه های کلیدی: *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، ایزونیازید، ژن katG ، PCR-RFLP.*

*نویسنده مسئول: صفر فرج نیا، استادیار، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران، تلفن: ۳۳۶۳۲۳۴-۰۴۱۱، نـــمابر: ۳۳۶۳۲۳۱-۰۴۱۱

**Corresponding Author: Safar Farajnia,, Assistant professor of Biotechnology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran. Tel: +98-411-3363234; Fax: +98-411-3363231; E-mail: farajnias@tbzmed.ac.ir*

Archive of SID

www.SID.ir

۱- مقدمه

بیماری سل (TB: Tuberculosis) یکی از علل اصلی مرگ و میر در دنیای امروز می باشد به طوری که در هر ثانیه یک نفر به باسیل سل آلوده می شود. در حال حاضر یک سوم جمعیت جهان به مایکوباکتریوم توبرکلوزیس آلوده بوده و سالانه ۸ میلیون مورد جدید سلی به موارد بیماری اضافه می شود(۲،۱). براساس گزارش سازمان جهانی بهداشت در ژوئن سال ۲۰۰۵ میلادی شیوع توبرکلوزیس در ایران ۳۷ مورد در هر صد هزار نفر جمعیت بوده و مرگ و میر ناشی از آن ۳/۳ در هر صد هزار نفر در سال است(۳). این بیماری در اثر باکتریهای کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس ایجاد میشود. که از میان آنها مایکوباکتریوم توبرکلوزیس عامل اکثریت موارد بیماری می باشد (۴).

امروزه سویه های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به دارو(DR-TB) و یا مقاوم به چندین دارو (MDR-TB) بعلت ناکافی بودن برنامه های کنترل سل و استفاده نامنظم از داروهای ضد سلی درحال افزایش است(۵). لذا تشخیص سریع مقاومت داروئی برای جلوگیری از انتشار باکتریهای مقاوم به دارو یک راهکار مهم در کنترل بیماری می باشد.

مکانیسمهای مقاومت دارویی در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، اساس و پایه کروموزومی دارد(۶) و اغلب ناشی از جهشهایی است که در ژنوم باکتری رخ می دهد. این مقاومت می تواند به نسلهای بعدی باکتری نیز منتقل شود(۸،۷). ایزونیازید (INH) یکی از عوامل شیمی درمانی رده اول و همچنین پروفیلاکتیک موثر بر علیه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس میباشد(۹). تصور میشود که ایزونیازید بعنوان یک پیش دارو با مکانیسم انتشار غیر فعال وارد مایکوباکتریوم توبرکلوزیس میشود و سپس توسط آنزیم کاتالاز- پراکسیداز که توسط ژن katG کد میشود، رادیکالهای آزاد تولید میکند که به چندین هدف در سلول باکتری حمله میکنند(۱۰،۹). مقاومت نسبت به ایزونیازید با طیفی از موتاسیون ها مرتبط است اما مهمترین مکانیسم مقاومت موتاسیون در ژن katG می باشد. هر چند موتاسیون در برخی از ژنهای دیگر نظیر ژنهای inhA ، aphC، kasA و ژن ndh در موارد محدودی از مقاومتها نقش ایفا می کنند(۱۱).

ژن katG آنزیم کاتالاز- پراکسیداز را کد می کند و این آنزیم داروی ایزونیازید را به شکل فعال تبدیل می نماید. موتاسیون در ژن katG منجر به کاهش فعالیت و یا از دست دادن فعالیت آنزیم کاتالاز- پراکسیداز گردیده و به این طریق موجب مقاومت به ایزونیازید می گردد(۱۲). شناسایی مقاومت به ایزونیازید بصورت معمول با روش فنوتیپی نسبی (proportional) انجام میگیرد اما این روش بسیار وقتگیر بوده و حداقل به ۶-۳ هفته وقت نیاز دارد. اخیرا جهشهای مرتبط با ژن katG شناسایی گردیده و امکان شناسایی مقاومت با روش های مولکولی امکانپذیر گردیده است. با این روشها زمان شناسایی سویه های مقاوم به چند ساعت تقلیل می یابد (۱۳) اما میزان شیوع این موتاسیونها در نواحی مختلف دنیا متفاوت می باشد. هدف مطالعه حاضر استفاده از روش PCR-RFLP جهت شناسایی سریع مقاومت به ایزونیازید در ایزوله های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس جدا شده از بیماران مبتلا به سل در استان آذربایجانشرقی بوده است.

۲- مواد و روشها

۲-۱: نمونه گیری و شناسایی ایزوله ها

نمونه های مورد مطالعه در این تحقیق ایزوله های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس جدا شده از بیماران مراجعه کننده به مرکز تحقیقات سل و ریه تبریز از تاریخ فروردین ۸۴ الی اسفند ۸۶ بود. حجم نمونه مورد مطالعه شامل تعداد ۵۰ سویه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بوده که از نمونه های بالینی مختلف نظیر خلط، مایع برونش، لاواژ معده، ادرار و ... ایزوله شده بودند و با روش نسبی تعداد ۲۵ سویه حساس و ۲۵ سویه مقاوم به ایزونیازید تعیین گردیدند.

تمامی ایزوله ها با استفاده از تستها و روش های استاندارد میکروب شناسی که شامل بررسی مورفولوژی کلنی ها، تولید و یا عدم تولید پیگمان، رنگ آمیزی به روش ذیل نلسون، میزان رشد بر روی محیط لونشتاین جانسون، تولید نیاسین، آزمایش کاتالاز و احیای نیترات تحت عنوان مایکوباکتریوم توبرکلوزیس تعیین هویت شدند(۱۴،۱۵). تعیین حساسیت داروئی سویه های *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* مقاوم و حساس به ایزونیازید با روش نسبی (Proportion method) انجام گردید.(۱۶،۱۷).

۲-۲: استخراج DNA

از کلنی های رشد کرده مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بر روی محیط لونشتاین جانسون در بافر TE سوسپانسیون تهیه کرده و سپس در حرارت ۸۰ درجه به مدت ۴۰ دقیقه غیر فعال شدند. در مرحله بعد DNA باکتری های حساس و مقاوم به ایزونیازید با روش SDS و proteinase K

Archive of SID

www.SID.ir

استخراج گردید(۱۸،۱۹). برای این منظور بر روی ۳۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی غیر فعال شده مقدار۴۰ میکرولیتر از محلول ۱۰٪ SDS و ۱۰ میکرولیتر از محلول proteinase K اضافه گردیده و مدت ۱۲ ساعت در دمای ۴۰ دقیقه انکوبه گردید. سپس بر روی آن مقدار ۴۰۰ میکرولیتر از مخلوط فنل-کلروفرم (۱:۱) اضافه گردیده پس از مخلوط گردیدن بمدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ گردید. DNA موجود در فاز روئی با اتانل ۱۰۰٪ رسوب داده شده و پس از شستشو با الکل ۷۰٪ و خشک شدن در آب مقطر حل گردید.

۳-۲: انجام PCR-RFLP

به منظور بررسی وجود موتاسیون در ژن katG ، DNA استخراج شده به همراه پرایمرهای اختصاصی:

KatG904: 5' –AGCTCGTATGGCACCGGAAC –'3 و

KatG1523: 5'-TTGACCTCCCACCCGACTTG-3'

در واکنش PCR وارد گردیده و تکثیر بخش مورد نظر از ژن مذکور در دستگاه ترمال سایکلر انجام شد(۲۰،۲۱). برنامه واکنش PCR به ترتیب زیر بود:

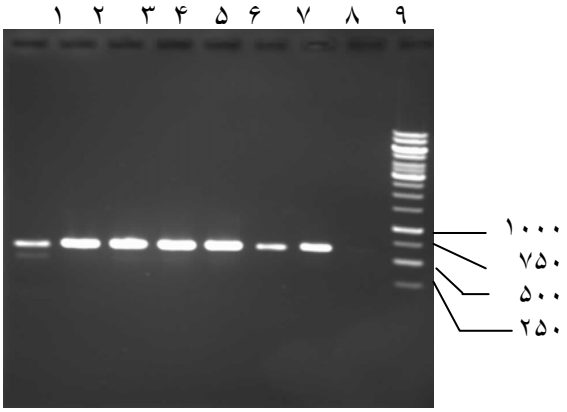
۱- دناتوراسیون اولیه در ۹۴ °C به مدت ۴ دقیقه ؛ ۲- سیکل اصلی با ۳۵ بار تکرار شامل: دناتوراسیون در ۹۴ °C به مدت ۱ دقیقه ، اتصال پرایمرها در ۶۳°C به مدت ۱ دقیقه ، تکثیر در ۷۲ °C به مدت ۴۵ ثانیه و ۳- تکثیر نهائی در ۷۲ °C به مدت ۵ دقیقه. جهت شناسائی موتاسیون های موجود در ژن KatG، و به منظور تشخیص سویه های حساس از سویه های مقاوم به ایزونیازید، محصول PCR با آنزیم محدودالاثر MspI برش داده شد. برای این منظور درون یک میکروتیوب به مقدار۷ میکرولیتر آب مقطر، ۲ میکرولیتر از بافر آنزیم، ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR و در نهایت ۱ میکرولیتر از آنزیم محدودالاثر MspI ریخته و پس از مخلوط کردن به مدت ۳ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند.

در مرحله آخر تمام محتویات میکروتیوب(۲۰ میکرولیتر) در ژل آگاروز ۲/۵٪ با ولتاژ پائین (۷۰ ولت) به مدت ۳ ساعت الکتروفورز شدند. پس از انجام الکتروفورز ژل ها با محلول اتیدیوم بروماید ۰/۵ µg/ml به مدت ۱۰-۵ دقیقه رنگ آمیزی و سپس در دستگاه Gel Document باندهای مربوطه مشاهده و عکس برداری شد.

۳- نتایج

۳-۱: تکثیر ژن katG با PCR

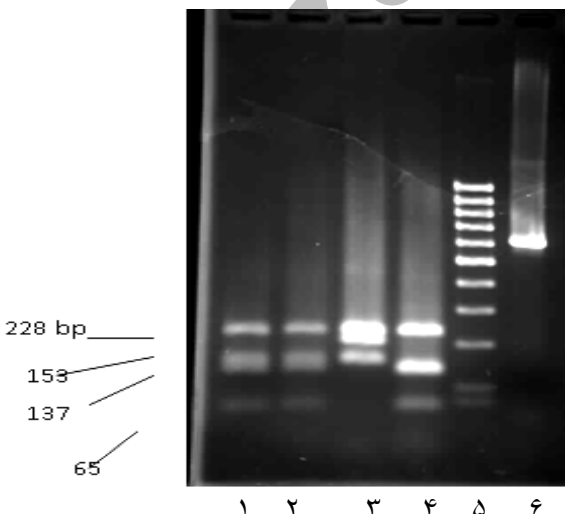
تکثیر قطعه مورد نظراز ژن katG با PCR در همه سویه ها مثبت بوده و منجر به تولید محصول در اندازه مورد انتظار گردید که در الکتروفورز بر روی ژل آگارز بصورت باندی در محدوده ۶۱۹ bp نمایان گردید. محصول PCR به همراه کنترل منفی و سایز مارکر مربوطه در ژل آگاروز ۱٪ الکتروفورز گردیده و پس از رنگ آمیزی با محلول اتیدیوم بروماید نتایج حاصله با دستگاه Gel Documentation بررسی و تصویر مربوطه چاپ گردید. تصویر شماره ۱ نمونه ای از ژل آگارز حاوی محصولات PCR مربوط بهقطعه مورد نظر از ژنkatG را نشان میدهد.



شکل ۱. الکتروفورز محصول PCR حاصل از تکثیر قطعه مورد نظر از ژن katG درایزوله های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس

ستون ۳-۱. ایزوله های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به ایزونیازید؛ ستون ۶-۴ : ایزوله های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس حساس به ایزونیازید؛ ستون ۷: سویه استاندارد مایکوباکتریوم توبرکلوزیس$H_{37}Rv$ ؛ ستون ۸ : کنترل منفی (فاقد DNA)؛

ستون ۹. سایز مارکر 1Kb



شکل ۲. نتایج برش آنزیمی ژن katG با استفاده از آنزیم MspI

ستونهای اول و دوم. سویه های حساس به ایزونیازید؛ ستون سوم : سویه مقاوم به ایزونیازید از تیپS-315-T ؛

Archive of SID

www.SID.ir

ستون چهارم. سویه مقاوم به ایزونیازید از تیپR-463-L ؛ ستون شماره پنج: سایز مارکر؛

۲-۳: هضم آنزیمی محصولات PCR

پس از تکثیر قطعه ژن katG در ایزوله های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مورد بررسی با روش PCR، جهت بررسی وجود موتاسیون در ژن مذکور، محصول PCR با استفاده از کیت تخلیص محصول PCR خالص سازی گردیده و بوسیله آنزیم محدودالاثر MspI برش داده شد. بعنوان کنترل از سوش استاندارد مایکوباکتریوم توبرکلوزیس $H_{37}Rv$ استفاده شد.

در مطالعه حاضر پس از برش آنزیمی محصول PCR ژن katG در ایزوله های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مورد بررسی نتایج زیر بدست آمد:

از مجموع ۲۵ سویه مقاوم به ایزونیازید، چهارده سویه (۵۶٪) موتاسیون در کدون ۳۱۵ و پنج سویه(۲۰٪) موتاسیون در کدون ۴۶۳ را نشان دادند. در شش سویه مقاوم (۲۴٪) هیچگونه موتاسیونی در جایگاههای مورد بررسی مشاهده نشد.

همچنین سویه ای که بطور همزمان دارای هر دو نوع موتاسیون در کدون های ۴۶۳ و۳۱۵ باشد در این مطالعه مشاهده نگردید. در هیچکدام از ۲۵ سویه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس حساس به ایزونیازید مورد بررسی موتاسیون در جایگاه های مورد بررسی مشاهده نشد.

۴- بحث

علیرغم پیشرفتهای اخیر در روشهای جهانی کنترل و پیشگیری بیماریهای عفونی، بیماری سل همچنان بعنوان یک معضل عمده بهداشتی در اکثر کشورهای در حال توسعه باقی مانده و تعداد کلی موارد جدید این بیماری هنوز هم به صورت تدریجی در حال افزایش است. برآورد شده است که در سال ۲۰۰۵ تعداد موارد جدید بیماری بالغ بر ۸/۸ میلیون نفر بوده که از این تعداد ۷/۴ میلیون نفر در آسیا و نواحی صحرائی آفریقا زندگی می کنند. ظهور و گسترش سویه های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به دارو ، بخصوص سویه های MDR یک تهدید جدی برای کنترل بیماری سل بوده و از علل افزایش مشکلات بهداشـــت عمومی می باشد. بیمارانی که با سویه های MDR-TB (سویه های مقاوم به ریفامپین و ایزونیازید) آلوده شده اند به سختی درمان می شوند و احتمالا" در مقایسه با بیمارانی که با سویه های حساس

ستون شماره شش. قطعه تکثیر یافته ژن katG قبل از برش با آنزیم MspI.

آلوده شده اند، به مدت طولانی بعنوان منبع عفونت باقی می مانند(۲۲). لذا تشخیص سریع و ریشه کنی عفونت میتواند نقش مهمی در مهار انتشار چنین سویه هایی داشته باشد.

ژنهای متعددی شامل ژنهای katG ، inhA ، aphC و kasA در مقاومت به ایزونیازید دخیل شناخته شده اند که از میان این ژنها، جهشهای ژن katG بویژه در کدون ۳۱۵ (AGC به ACC) که منجر به جایگزینی ترئونین بجای سرین میشود) و کدون ۴۶۳ (CGG به ATG) که منجر به جایگزینی لوسین بجای آرژینین می شود بیشتر با مقاومت به ایزونیازید مرتبط بوده است(۲۵-۲۳،۱۳). در بررسی های مولکولی انجام شده در این مطالعه مشخص شد که ۷۶٪ مایکوباکتریوم توبرکلوزیس های مقاوم به ایزونیازید (که MIC آنها در برابر ایزونیازید با روش نسبی تعیین شده بود) دارای موتاسیون در ژن katG بودند. در صورتی که در ۲۵ سویه مایکو باکتریوم توبرکلوزیس حساس به ایزونیازید هیچگونه موتاسیونی در جایگاههای مورد مطالعه ژن katG مشاهده نشد و الگوی PCR-RFLP آنها مشابه سویه استاندارد $H_{37}Rv$ بود.

نتایج مطالعه حاضر تا حد زیادی با گزارشات ارائه شده از دیگر کشورها سازگاری دارد. در مطالعه ای که توسط Zhang و همکاران (۲۶) در کشور چین انجام شده بود ۸۲ سویه از مجموع ۸۷ سویه مقاوم به ایزونیازید(۹۴/۳٪) واجد موتاسیون در ژن katG بودند که در۶۴/۴٪ (۵۶ سویه از مجموع ۸۲ سویه) موارد موتاسیون روی داده در کدون ۳۱۵ ژن katG بود. در مطالعه ما نیز فراوانی موتاسیون در کدون ۳۱۵ ژن katG ۵۶٪ مشاهده شد. در مطالعه ای که توسط Aslan و همکاران (۲۷) در کشور ترکیه انجام شده بود اکثریت سویه ها دارای موتاسیون در ژن katG بودند و ۷۶/۶٪ موتاسیونها در کدون ۳۱۵ ژن katG بود که نشاندهنده اهمیت این کدون در گسترش مقاومت به ایزونیازید در سویه های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در منطقه مذکور است. Laura و همکاران در سویه های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به ایزونیازید ایزوله شده از بیماران فیلیپینی مشاهده کردند که ۵۹/۲٪ ایزوله ها دارای موتاسیون در کدون ۳۱۵ ژن katG بودند (۲۸). همچنین در مطالعه دیگری که توسط Gonzalez و همکاران (۲۹) در اسپانیا انجام شد در ۵۸٪ از سویه های مقاوم به ایزونیازید وجود موتاسیون در کدون ۳۱۵ ژن katG مشاهده شد. در مطالعه ای که توسط Wei و

Archive of SID

www.SID.ir

همکاران(۳۰) در کشور چین انجام شد میزان موتاسیون در کدون ۳۱۵ ژن katG ۶۰/۶٪ (یعنی ۴۰ سویه از ۶۶ سویه) بود. در مطالعه دیگری که توسط Wu و همکاران (۳۱) در کشور چین انجام شده میزان موتاسیون در ژن یاد شده ۵۶/۶٪ بود که با نتایج بدست آمده از مطالعه ما کاملا" همخوانی دارد. همچنین در مطالعه ای که توسط Telenti و همکاران (۳۲) در کشور سوئیس انجام شده بود بروز موتاسیون در کدون ۳۱۵ ژن katG در۴۶٪ موارد مشاهده گردید.

در تحقیق حاضر ۲۰٪ سویه های مقاوم به ایزونیازید (۵ سویه از مجموع ۲۵ سویه) دارای موتاسیون در کدون ۴۶۳ ژن katG بودند و هیچ یک از ایزوله ها همزمان دارای موتاسیون در کدون های ۴۶۳و۳۱۵ ژن katG نبودند. این یافته با نتایج مطالعات گزارش شده از کشور های دیگر تا حدی همخوانی دارد. در مطالعه ای که توسط Zhang و همکاران انجام شد در ۴۰/۲٪ از سویه های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به ایزونیازید، موتاسیون روی داده در ژن katG مربوط به کدون ۴۶۳ بود(۲۶).

در مطالعه حاضر در ۲۴٪ (۶ سویه از مجموع ۲۵ سویه) از سویه های مقاوم به ایزونیازید هیچگونه موتاسیونی در ژن katG شناسائی نشد. بررسی منابع نشان می دهد که این نتایج با گزارشات ارائه شده از برخی کشورها تشابه زیادی دارد. در مطالعه ای که در کشور فیلیپین انجام گردید ۳۷/۱٪ از سویه های مقاوم مورد مطالعه فاقد موتاسیون در ژن katG بودند(۲۸). در مطالعه انجام یافته توسط Abe و همکاران نیز در ۵۷/۳٪ از سویه های مقاوم به ایزونیازید هیچگونه موتاسیونی در ژن مذکور مشاهده نشده بود. در مطالعه انجام گرفته در کشور لهستان (۳۳) ۳۱٪ سویه های مورد مطالعه فاقد موتاسیون در کدون ۳۱۵ ژن katG بودند. این نتایج نشان می دهند که بروز مقاومت به ایزونیازید در تعدادی از موارد احتمالا با وقوع موتاسیون در ژن های دیگر نظیر لوکوس inhA و یا موتاسیون در سایر جایگـــــاه های ژن katG مرتبط است (۳۴).

۵- نتیجه گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان می دهد که روش PCR-RFLP برای جایگاههای مورد مطالعه می تواند مقاومت به ایزونیازید را در ۷۶٪ موارد در بیماران منطقه شناسایی نماید. هرچند با این روش هنوز ۲۴٪ موارد مقاومت هنوز ناشناخته باقی می ماند اما با توجه به اینکه روش قدیمی proportional نیاز به ۵-۳ هفته وقت نیاز دارد اما روش PCR در حد یک روز می تواند مقاومت را شناسایی نماید لذا این روش از امتیاز بالایی برخوردار است. برای افزایش حساسیت روش مولکولی می توان بررسی جایگاهها و نیز ژنهای دیگر را همزمان با بررسی ژن KatG مد نظر قرار داد.

۶- تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی مرکز تحقیقات سل وبیماریهای ریوی تبریز انجام گردیده و نویسگان مقاله مراتب سپاس خود را از مرکز فوق اعلام میدارند. همچنین نویسندگان مقاله از پرسنل محترم آزمایشگاه مرکز تحقیقات سل و بیماریهای ریوی تبریز و همچنین کادر آزمایشگاه بیولوژی مولکولی مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه علوم پزشکی تبریز بخاطر همکاری بی شائبه شان تشکر و قدردانی می نمایند.

Reference:

1. Macial E.L., Viana M.C., Zeitoune R.C., Ferreira I., Fregona G., Dietze R. Prevalence and incidence of Mycobacterium tuberculosis infection in nursing students in Vitoria, Espirito Santo. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2005, 38(6), 469-72.
2. Dunlap N.E. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2000, 161(4), 1376-95.
3. WHO, Report 2006: Global tuberculosis database; Available from: http://www.who.int/globalatlas/dataquery/default.asp ; accessed 7 August 2008.
4. Gabor J.Y., Patel S., Avendano M. Diagnosis and treatment of tuberculosis. University of Toronto Medical Journal, 2003, 80(2), 106-11.
5. Ghebremichael S., Petersson R., Koivula T., Pennhag A., Romanus V., Berggren I., Petrini B., Hoffner **S.**, Källenius G. Molecular epidemiology of drug-resistant tuberculosis in Sweden. Microbes and Infection, 2008, 10(6), 699-705.
6. Simon S., Listiawan I. Drug resistance in Mycobacterium tuberculosis: a molecular perspective. Journal of the Indonesian Medical Association, 2003, 4(3), 26-35.
7. Goble M., Iseman M.D., Madsen L.A., Waite D., Ackerson L., Horsburgh C.R. Treatment of 171 patients with pulmonary tuberculosis resistant to isoniazid and rifampin. The New England Journal of Medicine, 1993, 328(8), 527-32.
8. Somoskovi A., Parsons L.M., Salfinger M. The molecular basis of resistance to ionized, rifampin and pyrazinamide in Mycobacterium tuberculosis. Respiratory Research, 2001, 2(3), 164- 8.
9. Timmins G.S., Deretic V. Mechanisms of action of isoniazid. Molecular microbiology, 2006, 65(5), 1220-7.

Archive of SID

www.SID.ir

10. Ramaswamy S.V., Reich R., Dou S.J., Jasperse L., Pan X., Wanger A., Quitugua T., Graviss E.A. Single nucleotide polymorphisms in genes associated with isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2003, 47(4), 1241-50.
11. Kim S.Y., Park Y.J., Kim W.I., Lee S.H., Chang C.L., Kang S.J., Kang C.S. Molecular analysis of isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis isolates recovered from South Korea. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2003, 47(3), 497-502.
12. Guo H., Seet Q., Denkin S., Parsons L., Zhang Y. Molecular characterization of isoniazid-resistant isolates of Mycobacterium tuberculosis from the USA. Journal of Medical Microbiology, 2006, 55, 1527-31.
13. 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 Middle East. International Journal of Antimicrobial Agents, 2004, 23, 473- 9.
14. Goodwin A. Mycobacterium tuberculosis and other Nontuberculosis mycobacteria. In: Mahon C.R, Lehman D.C, Manuselis G: Textbook of Diagnostic Microbiology, 3th ed. Saunders Elsevier, New York, 2007, 673-716.
15. Murray P.R., Rosenthal K.S., Pfalle M.A. Medical Microbilogy 5th ed. Elsevier Mosby, USA, 2005, 297-310.
16. Poojary A., Nataraj G., Kanade S., Metha P., Baveja S. Rapid antibiotic susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis: it's utility in resource poor settings. Indian Journal of Medical Microbiolology, 2006, 24(4), 268-72.
17. Uhi J.R., Sandhu G.S., Kline B.C., Cockerill F.R. PCR-RFLP Detection of point mutation in the catalase-peroxidase gene (KatG) of Mycobacterium tuberculosis associated with isoniazid resistance. In: PCR protocols for emerging infectious disease, American Society for Microbiology, Washigton, DC, 1996, 144-149.
18. Kalia A., Rattan A., Chopra P. A method for extraction of high-quality and high-quantity genomic DNA, general applicable to pathogenic bacteria. Analytical Biochemistry, 1999, 275(1), 1-5.
19. Farajnia S., Darbani B., Babaei H., Alimohammadian M.H., Mahboudi F., Gavgani A.M. Development and evaluation of Leishmania infantum rK26 ELISA for serodiagnosis of visceral leishmaniasis in Iran. Parasitology. 2008 Aug;135(9):1035-41.
20. Marttila H.J., Soini H., Huovinen P., Viljanen M.K. katG mutations in isoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates recovered from Finnish patients. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1996, 40(9): 2187-9.
21. Leung E.T., Kam K.M., Chiu A., Ho P.L., Seto W.H., Yuen K.Y., Yam W.C. Detection of KatG Ser315Thr substitution in respiratory specimens from patients with isoniasid-resistant Mycobacterium tuberculosis using PCR-RFLP. Journal of Medical Microbiology, 2003, 52(11), 999-1003.
22. Sekiguchi J.I.,Miyoshi-Akiyama T., Augustynowicz-Kopeć E., Zwolska Z., Krikae F., Toyota E., Kobayashi I., Morita K., Kudo K., Kato S., Kuratsuji T., Mori T., Kirikae T. Detection of multidrug resistance in Mycobacterium tuberculosis. Journal of Clinical Microbiology, 2007, 45(1), 179-92.
23. Zaker Bostanabad S., Titov L.P., Slizen V., Taghikhani M., Bahrmand A. KatG mutation in isoniasid-resistant strains of Mycobacterium tuberculosis isolates from Belarusian patients. Tüberküloz ve Toraks Dergisi, 2007, 55(3), 231-1.
24. Abate G., Hoffner S.E., Thomsen V., Miörner H. Characterization of isoniasid-resistant strains of Mycobacterium tuberculosis on the basis of phenotypic properties and mutation in KatG. Europian Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease, 2001, 20(5), 329-33.
25. Van Soolingen D., de Hass P.E.W., van Doorn H.R., Kuijper E., Rinder H., Borgdorff M. Mutations at amino acid position 315 of the KatG gene are associated with high-level resistance to isoniazid, other drug resistance, and successful transmition of Mycobacterium tuberculosis in the Netherlands. Journal of Infectious Disease, 2000, 182(6), 1788-90.
26. Zhang M., Yue J., Yang Y., Zhang H., Lei J., Jin R., Zhang **X.,** Wang H. Detection of mutation associated with Isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis isolates from China. Journal of Clinical Microbiology, 2005, 43(11), 5477-82.
27. Aslan G., Tezcan S., Serin M.S., Emekdas G. Genotypic analysis of Isoniazid and Rifampin resistance in drug resistant clinical Mycobacterium tuberculosis complex isolates in Southern Turkey. Japanese Journal of Infectious Disease, 2008, 61(4), 255-60.
28. Herrela L., Valverde A., Saiz P., Sáez-Nieto J.A., Portero J.L., Jiménez M.S. Molecular characterization of Isoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosis strains isolated in the Philippines. International Journal of Antimicrobial Agents, 2004, 23(6), 572-6.
29. González N., Torres M.J., Aznar J. Palomares J.C. Molecular analysis of Rifampin and Isoniazid resistance of Mycobacterium tuberculosis clinical isolates in Seville, Spain. Tubercle and Lung Disease, 1997, 79(3), 187-90.
30. Wei-wei J., Igor M., Gui-zhi S., Jia-wen L., Olga N., A-dong S. Molecular characteristic of rifampin and isoniazid resistant Mycobacterium tuberculosis strains from Beijing China. Chinese Medical Journal, 2007, 120(9), 814- 9.
31. Xue-qiong W., Yang L., Jue-Xian Z., Jian-qin L., Hong-min L., Guang-yu Z., Cui-huan L., Bei-chuan D. Detection of the mutation in KatG315 and inhA-15 of Mycobacterium tuberculosis strains from Chinese patients. Chinese Medical Journal, 2006, 119(3), 230-3.
32. Telenti A., Honoré N., Bernasconi C., March J., Ortega A., Heym B., Takiff H.E., Cole S.T. Genotypic assessment of Isoniazid and Rifampin resistance in Mycobacterium tuberculosis: a blind study at reference laboratory level. Journal of Clinical Microbiology, 1997, 35(3), 719-23.
33. Sajduda A., Brzostek A., Poplawska M., Augustynowicz-kopeć E., Zwolska Z., Niemann S., Dziadek J., Hillemann D. Molecular characterization of Rifampin and Isoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosis strains isolated in Poland. Journal of Clinical Microbiology, 2004, 42(6), 2425-31.
34. Abe C., Koboyashi I., Mitarai S., Wada M., Kawabe Y., Takashima T., Suzuki K., Sng L.H., Wang S**.**, Htay H.H., Ogata H. Biological and molecular characterization of Mycobacterium tuberculosis clinical isolates with low-level resistance to Isoniasid in Japan. Journal of Clinical Microbiology, 2008, 46(7), 2263-8.

Archive of SID

www.SID.ir