

Detection of *rpoB*, *inhA* and *katG* Genes Mutations in Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* by Real-Time PCR Based on Taqman and HRM Assays

Sheikh Ghomi S^{1*}, Farnia P², Darbouy M¹

¹Department of Microbiology, Sciences and Research Branch, Islamic Azad University, Fars, Iran

²Mycobacteriology Research Center, National Research Institute of Tuberculosis and Lung Diseases, Masih Daneshvari Hospital, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

*Corresponding Author. Tel: +989124890749 Fax: +982126109505 E-mail: sheikh.samira@yahoo.com

Received: 22 May 2013 Accepted: 31 Oct 2014

ABSTRACT

Background & objectives: The rapid identification of patients carrying resistant *Mycobacterium tuberculosis* (M.TB) isolates is important for effective tuberculosis therapy. Unfortunately, during the recent years considerable numbers of isolates showed resistant to Rifampin (RIF) and Isoniazid (INH). The aim of this study was to rapidly identify resistant MTB isolates using molecular method. For this reason, the comparison between real-time PCR based on Taqman and HRM Assays in detection of *rpoB*, *inhA* and *katG* genes mutation in clinical isolates were performed and analyzed.

Methods: The study carried out on Mycobacteriology Research Center (MRC) from 2012-2013. Classical susceptibility testing i.e., proportional method against INH and RIF was performed on eighty three M.TB isolates. Thereafter, multiplex and real-time PCR were performed on extracted DNA sample. The real-time PCR was based on Taqman and HRM assays. Mutation in genes *rpoB*, *inhA* and *katG* were detected.

Results: In overall, based on proportional and multiplex PCR method, 47 and 35 isolates were resistant to RIF and INH, respectively. Thirty of strains were resistant to both RIF and INH. The agreement of real-time PCR using Taqman was 88% for resistant and 84% for susceptible isolates, whereas the agreement of HRM was 96% and 30%, respectively. The sensitivity and specificity of Taqman in comparison to multiplex were 84% and 88%, respectively. In addition, the sensitivity and specificity of HRM were 30% and 96%, respectively.

Conclusion: Results documented that real-time PCR based on Taqman assay is more sensitive than HRM assay. Additionally, real-time PCR based on Taqman assay is a rapid, accurate and cost effective method in detection of *Mycobacterium tuberculosis* resistance.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, Drug Resistance, Real-Time PCR, Isoniazid, Rifampin

تشخیص موتاسیون های موجود در ژن های *katG* و *inhA rpoB* در ایزوله های کلینیکی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با روش Real-time PCR بر اساس HRM assay و Taqman assay

سمیرا شیخ قمی^{۱*}، پریسا فرنیآ^۲، مجتبی داربوی^۱

^۱گروه میکروبیولوژی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، فارس، ایران
^۲مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی، پژوهشکده سل و بیماری های ریوی، بیمارستان مسیح دانشوری، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی، تهران، ایران

*نویسنده مسئول. تلفن: ۰۲۱۲۲۴۴۵۸۱۶ فاکس: ۰۲۱۲۶۱۰۹۵۰۵ پست الکترونیک: sheikh.samira@yahoo.com

خلاصه

زمینه و هدف: شناسایی سریع بیمارانی که دارای ایزوله های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به دارو هستند امری ضروری برای درمان این بیماران می باشد. متأسفانه مقاومت نسبت به دو داروی ایزونیاژید و ریفامپین در سال های اخیر مطرح شده است. هدف از مطالعه حاضر شناسایی سریع ایزوله های کلینیکی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم با استفاده از روش های مولکولی بوده است. مطالعه حاضر به منظور مقایسه بین دو روش Real-time PCR بر اساس HRM و Taqman assay در تشخیص موتاسیون های موجود در ژن های *katG* و *inhA rpoB* در ایزوله های کلینیکی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس انجام گرفت.

روش کار: مطالعه حاضر در مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی و در طی سال های ۹۲-۹۱ صورت گرفت. تست حساسیت دارویی به ایزونیاژید و ریفامپین با روش پروپورشنال و بر روی ۸۳ نمونه انجام گرفت. سپس روش های مالتیپلکس PCR و Real-time PCR بر روی DNA استخراج شده انجام شد. Real-time PCR بر اساس روش های Taqman و HRM انجام شد و موتاسیون های موجود در ژن های *katG* و *inhA rpoB* مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: بر اساس روش پروپورشنال و مالتیپلکس PCR، ۴۷ مورد مقاوم به ریفامپین و ۳۵ مورد مقاوم به ایزونیاژید بودند. ۳۰ مورد مقاوم به هر دو داروی ایزونیاژید و ریفامپین بودند. تشابه روش Real-time PCR بر اساس Taqman در تشخیص مقاومت ۸۸٪ و در تشخیص حساسیت ۸۴٪ بود. از طرفی تشابه روش Real-time PCR بر اساس HRM در تشخیص مقاومت ۹۶٪ و در تشخیص حساسیت ۳۰٪ بود. در روش Taqman در مقایسه با مالتیپلکس PCR، حساسیت ۸۴٪ و اختصاصیت ۸۸٪ به دست آمد. در روش HRM نیز حساسیت ۳۰٪ و اختصاصیت ۹۶٪ به دست آمد.

نتیجه گیری: نتیجه مطالعه انجام گرفته نشان داد روش Real-time PCR بر اساس Taqman نسبت به روش HRM در تشخیص مقاومت دارویی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، از حساسیت بیشتری برخوردار بوده است و روشی سریع، مقرون به صرفه (اقتصادی)، دقیق و با حساسیت و اختصاصیت بالا می باشد.

کلمات کلیدی: مایکوباکتریوم توبرکلوزیس؛ مقاومت دارویی؛ Real-Time PCR؛ ایزونیاژید؛ ریفامپین

دریافت: ۹۲/۳/۱ پذیرش: ۹۲/۸/۹

مقدمه

موارد جدید سل را گزارش کرده است و ۱/۴ میلیون نفر در اثر این بیماری جان خود را از دست دادند که تقریباً یک میلیون مرگ در بین افراد HIV منفی و ۴۳۰۰۰۰ مورد در میان افراد HIV مثبت گزارش شده است [۳]. یک سوم جمعیت جهان

در حال حاضر بیماری سل یکی از خطرناکترین بیماری های عفونی جهان بوده و گسترش آن به ویژه در کشورهای در حال توسعه رو به افزایش است [۲،۱]. سازمان بهداشت جهانی در سال ۲۰۱۱، ۸/۷ میلیون

باشند. *inhA* (انول-ACP-ردوکتاز) یک پروتئین دخیل در سنتز مایکولیک اسید می باشد و در بیوسنتز دیواره سلولی نقش دارد که ایجاد جهش در آن منجر به ایجاد مقاومت به ایزونیازید می گردد [۱۱]. بیشتر سویه های مقاوم به ریفامپین دارای یک جهش در ناحیه ۸۱ bp از ژن *rpoB* می باشند که قسمتی از ژن *rpoB* است و زیرواحد از RNA پلیمراز وابسته به DNA را کد می کند [۱۴-۱۲]. ریفامپین از طریق اتصال به این زیرواحد، فرایند نسخه برداری را مختل می کند. از آن جا که تغییرات هم معنی در ناحیه Rifampicin Resistance Determining Region (RRDR) غیرمعمول است، تشخیص جابجایی هر نوکلئوتید در این منطقه ژنتیکی مارکری برای مقاومت است و جهش هایی که در این ناحیه رخ می دهد مسئول ۹۸٪ از مقاومت به ریفامپین هستند [۱۵]. از آن جایی که بیشتر نمونه های مقاوم به ریفامپین دارای موتاسیون در کدون های ۵۱۶، ۵۲۶ و ۵۳۱ می باشند [۱۶]. در مطالعه حاضر این کدون ها جهت بررسی نمونه های مقاوم به ریفامپین انتخاب شدند. برای بررسی مقاومت دارویی ایزونیازید نیز، ژن *katG* و ناحیه پروموتوری *inhA* انتخاب شدند. هدف از مطالعه حاضر، تشخیص موتاسیون های موجود در ژن های *inhA* و *rpoB* در ایزوله های کلینیکی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با روش Real-time PCR بر اساس Taqman Assay و HRM Assay بوده است. مقایسه ی دو روش Taqman Assay و HRM Assay در تشخیص موتاسیون های مرتبط با مقاومت به داروهای ایزونیازید و ریفامپین نیز در مطالعه حاضر انجام گرفت.

روش کار

مطالعه حاضر از نوع کاربردی بوده است و بر روی بیماران مبتلا به سل مراجعه کننده به مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی، در طی سال های ۹۲-۹۱ انجام

آلوده با مایکوباکتریوم توبرکلوزیس هستند [۴]. در گزارش دیگر سازمان بهداشت جهانی در سال ۲۰۱۱، شیوع TB در ایران، ۲۱ مورد از هر ۱۰۰۰۰۰ نفر بوده است [۵]. ایزونیازید (INH) و ریفامپین (RIF)، از مهمترین داروهای ضد سل هستند و مقاومت به آن ها رو به افزایش است [۶]. در سال های ۲۰۰۶ تا ۲۰۱۲، وجود و انتقال Extensively drug resistant TB (XDR-TB) در بین بیماران مبتلا به Multidrug-resistant TB (MDR-TB) در ایران و دیگر کشورها گزارش شد و در مطالعات بعدی، فرم های خطرناکتری از این باسیل، به نام Totally drug resistant TB (TDR-TB) را معرفی کردند. این گروه از سویه ها به تمام داروهای خط اول و دوم مقاومت نشان می دادند [۷]. بر اساس گزارش سازمان بهداشت جهانی در سال ۲۰۱۱، ۳/۷٪ از بیماران جدید و ۲۰٪ از موارد قبلا درمان شده، MDR-TB بودند که حدود ۹٪ از موارد MDR-TB، XDR-TB بودند [۳].

انجام آزمایشات مرسوم تعیین حساسیت در مورد مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، نیاز به حداقل ۳-۴ هفته زمان دارد، لذا بهتر است روش های مطمئن مولکولی جانشین روش های مرسوم گردد. برخی از این روش ها سریع، مقرون به صرفه (اقتصادی) و در عین حال دقیق هستند مانند روش Real-time PCR [۱۰-۸، ۶]. ایزونیازید یک پیش دارو می باشد و فعالیت آنتی بیوتیکی آن به فعال سازی باکتریایی به وسیله آنزیم کاتالاز-پراکسیداز (*katG*) بستگی دارد که موجب ایجاد رادیکال های فعالی می شود و نواحی بسیاری را در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مورد هدف قرار می دهد. بیشترین موتاسیون هایی که مرتبط با مقاومت به ایزونیازید می باشند، در *katG* و *inhA* رخ می دهد. بیشترین مقاومتی که از طریق تغییر در *katG* ایجاد می شود، ایجاد جهش های خاصی است که باعث کاهش فعالیت کاتالاز در سطحی می شوند که ارگانیزم های مقاوم به ایزونیازید قادر به زیست

ترموسایکلر (Astec) با سیکل حرارتی 95°C به مدت ۵ دقیقه، 40 سیکل با شرایط: 95°C به مدت ۳۰ ثانیه، 70°C به مدت ۳۰ ثانیه و 72°C به مدت ۷ دقیقه انجام گرفت. در انتها مقدار ۵ میکرولیتر از محصول PCR حاصل همراه با مارکر ۱۰۰ جفت بازی بر روی ژل پلی آکریل آمید، الکتروفورز شد و باند حاصل مورد مطالعه قرار گرفت. پرایمرهای استفاده شده جهت روش Multiplex PCR در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱. توالی پرایمرهای استفاده شده در روش Multiplex PCR

	[۲۱]
rpoB516	5-CAGCTGAGCCAATTCATGGA-3
rpoB526	5-CTGTCGGGTTGACCCA-3
rpoB531	5-CACAAGCGCCGACTGTC-3
RIRm	5-TTGACCCGCGCGTACAC-3
katG5R	5-ATACGACCTCGATGCCGC-3
katGOF	5-GCAGATGGGGCTGATCTACG-3
inhAP-15	5-GCGCGGTCAGTTCCACA-3
inhAPF2	5-CACCCCGACAACCTATCG-3

Real-time PCR بر اساس Taqman Assay

این روش با استفاده از پروب‌ها و پرایمرهای طراحی شده برای قطعه ۸۱ جفت بازی از ژن *rpoB* (کدون های ۵۲۶، ۵۳۱، ۵۳۱ و ۵۳۱) کدون ۳۱۵ ژن *katG* و ناحیه پروموتوری *inhA* بر روی ۸۳ نمونه انجام گرفت [۲۱]. پرایمرها و پروب‌های استفاده شده جهت روش Taqman Assay در جدول ۲ آورده شده است. واکنش PCR در دستگاه Rotor Gene Q با سیکل حرارتی 56°C به مدت ۱۰ دقیقه، 95°C به مدت ۵ دقیقه و $55-45$ چرخه با شرایط: 95°C به مدت ۱۵ ثانیه و 61°C به مدت ۱۵ ثانیه انجام گرفت. سپس اعداد و نیز منحنی‌هایی که توسط دستگاه رسم شده بود، مورد بررسی و تحلیل قرار گرفت (شکل ۱). در فرآیند PCR از آب مقطر به عنوان کنترل منفی و نیز از سویه استاندارد مایکوباکتریوم توبرکلوزیس H37RV (ATCC 27294) به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

گردید. نمونه‌های جمع آوری شده از این افراد، پس از آلودگی زدایی با روش پتروف ۴٪، بر روی محیط کشت لون اشتاین جنسن کشت داده شدند [۱۷]. از کلنی‌های رشد یافته بر روی محیط کشت، استخراج DNA با روش CTAB^۱ انجام شد [۱۸]. سپس تست حساسیت دارویی به ایزونیازید و ریفامپین با روش Multiplex PCR انجام گرفت. استاندارد طلایی جهت محاسبه حساسیت و اختصاصیت، روش پروپورشنال (تناسبی) و نیز Multiplex PCR بوده است. سپس با استفاده از دو روش Real-time PCR بر اساس Taqman Assay و HRM Assay، بررسی موتاسیون در ژن‌های *rpoB*، *katG* و *inhA* در ایزوله‌های کلینیکی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس انجام شد. محاسبه درصد حساسیت و اختصاصیت، با استفاده از Crosstab Table انجام گرفت.

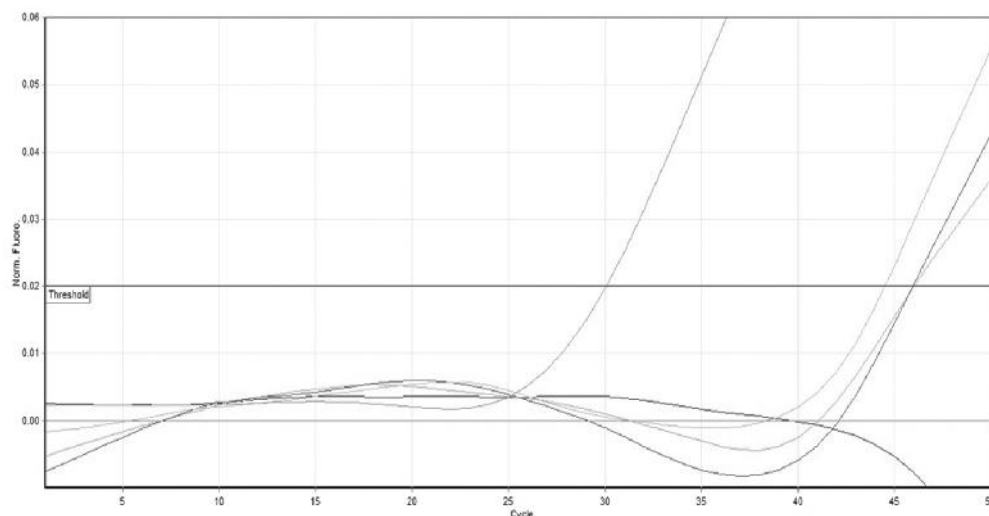
Multiplex PCR

تست حساسیت دارویی بر اساس روش Multiplex PCR بر روی ۸۳ نمونه انجام گرفت [۲۰، ۱۹]. در بررسی مقاومت دارویی ریفامپین، با استفاده از پرایمرهای *rpoB* 516، *rpoB* 526 و *rpoB* 531 (ژن فناوران)، سه ناحیه ۲۱۸، ۱۸۵ و ۱۷۰ جفت بازی از ژن *rpoB* تکثیر گردید. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (Astec) با سیکل حرارتی 95 درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، 40 سیکل با شرایط: 95°C به مدت ۳۰ ثانیه، 68°C به مدت ۳۰ ثانیه و 72°C به مدت ۳۰ ثانیه و در انتها 72°C به مدت ۷ دقیقه انجام گرفت. در پایان، مقدار ۵ میکرولیتر از محصول PCR حاصل همراه با مارکر ۱۰۰ جفت بازی بر روی ژل پلی آکریل آمید، الکتروفورز شد و باند حاصل مورد مطالعه قرار گرفت. در بررسی مقاومت دارویی ایزونیازید، با استفاده از پرایمرهای *katG5R*، *inhAP-15* و *inhAPF2*، دو ناحیه ۲۹۲ و ۲۷۰ جفت بازی از ژن‌های *katG* ۳۱۵ و *inhA*: -۱۵ و *mabA*- تکثیر گردید. واکنش PCR در دستگاه

¹ Cetyl trimethylammonium bromide

جدول ۲. توالی پرایمرها و پروب های استفاده شده در روش Real-time PCR بر اساس Taqman Assay (۲۱)

katG gene F	5 - GGAAACTGT TGTCCCATTTTCG -3
katG gene R	5 - GGGCTGGAAG AGCTCGTATG-3
probe c315 katG W	5 - FAM-CGACCTCGATG CCGCTGGTGAT-3 -TAMRA-3
probe c315katG M	5 - TET-CGACCTCGATGCCGGTGGTGAT-3 -TAMRA-3
inhA gene F	5 - CACGTTACGCTCGTGGACAT-3
inhA gene R	5 - CAGGACTGAACGGGATACGAA-3
probe, RBS inhA W	5 - ROX-AACCTATCGTCTCGCCGCGGC-BHQ-2-3
probe, RBS inhA M	5 - CY5-ACCTATCATCTCGCCGCGGCC-BHQ-2-3
rpoB gene F	5 -ACCGCAGACGTTGATCAACAT-3
rpoB gene R	5 - GGCACGCTCACGTGACAG-3
rpoB, c516 W	5 -FAM-CATGGACCAGAACAACCCGCTGT-3 -TAMRA-3
rpoB, c516 M	5 -TET-CATGGTCCAGAACAACCCGCTGT-3 -TAMRA-3
rpoB, c526 W	5 -FAM-TCGGGGTTGACCCACAAGCG-3 -TAMRA-3
rpoB, c526 M	5 -TET-GGGGTTGACCTACAAGCGCCG-3 -TAMRA-3
rpoB, c531 W	5 -R0X-AGCGCCGACTGTCCGGCG-BHQ-2-3
rpoB, c531 M	5 -TET-CAGCGCCAACAGTCCGGCG-3 -TAMRA-3



شکل ۱. منحنی رسم شده توسط دستگاه برای تشخیص موتاسیون های موجود با روش Taqman

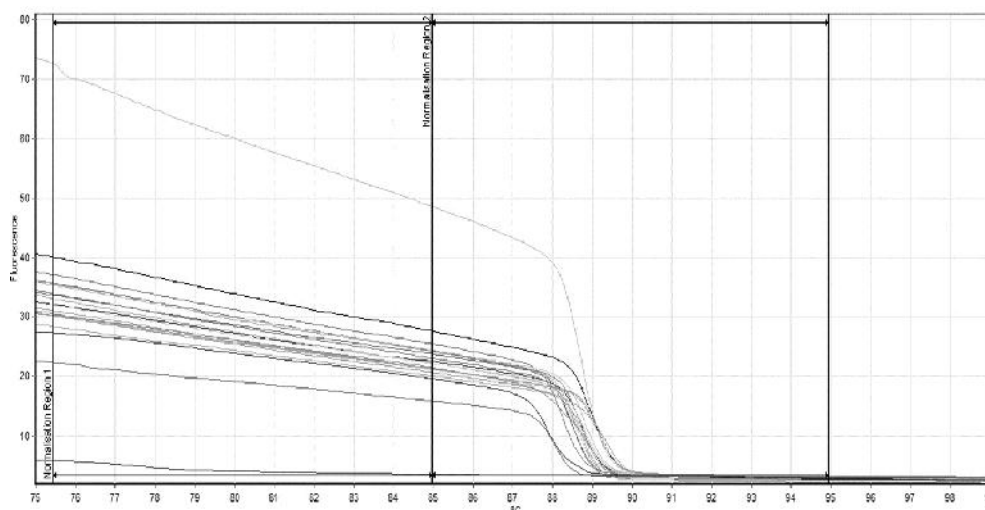
حرارتی 95°C به مدت ۵ دقیقه، 40°C سیکل با شرایط: 95°C به مدت ۱۰ ثانیه، 55°C به مدت ۳۰ ثانیه و 72°C به مدت ۱۰ ثانیه انجام گرفت. سپس اعداد و نیز منحنی هایی که توسط دستگاه رسم شده بود، مورد بررسی و تحلیل قرار گرفت (شکل ۲). در فرآیند PCR از آب مقطر به عنوان کنترل منفی و نیز از سویه استاندارد میکوباکتریوم توبرکلوزیس H37RV (ATCC 27294) به عنوان کنترل مثبت استفاده شد (جدول ۳).

HRM Assay بر اساس Real-time PCR

تعداد ۳۰ نمونه که به طور تصادفی از بین ۸۳ نمونه انتخاب شدند، جهت انجام این روش مورد استفاده قرار گرفتند. این روش با استفاده از پرایمرهای طراحی شده برای قطعه ۸۱ جفت بازی از ژن *rpoB*، کدون ۳۱۵ ژن *katG* و ناحیه پروموتوری *inhA* انجام گرفت [۲۱]. پرایمرهای استفاده شده جهت روش Real-time PCR بر اساس HRM Assay در جدول ۳ آورده شده است. در این PCR از HRM Master Mix شرکت کیاژن استفاده شد. واکنش PCR در دستگاه Rotor Gene Q با سیکل

جدول ۳. توالی پرایمرهای استفاده شده در روش Real-time PCR براساس HRM Assay (۲)

KatG gene F	5 - GGAAACTGT TGTCCCATTTTCG-3
katG gene R	5 - GGGCTGGAAG AGCTCGTATG-3
inhA gene F	5 - CACGTTACGCTCGTGGACAT-3
inhA gene R	5 - CAGGACTGAACGGGATACGAA-3
rpoB gene F	5 -ACCGCAGACGTTGATCAACAT-3
rpoB gene R	5 - GGCACGCTCACGTGACAG-3



شکل ۲. منحنی رسم شده توسط دستگاه برای تشخیص موتاسیون های موجود با روش HRM

یافته ها

بر اساس روش Taqman Assay، از تعداد ۸۳ نمونه، ۴۷ مورد (۵۶٪) مقاوم به ریفامپین و ۳۶ مورد (۴۴٪) حساس به ریفامپین بودند. در مورد ایزونیازید نیز ۳۸ مورد (۴۵٪) مقاوم به ایزونیازید و ۴۵ مورد (۵۵٪) حساس به ایزونیازید بودند. ۳۰ مورد مقام به هر دو داروی ایزونیازید و ریفامپین بودند. بر اساس روش HRM assay نیز از تعداد ۳۰ نمونه، ۲۶ مورد (۸۶٪) مقاوم به ریفامپین و ۴ مورد (۱۴٪) حساس به ریفامپین بودند. در مورد ایزونیازید نیز ۲۲ مورد (۷۳٪) مقاوم به ایزونیازید و ۸ مورد (۲۷٪) حساس به ایزونیازید بودند. ۱۹ مورد مقاوم به هر دو داروی ایزونیازید و ریفامپین بودند. در روش Multiplex PCR، از تعداد ۸۳ نمونه، ۴۷ مورد مقاوم به ریفامپین بودند که از این تعداد، ۴۱ مورد توسط روش Taqman Assay شناسایی شدند و ۳۶ مورد حساس به ریفامپین بودند که ۳۰ مورد

آن توسط Taqman Assay شناسایی شدند. در مورد ایزونیازید نیز ۳۵ مورد مقاوم به ایزونیازید بودند که ۳۱ مورد آن توسط Taqman Assay شناسایی شدند و ۴۸ مورد حساس به ایزونیازید بودند که ۴۱ مورد آن توسط Taqman Assay شناسایی شدند (جدول ۴). ۳۰ نمونه مقاوم به هر دو داروی ایزونیازید و ریفامپین بودند. از طرفی از تعداد ۳۰ نمونه که توسط HRM Assay نیز بررسی شدند، ۱۵ مورد بر اساس Multiplex PCR مقاوم به ریفامپین بودند که تمام ۱۵ مورد توسط HRM Assay شناسایی شدند و ۱۴ مورد حساس به ریفامپین بودند که سه مورد آن توسط HRM Assay شناسایی شدند. در مورد ایزونیازید نیز ۱۳ مورد مقاوم به ایزونیازید بودند که ۱۲ مورد آن توسط HRM Assay شناسایی شدند و ۱۶ مورد حساس به

ایزونیازید بودند که شش مورد آن توسط HRM Assay شناسایی شدند (جدول ۵). البته برای کدون های مورد بررسی، به دستگاه نمونه های کنترل داده شد (شکل های ۱ و ۲). در روش

جدول ۴. تشابه نتایج روش Taqman با روش Multiplex PCR (مقاومت دارویی) S، (حساسیت به دارو)

		Multiplex PCR	Taqman
ریفامپین	R	n = ۴۷ (%۵۶)	n = ۴۱ (%۸۷)
	S	n = ۳۶ (%۴۳)	n = ۳۰ (%۸۳)
ایزونیازید	R	n = ۳۵ (%۴۲)	n = ۳۱ (%۸۹)
	S	n = ۴۸ (%۵۷)	n = ۴۱ (%۸۵)
تعداد کل نمونه ها = ۸۳			

جدول ۵. تشابه نتایج روش HRM با روش Multiplex PCR (مقاومت دارویی) S، (حساسیت به دارو)

		Multiplex PCR	HRM
ریفامپین	R	n = ۱۵ (%۵۰)	n = ۱۵ (%۱۰۰)
	S	n = ۱۴ (%۴۷)	n = ۳ (%۲۱)
ایزونیازید	R	n = ۱۳ (%۴۳)	n = ۱۲ (%۹۲)
	S	n = ۱۶ (%۵۳)	n = ۶ (%۳۸)
تعداد کل نمونه ها = ۳۰			

Taqman Positive value در بررسی مقاومت به ایزونیازید و ریفامپین به ترتیب ۹۱٪ و ۸۳٪ محاسبه شد. از طرفی در روش HRM نیز Positive value در بررسی مقاومت به ایزونیازید و ریفامپین به ترتیب ۸۶٪ و ۱۰۰٪ محاسبه گردید.

بحث

ایزونیازید و ریفامپین بیشترین خاصیت ضد سلی را در میان داروهای موجود در پروتکل های درمان دارند. شیوع جهانی استفاده از این داروها و عدم تکمیل دوره درمان توسط بیماران، منجر به ظهور مقاومت به این دو دارو شده است [۲۲]. مقاومت به ایزونیازید و ریفامپین باعث کاهش امکان بهبودی بیماران به علت اثر محدود و عوارض جانبی داروهای جایگزین می گردد [۲۱]. تست های حساسیت دارویی که بر روی محیط کشت انجام می گیرند، در تشخیص دیر هنگام و گسترش مقاومت دارویی نقش دارند، زیرا نتایج تا ۸-۶ هفته پس از جمع آوری نمونه مشخص می شوند. بیماران با MDR-TB در ریسک بالایی از ناتوانی در درمان هستند. وجود

در روش Taqman Assay برای تشخیص مقاومت به ایزونیازید و ریفامپین به ترتیب حساسیت ۸۵٪ و ۸۳٪ و اختصاصیت ۸۹٪ و ۸۷٪ به دست آمد. در روش HRM Assay نیز برای تشخیص مقاومت به ایزونیازید و ریفامپین به ترتیب حساسیت ۳۸٪ و ۲۱٪ و اختصاصیت ۹۲٪ و ۱۰۰٪ به دست آمد. در روش Taqman از یک پروب اختصاصی نقطه موتانت و یک پروب اختصاصی جهت ژن wild type استفاده شده است. در این روش علاوه بر اینکه غلظت ماده فلورسانت آزاد شده در پایان هر سیکل PCR اندازه گیری می شود، در پایان مراحل PCR کل مقدار ماده فلورسانت آزاد شده نیز اندازه گیری شده و خوانده می شود. بسته به این که پروب اختصاصی سوش موتانت به نمونه مجهول چسبیده باشد یا پروب اختصاصی سوش وحشی، نتیجه نشان دهنده مقاوم یا حساس بودن نمونه مجهول خواهد بود. در روش HRM نیز دستگاه Rotor Gene Q تغییر فلورسانس را بررسی نموده و میزان آن را اندازه گیری می کند و موتانت و یا حساس بودن سوبه ها را با ذکر درصد اطمینان نشان می دهد.

روش ممکن است موتاسیون های خاموش و یا موتاسیون هایی را که عملاً غیر مرتبط با مقاومت دارویی هستند را نیز شناسایی کرده باشد. ۳- اشتباهات در بررسی مقاومت توسط این دستگاه می تواند در ارتباط با کشت های کهنه و یا اندازه نادرست باکتری بوده باشد.

در مطالعه ای مشابه با مطالعه ی حاضر، Espasa و همکارانش در سال ۲۰۰۵ در اسپانیا، با استفاده از پروب های فلوروزنیک به ردیابی سریع موتاسیون های ژنی چندگانه که عامل مقاومت مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به ریفامپین و ایزونیاژید هستند پرداختند. آن ها از روش Real-time PCR بر اساس پروب Taqman استفاده کردند و به بررسی موتاسیون در کدون های ۵۱۳، ۵۱۶، ۵۲۶ و ۵۳۱ ژن *rpoB* و کدون ۳۱۵ ژن *katG* و جایابی در ناحیه پرموتوری *inhA* پرداختند. آن ها به این نتیجه رسیدند که این روش امکان ردیابی مقاومت به ایزونیاژید و ریفامپین را ۷۲-۸۸ ساعت پس از جمع آوری نمونه فراهم می نماید و برای نمونه هایی که اسمیر مثبت هستند، حساسیتی نزدیک به ۱۰۰٪ داشته است [۲۱]. در مطالعه حاضر، روش Taqman Assay، برای تشخیص مقاومت دارویی به ایزونیاژید و ریفامپین، حساسیت ۸۴٪ را نشان داد که با درصد حساسیت به دست آمده در مطالعه Espasa و همکارانش تطابق زیادی داشت (جدول ۴). تفاوت مختصری که بین درصد حساسیت حاصل از دو مطالعه مشاهده گردید را می توان به کهنه بودن کشت و یا اندازه نادرست باکتری نسبت داد.

Pietzaka و همکارانش در سال ۲۰۰۹ به شناسایی سریع مقاومت چند دارویی ایزوله های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در ارتباط با ژن *rpoB* پرداختند و از روش High resolution melting curve PCR analysis استفاده کردند و در پایان برای تایید نتایجشان از سکوانسینگ استفاده کردند. HRM analysis همه سویه ها و ایزوله ها حساسیت ۹۵/۵٪

روش های مولکولی نوین برای شناسایی سریع مقاومت در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، فرصتی را برای درمان این بیماران و کنترل بیماری ایجاد می نماید [۲۳، ۱]. از طرفی، افزایش شیوع مایکوباکتریوم های غیر توبرکلوزیس امری مهم و قابل توجه است و باید روش های مولکولی مناسب برای بررسی آن ها نیز مورد مطالعه قرار گیرد [۲۴]. در مطالعه حاضر، هدف از استفاده Real-time PCR، ردیابی بیش از نیمی از موارد مقاوم به داروهای ایزونیاژید و ریفامپین در عرض ۴۸ ساعت پس از جمع آوری نمونه بوده است. زمان کوتاهی که این روش در تشخیص مقاومت دارویی صرف می نماید و استفاده ی مستقیم از نمونه ها، سبب کاهش آلودگی در محیط آزمایشگاه می شود. در مطالعه حاضر، در روش Taqman Assay، از پروب های فلوروزنیک Taqman استفاده شده است. این پروب به گونه ای طراحی شده اند که در انتهای ۵' به رنگ تشعشع کننده فلورسانس و در انتهای ۳' به رنگ خاموش کننده متصل است. استفاده همزمان پروب های Wild Type و Mutant در یک میکروتیوب، به آن ها اجازه رقابت داده است و سبب افزایش اختصاصیت روش مذکور شده است. در روش HRM Assay نیز از بافر حاوی اواگرین استفاده شده است. رنگ اواگرین متصل شونده به DNA دو رشته ای می باشد و پس از اتصال به DNA دو رشته ای، باعث ایجاد فلورسانس می شود. از محدودیت های روش Real-time PCR که ممکن است در نتایج مطالعه حاضر تاثیر گذار بوده باشد، می توان به مواردی اشاره کرد: ۱- نمونه هایی که بر اساس این روش مولکولی حساس بوده اند، ممکن است حاوی موتاسیون های خاص و با مکانیزم های ناشناخته مقاومت باشند که این مکانیسم ها ممکن است توسط این دستگاه ناشناخته باشند. در صورتی که تست های مرسوم حساسیت دارویی می توانند مقاومت ناشی از مکانیزم های ژنتیکی ناشناخته را نیز تشخیص دهند. ۲- این

پرایمرها و پروب های متفاوتی که در دو مطالعه استفاده شده است نسبت داد. طاهری و همکارانش در سال ۲۰۱۳ در ایران، به تشخیص سریع مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به ریفامپین با استفاده از روش Real-time PCR پرداختند و موتاسیون های موجود در ناحیه RRDR ژن *rpoB* را مورد بررسی قرار دادند. در مطالعه آن ها، برای تشخیص موتاسیون در ژن *rpoB* حساسیتی معادل ۱۰۰٪ در نظر گرفته شد. در مطالعه حاضر، در تشخیص موتاسیون های موجود در ژن *rpoB* حساسیت ۸۳٪ محاسبه شد (جدول ۴). تطابق زیادی بین درصد حساسیت حاصل از مطالعه حاضر با درصد حساسیت کسب شده در مطالعه طاهری و همکاران وجود داشت. تفاوت مختصر بین نتایج حاصل از مطالعه حاضر با نتایج حاصل از مطالعه طاهری و همکارانش را می توان به پرایمرها و پروب های متفاوتی که در دو مطالعه استفاده شده است نسبت داد [۲۶].

نتیجه گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد روش Real-time PCR بر اساس Taqman Assay نسبت به روش HRM Assay، در تشخیص موتاسیون های موجود در ژن های *inhA* و *rpoB* در ایزوله های کلینیکی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، از حساسیت بیشتری برخوردار بوده است و روشی سریع، مقرون به صرفه (اقتصادی)، دقیق و با حساسیت و اختصاصیت بالایی باشد.

تقدیر و تشکر

این پژوهش منتج از پایان نامه دانشجویی سمیرا شیخ قمی تحت عنوان «تشخیص موتاسیون های موجود در ژن های *rpoB*، *inhA* و *katG* در ایزوله های کلینیکی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با روش Real-

و اختصاصیت ۱۰۰٪ را نشان داد. آن ها به این نتیجه رسیدند که HRMA یک روش ایده آل برای آزمایشات TB می باشد که با حداقل زمان و هزینه قابل انجام می باشد [۱]. در مطالعه حاضر در روش HRM Assay برای تشخیص مقاومت به ریفامپین، حساسیت ۲۱٪ و اختصاصیت ۱۰۰٪ به دست آمد که از نظر درصد اختصاصیت حاصل شده با مطالعه آن ها تطابق داشت اما از نظر درصد حساسیت اینطور نبود (جدول ۵). تناقض بین درصد حساسیت حاصل از دو مطالعه را می توان به عواملی نسبت داد. در مطالعه حاضر تعداد کمتری نمونه برای تشخیص مقاومت دارویی با روش HRM در مقایسه با مطالعه آن ها بررسی شد و از طرفی ممکن است این روش به کهنه بودن کشت و یا اندازه نادرست باکتری حساس بوده باشد.

Lou و همکارانش در سال ۲۰۱۱ در چین، با استفاده از مالتیپلکس Real time PCR بر اساس منحنی ذوب و پروب های *rpoP1* و *rpoP2* به ردیابی موتاسیون های عامل مقاومت دارویی در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس پرداختند. در مطالعه آن ها، بررسی موتاسیون های ناحیه ۸۱ جفت بازی ژن *rpoB* کدون ۳۱۵ ژن *katG*، ناحیه پروموتوری *inhA* و نیز ناحیه پروموتوری *ahpc* و *embB 306* انجام گرفت و تمام موتاسیون ها با حساسیت ۱۰۰٪ و اختصاصیت ۱۰۰٪ ردیابی شدند و به این نتیجه رسیدند که این روش راهی سریع برای ردیابی موتاسیون در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می باشد [۲۵]. هر چند در مطالعه ی حاضر، در روش Taqman موتاسیون ها با حساسیت ۸۴٪ و اختصاصیت ۸۸٪ شناسایی شدند که نسبت به درصد حساسیت و اختصاصیت حاصل از مطالعه Lou و همکارانش کمی پایین تر می باشد، اما باز هم قابل اهمیت است (جدول ۴). تفاوت مختصر بین درصد حساسیت و اختصاصیت حاصل از دو مطالعه را می توان به

مایکوباکتریولوژی آزمایشگاه رفرانس سل کشوری
واقع در بیمارستان مسیح دانشوری تهران تشکر و
قدردانی می نمایم.

time PCR بر اساس Taqman Assay و HRM <<
Assay و با کد ۸۱۳۰۵۰۷۹۱۱۰۰۵ می باشد که در
طی سال های ۹۲-۹۱ انجام گرفت. لذا بدین وسیله
از همکاری صمیمانه مرکز تحقیقات

Reference

- 1- Pietzaka A, Indra A, Stoger A, Zeinzinger J, Konrad M, Hasenberger P, et al. Rapid identification of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates by rpoB scanning using high-resolution melting curve PCR analysis. *J Antimicrob Chemother.* 2009 April; 63(6): 1121-1127.
- 2- Merza MA, Farnia P, Salih AM, Masjedi MR, Velayati AA. First insight into the drug resistance pattern of *Mycobacterium tuberculosis* in Dohuk, Iraq: Using spoligotyping and MIRU-VNTR to characterize multidrug resistant strains. *J Infect Public Health.* 2011 Mar; 4(1): 41- 47.
- 3- World Health Organization (WHO). Global Tuberculosis Report. Geneva, Switzerland 2012. Available from: http://www.who.int/tb/publications/global_report/2012/en/index.html.
- 4- World Health Organization (WHO). Global tuberculosis Control report. Geneva, Switzerland 2009. Available from: www.who.int/tb/publications/global_report/2009/en/index.html.
- 5- World Health Organization (WHO). Estimates of tuberculosis incidence by rate. Geneva Switzerland 2011. Available from: http://www.who.int/about/licensing/copyright_form/en/index.html
- 6- Gisele Goncalves M, Okuyama L, Siqueirav R, Sargado M, Harrison H, Shutt K, et al. Fast test for assessing the susceptibility *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid and rifampin by Real-time PCR. *Mem Inst Oswaldo cruz.* 2012 Nov; 107(7): 903-908.
- 7- Velayati AA, Farnia P, Masjedi MR, Ibrahim TA, Tabarsi P, Haroun RZ, et al. Totally drug-resistant tuberculosis strains: evidence of adaptation at the cellular level. *Eur Respir J.* 2009 Nov; 34(5): 1202-1203.
- 8- Darban-Sarokhalil D, Imani Fooladi AA, Maleknejad P, Bameri Z, Aflaki M, Nomanpour B, et al. Comparison of smear microscopy, culture, and real-time PCR for quantitative detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical respiratory specimens. *Scand J Infect Dis.* 2013 Apr; 45(4): 250-5.
- 9- Arjomandzadegan M, Owlia P, Ranjbar R, Farazi AA, Sofian M, Sadrnia M, et al. Rapid and simple approach for identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *M. bovis* by detection of regulatory gene whiB7. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 2011 Mar; 58(1): 65-74.
- 10- Nasr Esfahani B, Rezaei Yazdi H, Moghim S, Ghasemian Safaei H, Zarkesh Esfahani H. Rapid and accurate identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex and common non-tuberculous mycobacteria by multiplex real-time PCR targeting different housekeeping genes. *Curr Microbiol.* 2012 Nov; 65(5): 493-9.
- 11- Dinmohammadi F, Farnia P, Biglari A, Kazempoor M, Masjedi M, Velayati A, et al. Identification of the mutations related to resistance of mycobacterium tuberculosis to isoniazid by use of PCR-RFLP in TB patients. *Sci J Kurdistan Med Univ.* 2009 Mar; 14(4):1-9. (Full Text in Persian)
- 12- Riska P, Jacobs Jr W, Alland D. Molecular determinants of drug resistance in tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2000 Feb; 4(2 Suppl 1):S4-S10.
- 13- 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 Mar; 341(8846):647-51.

- 14- Rathore IM, Jayalakshmi TK, Joshi DS, Pai G. Rapid detection of multidrug-resistant *Mycobacterium Tuberculosis* by Real-time PCR based assay in indian population. Rec Res Sci Tech. 2011 Mar; 3(3): 58-62.
- 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 Jul; 8: 97-112.
- 16- Sajduda A, Brzostec A, Poplawska M, Auqustynowicz E, Zwolska Z, Niemann S, et al. Molecular characterization of rifampin and isoniazid-resistant *mycobacterium tuberculosis* strains isolated in poland. J Clin Microbiol. 2004 Jun; 42(6); 2425–2431.
- 17- Farnia P, Varahram M, Mohammad F, Ghadiri Fard F, Doraghi M, Tabatabaee S, et al. Culture Examination 1st ed. Iran: NRITLD 2009: 9-49. (Full Text in Persian)
- 18- Farnia P, Seif SH, Sheikholslami M, Aghali M, Varahram M, Masjedi M, et al. Methods of DNA extraction (*Mycobacterium & Human*) 1st ed. Iran: NRITLD 2011: 7-32. (Full Text in Persian)
- 19- Farnia P, Taghavi K, Seif Sh, Sheikholslam M, Varahram M, Masjedi M, et al. Susceptibility Testing: Multiplex -PCR, PCR-SSCP and PCR-ELISA 1st ed. Iran: NRITLD 2011: 19-37. (Full Text in Persian)
- 20- Taghavi K, Farnia P, Varahram M, Sheikholslami FM, Kazempoor M, Ahmadi M, et al. Rapid detection of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* by a single multiplex allele-specific polymerase chain reaction assay. Cell J. 2011 August; 13(2): 97-102.
- 21- Espasa M, Gonzalez J, Alcaide F, Araçon LM, Lonca J, Manterola JM, et al. Direct detection in clinical samples of multiple gene mutations causing resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid and rifampicin using fluorogenic probes. J Antimicrob Chemother. 2005 Jun; 55(6): 860–865.
- 22- Torres MJ, Criado A, Palomares JC, Aznar J. Use of Real-time PCR and fluorimetry for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance-associated mutations in *mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol. 2000 Sep; 38(9) 3194–3199.
- 23- Choi GE, Lee SM, Yi J, Hwang SH, Kim HH, Lee EY. High-Resolution melting curve analysis for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. J Clin Microbiol. 2010 Nov; 48(11): 3893-8.
- 24- Farivar TN, Johari P, Moien AA, Shahri MH, Naderi M, Oskouie H. Assessment of prevalence of non-tuberculous mycobacteria in archival acid-fast bacilli positive smear slides by taqman real-time PCR assay. N Am J Med Sci. 2012 May; 4(5):231-4.
- 25- Lou T, Jiang L, sun W, Mei J, Gao Q. Multiplex real-time PCR melting curve assay to detect drug-resistant mutations of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol. 2011 Sep; 49(9): 3132–3138.
- 26- Taheri B, Mirab S, Parian M, Ghaznani E. Rapid detection of rifampicin resistant *Mycobacterium tuberculosis* by using real time PCR. J Arak Univ Med Sci. 2013 Jul; 16(74): 49-57.(Full Text in Persian)