تشخیص سریع مایکوباکتریوم توبرکولوزیس مقاوم به ریفامپین با استفاده از Real-time PCR

بهناز طاهری[1]، سیامک میراب سمیعی[2،3،4]، مهدی پریان[5]، احسان الله غزنوی راد[6]*

1. دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی پزشکی، گروه بیوتکنولوژی و میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
2. مرکز تحقیقات آزمایشگاهی غذا و دارو، وزارت بهداشت و درمان و آموزش پزشکی، تهران، ایران
3. استادیار، آزمایشگاه مرجع سلامت، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، تهران، ایران
4. بخش آسیب شناسی مولکولی آزمایشگاه بیمارستان دی، تهران، ایران
5. دانشجوی دکترای بیوتکنولوژی پزشکی، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
6. استادیار، گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

تاریخ دریافت: 91/12/15 تاریخ پذیرش: 92/1/28

چکیده

زمینه و هدف: مقاومت دارویی در مایکو باکتریوم توبرکلوزیس یکی از نگرانی‌های جدی می‌باشد که محققان و پزشکان با آن مواجه هستند. شناسایی سریع توبرکلوزیس‌های مقاوم به منظور شروع بی‌درنگ و مناسب درمان با داروهای خط دوم ضروری می‌باشد. این امر منجر به افزایش بازده درمان و جلوگیری موثر از انتقال وگسترش این بیماری مسری خواهد شد. هدف از این مطالعه طراحی روشی مبتنی بر Real-Time PCR جهت تشخیص موتاسیون‌های موجود در ناحیه RRDR ژن rpoB که منجر به مقاومت به ریفامپین در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می‌شوند.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی پرایمر و پروپ توسط نرم افزارهای اختصاصی برای ناحیه RRDR ژن rpoB به منظور شناسایی جهش طراحی شد. برای ارزیابی حساسیت و ویژگی کلینیکی واکنش از نمونه‌های بالینی استفاده شد که پیش از این مقاومت و حساسیت آنها به وسیله تست حساسیت دارویی تناسبی تعیین شده بود.

یافته‌ها: با استفاده از 40 نمونه بالینی(20 سویه حساس و 20 سویه مقاوم) حساسیت پروب استفاده شده برای تشخیص موتاسیون در کدون 526 و 531 معادل100 درصد در نظر گرفته شد. پرایمر و پروب‌های طراحی شده تنها به ناحیه اختصاصی RRDR ژن rpoB مایکوباکتریوم توبرکلوزیس متصل می‌گردند و مطالعات بیوانفورماتیکی هیچ گونه واکنش متقاطعی با ژنوم سایر میکرو ارگانیسم‌ها و انسان نشان ندادند. ویژگی بالینی روش راه اندازی شده به طور تجربی و با بررسی 25 نمونه منفی مورد آزمایش قرار گرفت و معادل 100 درصد در نظر گرفته شد.

نتیجه: روش Real-time PCR راه اندازی شده به علت سرعت و حساسیت بالا می‌تواند به عنوان ابزاری مفید وکارا در تشخیص سریع مایکوباکتریوم‌های مقاوم به ریفامپین در نظر گرفته شود.

واژگان کلیدی: مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، مقاومت به ریفامپین، ژن rpoB، real-time PCR

***نویسنده مسئول**: اراک، دانشگاه علوم پزشکی اراک، دانشکده پزشکی، گروه میکروب شناسی

Email: e.ghaznavirad@arakmu.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

سل یک بیماری مهم به خصوص در کشورهای در حال توسعه است. سازمان جهانی بهداشت تخمین زده است که حدود یک سوم جمعیت جهان آلوده به میکروب سل هستند(با برآورد 9/72 میلیون نفر ابتلا جدید در سال 2007)(1). تنها در همین سال آمار مرگ و میر ناشی از سل 1/77 نفراعلام شده است(2). در حال حاضر مهم‌ترین نگرانی در مورد سل مربوط به پیدایش مقاومت دارویی چندگانه در MTB می‌باشد(3، 4) که به صورت مقاومت به هر دو داروی RIF، INH که مهم‌ترین داروهای خط اول درمان هستند تعریف می‌شود(3).

پیدایش ایدز در اوایل دهه 1980 منجر به گسترش توبرکلوزیس(Tuberculosis- TB) همراه با بروز و ظهور مقاومت به چند دارو– Multidrug) (MDR-MTB resistant tuberculosis شد(5).

تخمین زده می‌شود که 3/2 درصد از موارد جدید ابتلا به سل توسط MDR-MTB ایجاد می‌شود(6، 7). برای درمان سویه‌های مقاوم به درمان ازخط دوم داروهای درمانی استفاده می‌شود که کم اثرتر، سمی‌تر و بسیار گران‌تر از داروهای خط اول می‌باشند(8، 9). تا زمانی که نتایج تست حساسیت در دسترس نباشد درمان بیمار با داروهای خط اول انجام خواهد شد بنابر این تشخیص سریع سویه‌های مقاوم به منظوراجتناب از درمان نامناسب به وسیله داروهای خط اول که عواقبی همچون سمیت، افزایش احتمال انتقال بیماری، شکست درمان و مرگ را دارد ضروری می‌باشد(10). تشخیص زمان بر MTB مقاوم به درمان مهم‌ترین نقش را در انتقال MDR-MTB دارد. دراکثر کشورهای با شیوع بالای TB که عمدتا کشورهای در حال توسعه هستند MDR-MTB تنها زمانی که درمان با داروهای خط اول طول می‌کشد و یافته‌های کلینیکی ناکار آمد بودن درمان را نشان می‌دهد تشخیص داده می‌شود. علاوه بر این تست‌های حساسیت فنوتیپی(DST)که مبتنی بر کشت هستند معمولا زمان بر هستند و به 4-2 ماه زمان نیاز دارند(3). استاندارد طلایی پذیرفته شده جهانی برای تشخیص MDR-MTB کشت باکتری و بررسی رشد در محیط INH,RIF می‌باشد. تست حساسیت دارویی بعد از اطمینان از پاسخ مثبت تست MB صورت می‌گیرد که معمولا حدود 6-3 هفته برای تشخیص اولیه MB به علاوه 3 هفته برای بررسی حساسیت MTB طول می‌کشد. به همین دلیل سازمان جهانی بهداشت به کشورها توصیه می‌کند که هرچه سریع‌تر ظرفیت‌های تشخیصی مبتنی بر متدهای ملکولی که شامل آنالیز مستقیم DNA استخراج شده بدون نیاز به کشت باکتری می‌باشد را جهت تشخیص سریع MDR-MTB افزایش دهند (11، 12). بدین ترتیب زمان لازم برای تشخیص سویه‌های مقاوم کاهش می‌یابد(7). بیشتر سویه‌های مقاوم به RIF دارای یک جهش در ناحیهbp 81 (ناحیه مرکزی rpoB یا RRDR) می‌باشند که قسمتی از ژن rpoB است که زیرواحد β از RNA پلیمراز وابسته به DNA را کد می‌کند (13، 14). RIF از طریق اتصال به این زیر واحد فرایند نسخه برداری را مختل می‌کند(15). ازآن جائی‌که تغییرات هم معنی در ناحیه RRDR غیرمعمول است تشخیص جابه‌جایی هرنوکلئوتید در این منطقه ژنتیکی مارکری برای مقاومت است و جهش‌هایی که دراین ناحیه رخ می‌دهند مسئول 98 درصد از مقاومت به ریفامپسین هستند. بیش از 95 درصد از موتاسیون‌هایmiss sense در ناحیه RRDR بین کدون‌های 533-507 واقع شده اند(15). بیش‌ترین تغییر گزارش شده مربوط به کدون 531(ser—›lue) و 526(His‹—Tyr) و 516(Val‹—Asp) می‌باشد(16، 17) که در قسمت عمده نمونه‌های مقاوم به RIF دیده شده است. روش MIC نشان داده که مقاومت بالای RIF همراه با جهش در کدون 526 [CAC→GAC] و531 [TCG→TTG] است در حالی که تغییر در سایر کدون‌ها مقاومت نسبی ایجاد می‌کنند(15).

با توجه به دقت، سرعت، حساسیت و پتانسیل بالای Real-Time PCR گرایش به این روش برای تشخیص MDR-MTB افزایش یافته به طوری که کیت تشخیصی Xpert MTB/RIF که برای تشخیص سویه‌های

Archive of SID

www.SID.ir

مقاوم MTB توسط سازمان جهانی بهداشت تایید و توصیه شده مبتنی بر Real-Time PCR می‌باشد.

در این مطالعه ما به دنبال طراحی روشی بر اساس Sequence specific Real-Time PCR هستیم تا بر اساس طراحی پروب در برگیرنده کدون 526 و 531 وجود یا عدم وجود جهش در نمونه‌های بالینی و متعاقب آن مقاومت را تعیین کنیم.

مواد و روش‌ها

این پژوهش یک مطالعه تجربی با کد اخلاقی به شماره 8-124-91 می‌باشد.

طراحی پروب و پرایمر: توالی ژن rpoB با شماره دسترسی L27989 و با طول 3519 جفت باز از بانک ژنی NCBI National Center for Biotechnology (Information) تهیه شد، توالی ناحیه rifampcin resistance determinant)RRDR(region)که در محدوده کدون531-507 ژن می‌باشد مشخص شده سپس با استفاده از نرم افزار AlleleId پرایمر و پروپ‌های مناسب طراحی گردید(جدول 1).

پروب حسگر(sensor) به گونه‌ای طراحی شد که هنگام اتصال به DNA الگو دو کدون مورد بررسی را تحت پوشش قرار دهد. همچنین پروب لنگر(anchor) مکمل با ناحیه‌ای فرادست (upstream) پروب حسگر و به فاصله 4 نوکلئوتید از آن طراحی شد. تا در مرحله اتصال(Annealing) واکنش PCR که هر دو پروب به DNA الگو متصل هستند رنگ LC640 به اندازه کافی به رنگ فلورسین نزدیک باشد. به این ترتیب امواج ساطع شده از رنگ فلورسین باعث تحریک رنگ LC640 خواهد شد. با تحریک رنگ LC640 امواجی با طول موج بلندتر از آن بازتابش خواهد شدکه این امواج توسط دستگاه تشخیص داده خواهد شد. یگانه بودن پروب و پرایمرها برای قطعه ژنی مورد نظرتوسط برنامه Blast تایید شد.

جدول 1. توالی پرایمر و پروب‌ها

پرایمر رفت	5'- GAGCGGATGACCACCCAG –3
پرایمر برگشت	-3' GAGCGGATGACCACCCAG -5'
پروب لنگر	TTCATGGACCAGAACAACCCGCTGTCGGT3'-FL-5'
پروب حسگر	LC 640-5'ACCCACAAGCGCCGACTGCTGG p3'

راه اندازی تکنیک: به منظور راه اندازی تکنیک از سه نمونه DNA تعیین توالی شده با روش sequencig، شامل یک نمونه با جهش 526 ویک نمونه با جهش 531 ویک نمونه وحشی فاقد جهش استفاده شد. سپس تکثیر ناحیه RRDR از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمراز توسط دستگاه Light cycler(شرکت رش-آلمان) در حجم 20 میکرولیتر و با استفاده از0/5 میکرومولار از هر پرایمر، 2/ 0میکرومولار از هر یک از پروب‌ها و غلظت 1X از مسترمیکس Light Master plus hybprobe cycler(شرکت رش -المان) انجام شد. به این صورت که ابتدا حرارت 95 درجه سانتی‌گراد به مدت 10 دقیقه برای شروع و فعال سازی آنزیم انتخاب شد. فرایند واسرشتگی(Denaturation) در حرارت 95 درجه سانتی‌گراد در 45 سیکل به مدت 15 ثانیه، اتصال(Annealing) در 55 درجه سانتی‌گراد به مدت 10 ثانیه و بازآرایی(Extension) در 72 درجه سانتی‌گراد به مدت 10 ثانیه انجام گرفت. در هر سیکل در انتهای مرحله اتصال پرایمرها نور ساطع شده از رنگ LC640 توسط دستگاه جمع آوری شده، میزان فلورسنت دریافتی توسط دستگاه افزایش یافته و به صورت نمودار فلورسانت بر حسب زمان نشان داده شد. بعد از آخرین سیکل واکنش برای به دست آوردن دمای منحنی ذوب پروب(Melting curve

Archive of SID

www.SID.ir

temperature) در رابطه با هر نمونه ابتدا دما تا 95 درجه بالا برده شد تا تمام نمونه‌ها واسرشت شوند و سپس به سرعت تا 55 درجه پایین آورده شد تا پروب‌ها به DNA متصل شوند وسپس دما به آهستگی بالا برده شد و تغییرات فلورسانت ناشی از رهایی پروب‌ها به صورت نمودار رسم شد سپس نمودار حاصل از هر نمونه با استفاده از نرم افزار از حالت سیگموئید به صورت منحنی در آمد و به این ترتیب نقطه‌ای که قله(peak) منحنی در آن قرار گرفت نشانگر بیش‌ترین تغییرات فلورسانت به دست آمده و به عبارتی نشانگر Tm پروب هنگام اتصال به آن نمونه بود .

ویژگی آنالیتیک: برای تعیین ویژگی آنالیتیک روش تشخیصی، علاوه بر بررسی صحت اتصال اختصاصی پرایمرها به الگوی مورد نظر در پایگاه nucleotide BLAST NCBI، از چند نمونه ژنوم باکتریایی غیر کمپلکس توبرکلوزیس از قبیل مایکوباکتریوم اویوم، مایکوباکتریوم کانزاسی، مایکوباکتریوم اینتراسلولار، همچنین کلبسیلا پونومونیه، کاندیدا البیکنز، انتروباکتر ائروژنوزا، سالمونلا تیفی، استرپتوکوکوس پیوژنز و نایسریا منتژیتیس استفاده شد.

تعیین حساسیت و حد تشخیص: برای تعیین حد تشخیص واکنش از یک نمونه تخلیص شده با لود بالا استفاده شد. سپس با استفاده از اسپکتروفتومتر غلظت و از طریق دانسیته نوری تعداد ملکول‌های DNA محاسبه گردید. سپس رقت‌های سریالی DNA تهیه شد که معادل 1-104 کپی در میلی‌لیتر بود.

ارزیابی تکنیک: به منظور بررسی تکنیک، از 40 نمونه مقاوم و حساس MTB (مایکوباکتریوم) تایید شده به وسیله کشت و آنتی‌بیوگرام با روش استاندارد استفاده شد. بدین منظور ابتدا باکتری‌ها در دمای 85 درج سانتی‌گراد و به مدت 60 دقیقه توسط دستگاه Thermo block غیر فعال شدند. سپس DNA نمونه‌ها با استفاده از کیت EZ1 virus mini kit(شرکت کیاژن- المان) طبق پروتکل مربوط به نمونه‌های تنفسی و با استفاده از دستگاه Bio-Robot-EZ1 تخلیص شد. واکنش راه اندازی شده PCR برای 40 نمونه DNA حاصل انجام شد. در انتها منحنی ذوب هر نمونه به دست آمد و بر اساس دمای منحنی ذوب مقاوم یا حساس بودن آن تعیین شد. به منظور ارزیابی و تایید صحت نتایج به دست آمده، این نتایج با نتایج اولیه حاصل از کشت و آنتی‌بیوگرام مقایسه شدند. همچنین به منظور تعیین ویژگی کلینیکی روش از 25 نمونه منفی که عدم وجود MTB در آنها با استفاده از روش کشت تایید شده بود این نمونه‌ها از آرشیو بیمارستان دی به دست آمد.

یافته‌ها

در این مطالعه واکنش Real-time راه اندازی شده بر روی 40 نمونه مثبت و منفی MTB انجام شد.

بررسی ویژگی آنالیتیک پرایمر و پروب: توالی پرایمر و پروب‌های طراحی شده با استفاده از نرم افزارNucleotide blast موجود در سایت NCBI به منظور بررسی ویژگی آنالیتیک مورد ارزیابی قرار گرفته و مشخص گردید پرایمر و پروب‌های طراحی شده به توالی‌های اختصاصی ناحیه RRDR ژن rpoB مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و مایکوباکتریوم بوویس که جز کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بوده باعث ایجاد سل می‌گردند، متصل می‌شوند و هیچ گونه واکنش متقاطعی با سایر عوامل مداخله کننده احتمالی وجود ندارد. برای بررسی عملی ویژگی آنالیتیک این روش، از چند نمونه ژنوم باکتریایی از قبیل مایکوباکتریوم غیر کمپلکس توبرکلوزیس شامل مایکوباکتریوم اویوم، مایکوباکتریوم کانراسی، مایکوباکتریوم اینتراسلولار همچنین کلبسیلا پونومونیه، کاندیدا البیکنز، انتروباکتر ائروژنوزا، سالمونلا تیفی، استرپتو کوکوس پیوژنز و نایسریا منتژیتیس استفاده شد که هیچ یک از این پاتوژن‌ها پس از انجام واکنش مربوط به Real-time تکثیر قابل مشاهده نشان نداد که تائیدکننده ویژگی آنالیتیک مناسب این روش می‌باشد.

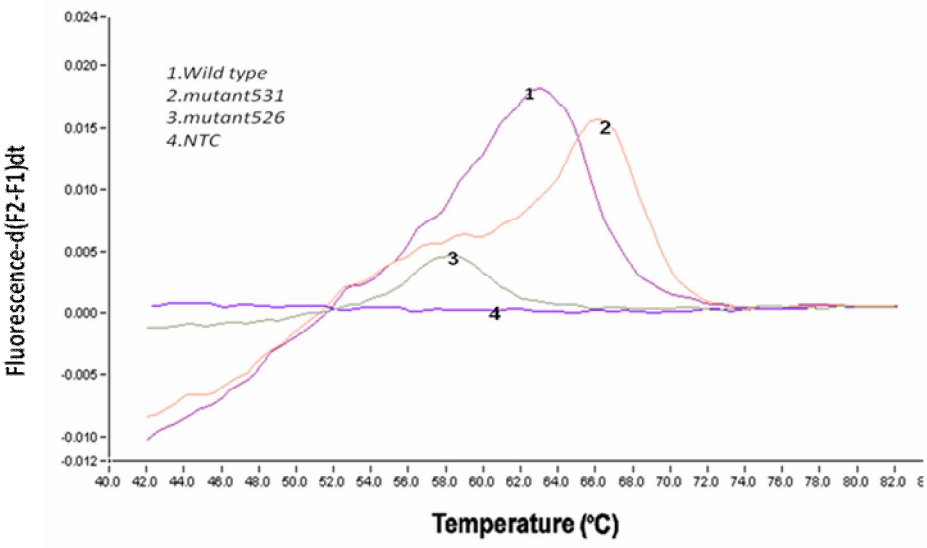
تعیین حد نهایی تشخیص: برای تعیین حد تشخیص از رقت‌های لگاریتمی DNA استفاده شد. رقت‌های لگاریتمی از DNA تهیه شده معادل1-104 کپی

Archive of SID

www.SID.ir

در میلی‌لیتر بود. از هر رقت تهیه شده واکنش در سه روز مختلف و به صورت 8 تکرار انجام شد. حساسیت آنالیتیک روش معادل 1 کپی در میلی‌لیتر تعیین شد.

راه اندازی تکنیک وتعیین دمای ذوب نمونه‌ها: به منظور راه اندازی تکنیک از سه نمونه DNA تعیین توالی شده با روش sequencig، شامل یک نمونه با جهش 526 ویک نمونه با جهش 531 و یک نمونه وحشی فاقد جهش استفاده شد. بر اساس واکنش راه اندازی شده پروب طراحی شده در اتصال به هریک از 3 نمونه دمای ذوب منحصر به فردی نشان داد. به طوری که تفاوت دماکاملا قابل تشخیص بوده و ازآن به عنوان مبنایی برای افتراق سوش حساس، موتان کدون 526 و موتان کدون 531 استفاده شد(شکل1).



شکل 1. منحنی ذوب سویه‌های وحشی، موتانت 526، موتانت 531 و کنترل منفی

ارزیابی روش: واکنش راه اندازی شده Real Time PCR برای 40 DNA نمونه بالینی مثبت و منفی انجام شد. بر اساس اطلاعات اولیه به دست آمده از دمای منحنی ذوب، 20 نمونه مقاوم و نمونه فاقد جهش و در نتیجه حساس تشخیص داده شدند. به منظور ارزیابی و تایید صحت نتایج به دست آمده، این نتایج با نتایج اولیه حاصل از کشت و آنتی بیوگرام مقایسه شدند. نتایج حاصل از تکنیک فوق در تمام موارد منطبق بر نتایج حاصل از کشت بود. در نتیجه حساسیت پروب با اکتفا به این حجم نمونه برای تشخیص سویه‌های مقاوم معادل 100 درصد در نظر گرفته شد.

ویژگی کلینیکی: به منظور تعیین ویژگی کلینیکی روش از25 نمونهٔ منفی تایید شده با روش کشت استفاده شد. در هیچ یک از موارد نتیجهٔ مثبتی مشاهده نشد. از این رو ویژگی روش راه اندازی شده معادل100 درصد در نظرگرفته شد.

بحث

با توجه به این که مقاومت عمده به RIF توسط موتاسیون در ناحیه RRDR (ناحیه81bp موجود در ژن rpoB)رخ می‌دهد تلاش‌ها جهت تشخیص مقاومت در باکتری به بررسی وجود جهش در این ناحیه معطوف شده و تکنیک‌های ملکولی متفاوتی از قبیل sequencing، روش‌های مبتنی بر الکتروفورز و روش‌های مبتنی بر هیبریداسیون در این راستا مورد استفاده قرار گرفته‌اند. در این مطالعه به توسعه تکنیک Real Time PCR برای تشخیص سریع مایکوباکتریوم توبرکلوزیس‌های مقاوم به ریفامپین پرداختیم. عدم نیاز به آنالیز وابسته به ژل در انتهای PCR موجب کاهش خطر آلودگی و نیز افزایش سرعت

Archive
www.SID.ir

خواهدشد. از دیگر مزایای این تکنیک می‌توان به سهولت انجام تکنیک، اختصاصیت بسیار زیاد به دلیل استفاده ازکاوشگر اختصاصی توالی‌های اسید نوکلئیکی هدف با استفاده از رنگ فلوروسنت اشاره کرد. در این تحقیق سعی شد تا کاوشگر اختصاصی به گونه‌ای طراحی شود که جهش در دو کدون 526 و 531 که به طور عمده در سویه‌های مقاوم به ریفامپین دیده می‌شوند(7، 16) را شناسایی کند. بررسی حساسیت و ویژگی پرایمر و پروب طراحی شده نشان داد که تنها قادر به شناسایی ناحیه RRDR ژن rpoB می‌باشند و هیچ گونه واکنشی با ژنوم سایر عوامل میکروبی دیگر ندارند. با استفاده از این روش سویه‌های مقاوم و حساس با دقت و حساسیت بالایی تشخیص داده شدند. حساسیت و ویژگی پروب برای تشخیص سویه‌های مقاوم به ریفامپین مایکوباکتریوم توبرکلوزیس معادل 100 درصد تعیین شد. Sequencingکه به عنوان تکنیک استاندارد طلایی تشخیص موتاسیون مطرح است به علت هزینه بالا و نیاز به داشتن مهارت خاص کاندید مناسبی برای استفاده روتین در آزمایشگاه‌های تشخیصی نمی‌باشد(7).

روش‌های مبتنی بر الکترفورز از قبیل SSCP و هترودوپلکس از طریق مقایسه حرکت DNA مورد نظر و DNA سوش وحشی وجود جهش را تایید می‌کنند. اساس این تکنیک‌ها تغییر ساختار ثانویه ملکول DNA به علت تغییر در یک باز می‌باشد(7، 15). این روش‌ها ارزان و اسان می‌باشند اما حساسیت زیادی ندارند و در برخی از مطالعات جواب‌های مثبت کاذب گزارش شده و علاوه بر این قابلیت تشخیص و افتراق هر نوع تغییر نوکلئوتیدی را ندارند(7).

از روش‌های مبتنی بر هیبریداسیون می‌توان بهReverse hybridization اشاره کرد که حساسیت و دقت بالایی دارد اما نیازمند آماده سازی خاص قبل از PCR و نشان‌دار کردن محصول حین تکثیر و تجهیزات خاص برای هیبریداسیون می‌باشد. علاوه بر این مرحله هیبریداسیون به شدت وابسته به دما می‌باشد و در صورت بروز خطای کوچک احتمال ایجاد جواب کاذب بالا خواهد بود(7، 15).

از دیگر روش‌های مورد استفاده RFLP است که روش دقیق و حساسی است اما عیب آن این است که همه جهش‌هایی که ما به دنبال آن هستیم باعث ایجاد و یا از بین رفتن سایت آنزیمی که مورد نظر ما است نمی‌شوند(15).

با توجه به دقت، سرعت، حساسیت و پتانسیل بالایReal-Time PCR گرایش به این روش برای تشخیص MDR-MTB افزایش یافته به طوری که کیت تشخیصیXpert MTB/RIFکه برای تشخیص سویه‌های مقاوم MTB توسط سازمان جهانی بهداشت تایید و توصیه شده مبتنی بر Real-Time PCR می‌باشد. همچنین در مطالعه‌ای که توسط رامیرز و همکاران صورت گرفت از تکنیک Real-time PCR و HRM برای شناسایی MDR-MTB استفاده شد. حساسیت و اختصاصیت این تکنیک برای شناسایی سویه‌های مقاوم به ریفامپین به ترتیب 91 درصد و 98 درصد تعیین شد(2). با استفاده از این تکنیک می‌توان سویه‌های مقاوم به ریفامپین را با سرعت بالا و با هزینه‌ای بسیار کمتر از روش‌های مبتنی بر کشت و sequencing تشخیص داد.

نتیجه‌گیری

Real-time PCR مزایایی نظیر افزایش سرعت از طریق کاهش زمان تکثیر، حذف مرحله آشکار سازی پس از تکثیر، حساسیت بالا و ساده بودن تکنیک را دارا می‌باشد. با توجه به سرعت روش ملکولی فوق و همچنین حساسیت بالای آن در تشخیص موتاسیون‌های شایع 526 و 531 می‌توان از این روش برای شناسایی زود هنگام و با دقت بالای مایکوباکتریوم‌های مقاوم به ریفامپین استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش منتج از پایان نامه دانشجویی با عنوان(تشخیص سریع سویه‌های مقاوم مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به ریفامپین با استفاوه از Real-time PCR) می‌باشد. لذا بدین وسیله از حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک و آزمایشگاه علوم مرجع تهران

Archive of SID

www.SID.ir

و کلیه همکارانی که ما را در این پژوهش یاری کرده‌اند، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نماییم. همچنین لازم است که از مدیریت آزمایشگاه بیمارستان دی برای پشتیبانی فنی این تحقیق قدردانی نمود.

منابع

1. Zdrowia ŚO. Global tuberculosis control: epidemiology, strategy, financing: WHO report 2009: World Health Organization; 2009.
2. Ramirez MV, Cowart KC, Campbell PJ, Morlock GP, Sikes D, Winchell JM, et al. Rapid detection of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis by use of real-time PCR and high-resolution melt analysis. Journal of clinical microbiology. 2010;48(11):4003-9.
3. Mai H, Edine T, Nguyen L, Frank C, Nguyen D, Dinh S, et al. Validation of the GenoType MTBDR plus assay for diagnosis of multidrug resistant tuberculosis in South Vietnam. 2010; 10:149-50.
4. Wright A, Zignol M, Van Deun A, Falzon D, Gerdes SR, Feldman K, et al. Epidemiology of antituberculosis drug resistance 2002–07: an updated analysis of the Global Project on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance. The Lancet. 2009;373(9678):1861-73.
5. Edlin BR, Tokars JI, Grieco MH, Crawford JT, Williams J, Sordillo EM, et al. An outbreak of multidrug-resistant tuberculosis among hospitalized patients with the acquired immunodeficiency syndrome. New England Journal of Medicine. 1992;326(23):1514-21.
6. Dye C, Espinal MA, Watt CJ, Mbiaga C, Williams BG. Worldwide incidence of multidrug-resistant tuberculosis. Journal of Infectious Diseases. 2002;185(8):1197-202.
7. Garcia de Viedma D. Rapid detection of resistance in Mycobacterium tuberculosis: a review discussing molecular approaches. Clinical microbiology and infection. 2003;9(5):349-59.
8. Rapeepun A-v, Chalinthorn S, Laura P, Kimberly M, Keerataya N, Busakorn P, et al. Validation of the GenoType MTBDR plus assay for detection of MDR-TB in a public health laboratory in Thailand. BMC Infectious Diseases.2010,10:123-4.
9. Rich M. Guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis: World Health Organization; 2006.
10. Dorman SE, Chaisson RE. From magic bullets back to the magic mountain: the rise of extensively drug-resistant tuberculosis. Nature medicine. 2007;13(3):295-8.
11. WHO. Seventh meeting [of the] Strategic and Technical Advisory Group for Tuberculosis (STAG-TB): report on conclusions and recommendations, 11-13 June 2007, Geneva. Geneva: World Health Organization. 2007.
12. World Health Organization. Policy statement: Molecular line probe assayse for rapid screening of patients at risk of multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) .Geneva:World Health Organization ;2008.
13. Riska P, Jacobs Jr W, Alland D. Molecular determinants of drug resistance in tuberculosis. The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease. 2000;4(2s1):S4-S10.
14. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Matter L, Schopfer K, Bodmer T, et al. Detection of rifampicin-resistance mutations in Mycobacterium tuberculosis. The Lancet. 1993;341(8846):647-51.
15. Johnson R, Streicher E, Victor TC, Van Helden PM, Warren R, Louw G, et al. Drug Resistance in Mycobacterium tuberculosis .Curr .Issues Mol. Biol. 2002; 8:97-112.
16. Chaves F, Alonso-Sanz M, Rebollo M, Tercero J, Jimenez M, Noriega A. rpoB mutations as an epidemiologic marker in rifampin-resistant Mycobacterium tuberculosis. The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease. 2000;4(8):765-70.

Archive of SID

www.SID.ir

17. Ohno H, Koga H, Kuroita T, Tomono K, Ogawa K, Yanagihara K, et al. Rapid prediction of rifampin susceptibility of Mycobacterium tuberculosis. American journal of respiratory and critical care medicine. 1997;155(6):2057-63.

Archive of SID

www.SID.ir