ORIGINAL ARTICLE

Rapid Detection of Mutation in Gene Resistant to Rifabutin in Mycobacterium tuberculosis Isolates Using Allele Specific-PCR

Navid Mosabebi[1],
Maryam Sadrnia[2],
Mohammad Reza Zolfaghari[3]

[1] MSc in Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran
[2] Assistant Professor, Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran
[3] Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Qom Branch, Islamic Azad University , Qom, Iran

(Received July 1, 2014 ; Accepted November 26, 2014)

Abstract

Background and purpose: Molecular detection of antibiotic resistance in clinical strains of *M.tuberculosis* is of great importance. In this study, we developed a method for rapid detection of mutations resistant to the rifabutin antibiotic resistant gene.

Materials and methods: In this study 40 clinical isolates of *M.tuberculosis* including 12 resistant and 28 susceptible isolates to rifabutin were used. The isolates were obtained from Tuberculosis and Pediatric Infectious Research Center affiliated to Arak University of Medical Sciences. Specific primers were designed and corrected by BLAST-IDT and MEGA software. The primers for an Allele Specific PCR was able to detect the desired hot point in the gene from 3´end in 516-526-531 codons and could also reconnoiter mutant state; Therefore, lack of formation of band in PCR product indicates the resistance of strain to rifabutin. Some selected samples were sequenced and compared with results derived from ASP.

Results: 12 *M.tuberculosis* isolates resistant to rifabutin, mutations in one of the three main codons were detected in 10 strains using Allele Specific PCR method. Susceptible strains did not show any mutations in these codons. The sensitivity of the method was 80% (95% CI: 0.55-0.95) and the specificity was 100% (95% CI:0.87-1). Results of sequencing were concordant with results of ASP method.

Conclusion: The results showed that Allele Specific-PCR was a rapid and simple method for fast detection of rifabutin resistance in *M.tuberculosis* isolates and is recommended for routine works.

Keywords: Rifabutin, *Mycobacterium tuberculosis*, Allele Specific PCR

J Mazandaran Univ Med Sci 2014; 24(119): 40-47 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و چهارم شماره ۱۱۹ آذر سال ۱۳۹۳ (۴۷-۴۰)

تشخیص سریع موتاسیون در ژن عامل مقاومت به ریفابوتین در سویه های کلینیکی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به روش Allele Specific PCR

نوید مسببی[۱]
مریم صدرنیا[۲]
محمد رضا ذوالفقاری[۳]

چکیده

سابقه و هدف: تشخیص مولکولی مقاومت در آنتی بیوتیک‌های موثر روی سویه‌های کلینیکی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در این مطالعه طراحی روشی جهت تشخیص سریع موتاسیون‌های مرتبط به مقاومت در ژن عامل مقاومت به آنتی بیوتیک ریفابوتین مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: ۴۰ سویه کلینیکی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس شامل ۱۲ سویه مقاوم به ریفابوتین و۲۸سویه حساس به این آنتی‌بیوتیک مورد استفاده قرار گرفتند که نمونه‌ها از بانک میکروبی مرکز تحقیقات سل و عفونی کودکان دانشگاه علوم پزشکی اراک اخذ شد. پرایمرهای اختصاصی با کمک نرم افزارهای BLAST، IDT و MEGA طراحی و تصحیح شدند. پرایمرهای طراحی شده جهت واکنش Allele Specific PCR از ´۳ قابلیت اتصال به نوکلئوتیدهای موتانت در کدون‌های ۵۱۶-۵۲۶-۵۳۱ ژن rpoB را داشته و قابلیت شناسایی حالت موتانت را داشتند، لذا عدم تشکیل باند در محصول PCR به معنی مقاوم بودن سویه به ریفابوتین بود. قطعه مورد نظر در تعدادی از نمونه‌ها تعیین ترادف شده و با نتایج به‌دست آمده مقایسه گردید.

یافته‌ها: از ۱۲ سویه مقاوم به ریفابوتین مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با کمک روش Allele Specific PCR مورد مطالعه، ۱۰ سویه به عنوان سویه‌های موتانت در یکی از ۳کدون اصلی تشخیص داده شدند. سویه‌های حساس نیز فاقد موتاسیون در این کدون‌ها بودند. حساسیت روش معادل ۸۰ درصد با 95% CI:0.55-0.95 و ویژگی آن معادل ۱۰۰ درصد با 95% CI:0/87-1 محاسبه گردید. نتایج تعیین ترادف (سکوئنس) مؤید نتایج به دست آمده بود.

استنتاج: نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که Allele Specific PCR روشی ساده و سریع برای تشخیص سریع مقاومت به ریفابوتین در سویه‌های کلینیکی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بوده و جهت استفاده روتین پیشنهاد می‌شود.

واژه های کلیدی: ریفابوتین- مایکوباکتریوم توبرکلوزیس-Allele Specific PCR

مقدمه

بیماری سل یکی از مشکلات بهداشتی در جهان و یک بیماری عفونی مسری است که خطر بالای مرگ و میر آن باعث شده بسیاری از بیماران در اثر این بیماری جان خود را از دست بدهند(۲،۱) سل

مولف مسئول: مریم صدرنیا- تهران: دانشگاه پیام نور، گروه زیست شناسی، کد پستی ۴۶۹۷-۱۹۳۹۵ E-mail: msadrnia@yahoo.com
۱. کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران
۲. استادیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
۳. استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۳/۴/۱۰ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۳/۹/۴ تاریخ تصویب : ۱۳۹۳/۹/۵

مقـاوم بـه دارو یـا Extensively Drug Resistance و Multi Drug Resistance در حـال تبـدیل شـدن بـه یـک معضـل بهداشـتی مـی‌باشـد و در شـروع قـرن ۲۱ مقاومـت دارویـی یکـی از عوامـل مهـم مـرگ و میـر بیمـاران سـلی بـه شـمار مـی‌رود(۶،۵). مقاومـت دارویـی زمـانی صـورت مـی‌گیـرد کـه یـک جهـش ژنتیکـی در باسـیل سـل بـه وجـود آیـد(۷) داروهـای رده اول سـل عبارتنـد از: ریفـامپین، اتـامبوتول، ایزونیازیـد، پیـرازین آمیـد و استرپتومایسـین و داروهـای جـایگزین یـا رده دوم بـرای درمـان بیمـارانی کـه بـا سـویه‌هـای مقـاوم بـه دارو آلـوده شـده‌انـد بـه کـار مـی‌رود کـه اینهـا شـامل: افلوکساسـین، سیبروفلوکساسـین، آمیکاسـین و کانامایسـین، ریفـابوتین هسـتند(۹،۸). ریفـابوتین از جملـه داروهـای مـؤثر علیـه سـل اسـت کـه فعـال تـر از ریفامپیسـین علیـه مایکوبـاکتری‌هـای کنـد رشـد عمـل مـی‌کنـد. تـأثیر درمـانی ریفـابوتین بـه طـور بسـته بـا ویژگـی‌هـای دارویـی آن ارتبـاط دارد(۱۴). یـک توضـیح امکـان پـذیر بـرای تفـاوت در حساسـیت مایکوبـاکتریوم توبرکلـوزیس بـه ریفـابوتین وریفـامپین، در تمایـل مولکـولی ایـن دو دارو بـه زیـر واحـد بتـا RNA پلیمـراز اسـت(۱۷). موتاسـیون‌هـا در ژن rpoB کـه زیـر واحـد بتـاRNA پلیمـراز را کـد مـی‌کنـد مسـئول مقاومـت بـه ریفـامپین و ریفـابوتین اسـت. بـیش از ۹۵ درصـد سـویه‌هـای مقـاوم بـه ریفـابوتین، موتاسـیون داخـل منطقـه RRDR (منطقـه تعیـین کننـده مقاومـت بـه ریفـامپین) از ژن rpoB دارنـد کـه موتاسـیون‌هـا در کـدون ۵۳۱ نتیجـه در مقاومـت بـه همـه آنـالوگ‌هـای ریفامایسـین را دارد(۱۸،۱۷). جـا بـه جـایی در کـدون‌هـای ۵۳۱ و ۵۲۶ و ۵۱۶ از ژن rpoB از شـایع ترین موتاسـیون هـای مـرتبط بـا مقاومـت بـه ریفـابوتین اسـت(۱۶) در ایـن تحقیـق ارتبـاط مقاومـت بـا موتاسـیون در ژن rpoB در سـویه‌هـای مایکوبـاکتریوم توبرکلوزیس بررسی می‌شود.

پـس مقاومـت بـه آنتـی‌بیوتیـک‌هـای ریفـابوتین و ریفـامپین بـه هـم مـرتبط هسـتند کـه هـر دو از خـانواده ریفامایسـین بـوده و زیـر واحـد سـیگما در RNA پلـی‌مـراز بـاکتری در اثـر موتاسـیون تغییـر مـی‌کنـد و ریفـابوتین نمـی‌توانـد بـه ایـن قسـمت بـاکتری متصـل شود و در ایـن وضـعیت محـل اثـر دارو تغییـر مـی‌کنـد، در نتیجه باکتری بـه فعالیـت خـود ادامـه مـی‌دهـد. ولـی ارتبـاط مقاومـت ایـن دو آنتـی بیوتیـک بـه هـم بـه ایـن معنـی نیسـت کـه هـر بـاکتری مقـاوم بـه ریفـامپین، مقاوم به ریفابوتین هم باشد.

بـرای اولـین بـار در ایـران روی آنتـی بیوتیـک ریفـابوتین کـار شـده اسـت کـه یـافتن روش‌هـای سـاده تر بیولـوژی مولکـولی کـه در زمـان کـم پاسـخ مناسـب ارائـه نماینـد اهمیـت ویـژه‌ای دارد.در ایـن تحقیـق بـرای اولـین بـار روش Allele Specific PCR بـرای تعیـین جهـش‌هـا در کـدون‌هـای ۵۱۶ و۵۲۶ و ۵۳۱ طراحـی شـده اسـت. نمونـه‌هـای مـورد نیـاز از بانـک میکروبـی مرکـز تحقیقـات سـل و عفـونی کودکـان دانشـگاه علـوم پزشـکی اراک و بـه صـورت ژنـوم خـالص شـده اخذ شده اند.

روش Allele Specific PCR بـرای تشـخیص موتاسـیون ژن‌هـا بـه‌وسـیله مشـخص کـردن یـک بـاز اشتباهی بـین پرایمـر و جهـش مـورد هـدف طراحـی شـده اسـت. ایـن روش مـی‌توانـد بـرای تعیـین سـویه حسـاس و یا تعیـین سـویه مقـاوم طراحـی گـردد و درآن پرایمرهـای اختصاصی هـر کـدون بـه نحـوی طراحـی کـه ۳/ آن‌هـا به محل کـدون متصـل مـی‌گـردد. هـدف از انجـام ایـن مطالعـه ایـن بـود کـه روش Allele Specific PCR قـادر بـه تشـخیص موتاسـیون در کـدون‌هـای سـه گانـه اسـت. ایـن روش جهـت تشـخیص سـریع مقاومـت بـه ریفابوتین کـه یـک آنتـی بیوتیـک مهـم در درمـان سـل است قابل استفاده خواهد بود.

مواد و روش‌ها

در ایـن مطالعـه، تعـداد ۴۰ سـویه مـایکو بـاکتریوم

توبرکلوزیس که به روش کشت، مقاومت یا حساسیت آنها به ریفابوتین تعیین شده بود مورد استفاده قرار گرفتند.تخلیص DNA با کمک روش chelex100 انجام گرفت(۱۹). به‌طور خلاصه، ۳ تا ۴ کلنی جوان در ۲۷۰ میکرولیتر بافر 1X TAE محتوی ۰/۰۷ گرم Chelex100 حل شده و در دمای ۹۵ درجه سلیسیوس به مدت ۴۵ دقیقه گرمادهی شد. سپس سه مرتبه در ۱۴۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردیده و محلول رویی جدا می‌شود. جهت تعیین خلوص DNA از دستگاه اسپکتروفتومتر (آلمان–eppendorf) در طول موج ۲۶۰و ۲۸۰ نانومتر استفاده بعمل آمد.سویه ویرولان H37RV به عنوان سویه استاندارد در این مطالعه استفاده شد. از پرایمرهای اختصاصی PrpoBF با توالی GGG-AGC-GGA- و PrpoBR 5/- TAC-CAC-C-<C>-3/ با توالی 5/-GCG- GTA-CGG-CGT-TTC-GA-<T>-3/ برای تکثیر قطعه ۳۶۰bp از ژن *rpoB* استفاده می‌شود. واکنش آمپلیفیکاسیون در حجم نهایی ۲۵ میکرو لیتر شامل ۱/۸ میکرولیتر DNA تخلیص شده، ۲/۴ میکرو لیتر بافر ۰/۶،۱۰X میکرولیتر dNTP [cinagen؛ ایران] ۰/۶ واحد آنزیم Taq DNA polymerase [cinagen ایران] و ۱ میکرولیتر از هر دو پرایمر [cinagen ؛ایران] و ۱۷/۶ میکرولیتر H2O استفاده شد. سیکل حرارتی برای انجام این PCR به صورت: ۹۵ درجه به مدت ۳دقیقه (مرحله آغاز)، ۹۵ درجه به مدت ۳۰ ثانیه (دناتوراسیون)، ۶۳ درجه به مدت ۳۰ ثانیه (اتصال پرایمر)، ۷۲ درجه به مدت ۲۲ ثانیه (تکثیر) و ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه (تکثیر نهایی) بود. در مرحله بعد از روش Allele Specific PCR برای ۳ آلل اختصاصی کدون‌های(۵۱۶و۵۲۶و ۵۳۱) استفاده شد. پرایمرهای ترادف جلویی شامل P516F،P526F،P531F طوری قرار داده می‌شوند که انتهای OH -۳/ این پرایمرها با باز دوم از کدون‌های مربوطه در آلل وحشی جفت شود. استفاده پرایمرهای داخلی باRIR یا ترادف برگشتی ایجاد باندهای مختلفی روی ژل الکتروفورز می کند که برای پرایمرهایP516F برابر bp ۲۹۹، P526F برابر bp ۲۶۶ و P531F برابر bp ۲۵۰ است. توالی پرایمرهای استفاده شده و شکل طراحی پرایمر برای روش AlleleSpecific PCR به ترتیب برای کدون‌های ۵۱۶ و ۵۲۶ و ۵۳۱ به صورت زیر می‌باشد:

جدول شماره ۱: توالی پرایمرهای استفاده شده برای روش Allele Specific-PCR برای کدون های ۵۱۶و۵۲۶و۵۳۱ و RIR

۵۱۶	5/-CAG CCA GCT GAG CCA ATT CAT GGA-3/
۵۲۶	5/-CCC GCT GTC GGG GTT GAC CCA-3/
۵۳۱	5/-ACC CAC AAG CGC CGA CTG TC-3/
RIR-ترادف برگشتی	5/-GCG GTC AGG TAC ACG ATC T-3/

516+RIR=299bp
526+RIR=266bp
531+RIR=250bp

و سیکل حرارتی این روش به صورت:

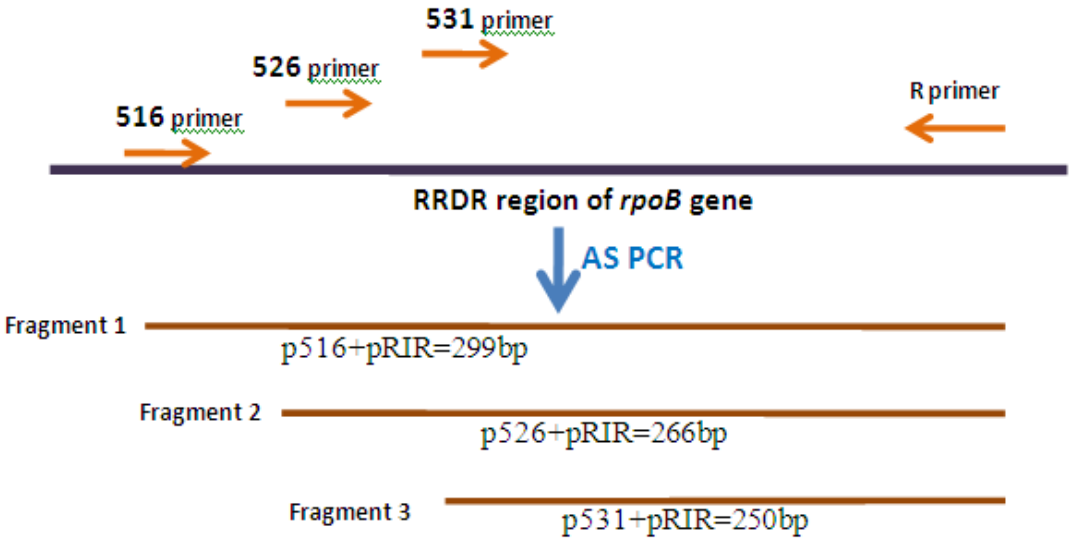
۹۴درجه به مدت ۳ دقیقه، ۹۴ درجه به مدت ۴۰ ثانیه، ۵۸/۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه به مدت ۴۵ ثانیه، ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه است. میزان مواد استفاده شده در روش Allele Specific PCR به این ترتیب که:

DNA=2.5 µL, H2O=1.5 µL, master mix=12.5 µL, primer516=1.5 µL, primer526=2.5 µL

Primer531=2.5 µL, RIR =(پرایمر برگشتی) 2µL

DNA=2.5 µL, H2O=1.5 µL, master mix=12.5 µL, primer516=1.5 µL, primer526=2.5 µL

Primer531=2.5 µL, RIR =(پرایمر برگشتی) 2µL



تصویر شماره ۱: شکل طراحی پرایمر استفاده شده در روش Allele Specific PCR

اگر موتاسیون در کدون مورد نظر وجود نداشته باشد، قطعات الل اختصاصی تیپ وحشی به وسیله پرایمر ریورس و یک پرایمر داخلی فوروارد امپلی فایل میشود ولی وجود موتاسیون در کدون‌های مربوط موجب عدم تطابق در انتهای ۳′ این کدون‌ها با پرایمر داخلی تیپ وحشی گردیده و بنابراین محصول PCR فاقد آلل اختصاصی می‌باشد. پس فقدان هر یک از قطعات 299bp،266bp، 250bp به ترتیب در اثر موتاسیون در کدون‌های ۵۱۶ و ۵۲۶ و ۵۳۱ می‌باشد. برای ارزیابی تعیین موتاسیون با روش‌های مولکولی از تعیین توالی به عنوان استاندارد طلایی استفاده می‌شود سپس توالی‌های حاصل از مرحله تعیین توالی با نرم‌افزارهای MEGA4,chromas1.45,allele ID جهت بررسی وجود یا عدم وجود جهش در ژن rpoB مورد بررسی قرار گرفت. تعداد ۲۰ نمونه مورد نظر از ۴۰ سویه برای انجام سکوئنسینگ به شرکت SOURCE BIOSCIENCE انگلستان فرستاده شد.

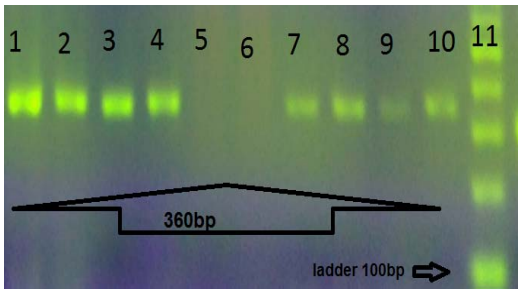
یافته ها

از ۴۰ نمونه کلینیکی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس شامل ۱۲ سویه مقاوم به ریفابوتین و ۲۸ سویه حساس به این دارو، با استفاده از روش Allele Specific PCR که برای تشخیص موتاسیون در هر کدام از این سه کدون اصلی به کار برده شد،این نتیجه بدست آمد که از ۱۲ سویه مقاوم،۱۰ سویه موتاسیون در یکی از سه کدون ۵۱۶ و ۵۲۶ و ۵۳۱ داشتند و دو سویه با تشکیل هر ۳ باند در روی ژل الکتروفورز، نتیجه‌ای غیر از مقاوم بودن این سویه‌ها داشت.در مورد ۲۸ سویه حساس نیز،همه سویه‌ها تشکیل باند حساس بودن در روی ژل دادند. بدین ترتیب حساسیت معادل ۸۰ درصد با 95CI:0.55-0.95 درصد و ویژگی روش معادل ۱۰۰ درصد با CI:۰/۸۷-۱ ۹۵ درصد به دست آمد. هم‌چنین این روش مشخص کرد که بیش‌ترین موتاسیون‌ها به ترتیب در کدون‌های ۵۳۱ >۵۲۶ > ۵۱۶ رخ می‌دهد.

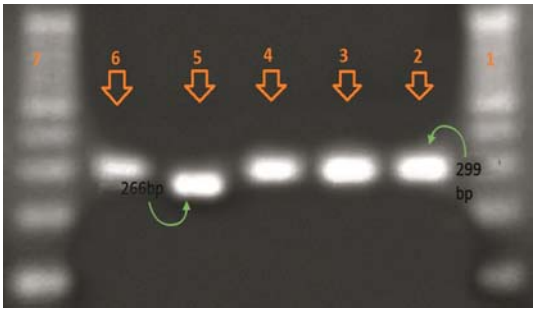
همان‌گونه که در تصویر شماره ۳ مشاهده می‌شود، فقدان باند299bp، نشانگر موتاسیون در کدون۵۱۶ و فقدان باند 266bp، شاخص موتاسیون در کدون ۵۲۶ می‌باشد.

تصویر شماره ۴ هم وجود هر سه باند ۲۹۹ و ۲۶۶ و ۲۵۰ bp را در ۲ سویه حساس به داروی ریفابوتین نشان می‌دهد.

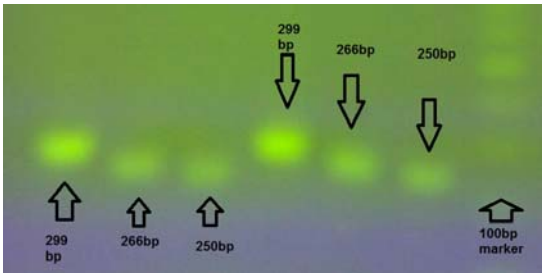
تصویر شماره۲ نشان دهنده باند 360bp در محصول PCR سویه‌ها می‌باشد.



تصویر شماره ۲: نتایج PCR ژن rpoB. ستون ۱-۲ کنترل مثبت، ستون ۴-۳ و ۱۰-۷ سویه‌های کلینیکی، ستون‌های ۵و۶ شاهد و ستون ۱۱ مارکر bp ۱۰۰ می باشند.



تصویر شماره ۳: نتایج Allele Specific-PCR درتعدادی از سویه‌های مقاوم به ریفابوتین:
ستون‌های ۱و۷ مارکر bp ۱۰۰، ستون‌های ۲و۳و۴و۶ دارای باند bp 299 و فاقد باند bp ۲۶۶ هستند یعنی این‌که در کدون ۵۲۶ دارای موتاسیون هستند ولی ستون ۵ برعکس دارای موتاسیون در کدون ۵۱۶ می باشد. همه نمونه ها در این شکل دارای موتاسیون در کدون ۵۳۱ هستند.



تصویر شماره ۴: نتایج Allele Specific PCR در دو سویه حساس به داروی ریفابوتین

نتایج تعیین توالی از انطباق ۱۰۰ درصد روش سکوئنسینگ با Allele Specific PCR گزارش داد که نشانگر دقت روش مورد استفاده بود. ۱۰ سویه مورد نظر در سکوئنسینگ که شامل ۸ سویه حساس و ۱۲ سویه مقاوم به ریفابوتین بوده است، مشخص گردید که نتایج با نتایج به‌دست آمده از روش Allele Specific PCR هم‌خوانی دارد.

بحث

به علت گسترش سل مقاوم به دارو، کاربرد روش‌هایی برای تشخیص سریع حساسیت یا مقاومت سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به دارو امری ضروری است و این مقاومت‌های چند دارویی به علت کمبود امکانات آزمایشگاهی و عدم درمان صحیح رو به افزایش است. برای آزمایش تعیین مقاومت دارویی باید روشی را به کار برد که بتواند در چند ساعت مقاومت یا حساسیت به آنتی‌بیوتیک را تعیین کند. روش‌هایی مانند سکوئنسینگ و کیت‌ها در بررسی جهش در ژن‌های مقاومت اغلب هزینه بر و پرزحمت هستند. برای اجرای روتین روش‌های in-house که شامل انواع روش‌های PCR می‌باشد مناسب‌تر است. برای اولین بار در ایران روی آنتی‌بیوتیک ریفابوتین کار شده است که یافتن روش‌های ساده‌تر بیولوژی مولکولی که در زمان کم پاسخ مناسب ارائه نمایند اهمیت ویژه دارد.در این تحقیق برای اولین بار روش llele Specific PCR برای تعیین جهش‌ها در کدون‌های ۵۱۶و۵۲۶و۵۳۱ این آنتی‌بیوتیک طراحی شده است. روش Allele Specific PCR طوری طراحی شده است که سویه های حساس تشکیل باند داخلی داده اما سویه های مقاوم قادر به تشکیل باند نیستند.این روش مولکولی با روش تعیین توالی به عنوان استاندارد طلایی مقایسه گردید. نتیجه این تحقیق کارا بودن روش Allele Specific PCR و امکان‌پذیر بودن استفاده آن در روش‌های روتین آزمایشگاهی است. در این تحقیق بیش‌ترین موتاسیون‌ها به ترتیب در کدون‌های ۵۳۱و۵۲۶و۵۱۶ اتفاق افتاد که در مطالعه‌ای که توسط Yaoju Tan در سال ۲۰۱۱ صورت گرفته این موضوع را تأیید می‌کند که فراوان‌ترین کدون‌های دارای موتاسیون مشاهده شده به

ترتیب در ۵۳۱ (۷۳/۷درصد)، ۵۲۶ (۱۸/۸ درصد)، و ۵۱۶ (۲/۵درصد) بود. در رابطه با منطقه دارای رخداد موتاسیون در ژن *rpoB* بسیاری از تحقیقات و مطالعات نشان داده اند که بیش از ۹۵ درصد سویه‌های مقاوم به ریفامپین و ریفابوتین و در کل ریفامایسین‌ها موتاسیون داخل منطقه RRDR (منطقه تعیین‌کننده مقاومت به ریفامپین) از ژن *rpoB* داشتند(۱۸،۱۵). هم‌چنین Yaoju Tan در مطالعه خود نشان داده که در ۳۶۲ سویه مقاوم به ریفامایسین،که تمام ژن *rpoB* سکوئنس شده بود این را مشخص کرد که همه سویه‌های مقاوم به ریفامایسین موتاسیون missense (بد معنی) در تمام ژن*rpoB* داشتند و مقاومت به ریفابوتین در مایکو باکتریوم توبرکلوزیس کاملاً با موتاسیون ژن rpoB بستگی دارد. اما بخش‌های جهش یافته در دو دارو در کدون‌های مختلف آن‌ها قرار دارند. هم‌چنین در مطالعه دیگر مشخص شده که فعالیت ریفابوتین KRM-1648 علیه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس نه تنها به موقعیت موتاسیون بلکه به نوع جانشینی در ژن *rpoB* بستگی دارد. مثلاً از۱۸سویه با ۷ موتاسیون Missense (بد معنی) متفاوت در کدون ۵۲۶، آن‌هایی که با جانشینی گلایسین، گلوتامین یا لوسین هستند مقاوم به ریفامپیسین بودند اما حساس به ریفابوتین KRM-1648 بودند. در عوض سویه‌هایی با جانشینی تیروزین، پرولین، آرژنین یا آسپارتیک اسید مقاوم به سه دارو بودند. در آزمایشات انجام شده توسط Heifets LB,1985 نشان داده شده که ۱۲ درصد سویه های مقاوم به ۱۰ ماکروگرم در میلی لیتر از ریفامپین، حساس به ۰/۵ ماکروگرم در میلی لیتر ریفابوتین هستند و MBC یا حداقل غلظت کشندگی برای ریفابوتین ۰/۱۲۵ میلی‌گرم در میلی لیتر و برای ریفامپین ۰/۲۵۰ میلی‌گرم در میلی لیتر است و از طرف دیگر نسبت بین مهار و غلظت کشندگی (MIC:MBC) ۱به ۴ برای سویه‌های حساس به ریفابوتین مایکوباکتریوم توبرکلوزیس است.

در پایان می‌توان نتیجه گیری کرد که در این مطالعه مشخص شد که روش Allele SpecificPCR برای تشخیص موتاسیون کارا بوده و با توجه به سرعت اجرا و هزینه کم نسبت به روش تعیین توالی یا سکوئنسینگ در تشخیص مقاومت مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به داروی ریفابوتین در آزمایشگاه ها پیشنهاد می‌شود.

سپاسگزاری

ازآزمایشگاه مرکز تحقیقات سل و عفونی و جناب آقای دکتر محمد ارجمند زادگان صمیمانه سپاسگذاری می نماید.

References

1. Palomino JC, Cardoso Leão S, Ritacco V (Eds). Tuberculosis 2007: from basic science to patient care: 2007. Available at: www. TuberculosisTextbook.com. Accessed May 2, 2013.
2. CDC, Centers for Disease Control and Prevention. Extensively Drug-Resistant Tuberculosis (XDR TB). 2007. available at: www.cdc.gov/tb. Accessed May 2, 2013.
3. 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; 34(5): 1202-1203.
4. Namayee M, Nazem M, Sadeghian A, Naderi-Nasab M. Drug resistant in mycobacterium tuberculosis isolated from tuberculous patients in Mashhad. Ardabil Univ Med Sci J 2004; 3(1): 47-55 (Persian).
5. Fleischmann RD, Alland D, Eisen JA, Carpenter L, White O, Peterson J, et al. Whole-Genome Comparison of Mycobacterium tuberculosis Clinical and Laboratory Strains. J Bactrriol 2002; 184(19): 5479-5490.

6. Jassal M, Bishai WR. Extensively drug-resistant Tuberculosis. Lancet Infect Dis 2009; 9(1): 19-30.
7. Yuryev A. PCR Primer Design, Methods in molecular biology series, Part I: Basic principle and software, 2006, New York: Humana Press, Springer; 2006.
8. Soni V, Agrawal P, Khandrika LP. Reporter gene based method for the screening of anti-tuberculosis drugs by using essential and regulatory genes of mycobacteria as drug target, United States Patent: 6,645. November 11, 2003.
9. Helb D, Jones M, Story E, Boehme C, Wallace E, Ho K, et al. Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis and rifampin resistance by use of on-demand, near-patient technology. J Clin Microbiol 2010; 48(1): 229-237.
10. Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D, Nicol MP, Shenai S, Krapp F, et al. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. N Engl J Med 2010; 363: 1005-1015.
11. Nguyen L, Thompson CJ. Foundations of antibiotic resistance in bacterial physiology: the mycobacterial paradigm. Trends Microbiol 2006; 14(7): 304-312.
12. Kunin CM. Antimicrobial activity of rifabutin. Clin Infect Dis 1996; 22 (suppl 1), 3-14.
13. Battaglia R, Pianezzola E, Salgarollo G, Zini G, Strolin Benedetti M. Absorption, disposition and preliminary metabolic pathway of 14C-rifabutin in animals and man. J Antimicrob Chemother 1990; 26(6): 813-822.
14. Bodmer T, Bernasconi C, Zuercher G, et al. Molecular basis of rifabutine susceptibility in rifampicin resistant Mycobacterium tuberculosis. Program and abstracts of the 33rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Washington, D.C: American Society for Microbiology; 1993.
15. Saribas Z, Kocagoz T, Alp A, Gunalp A. Rapid detection of rifampin resistance in Mycobacterium tuberculosis isolates by heteroduplex analysis and determination of rifamycin cross-resistance in rifampin-resistant isolates. J Clin Microbiol 2003; 41(2): 816-818.
16. Lee ASG, Lim IHK, Tang LLH, Wong SY. High frequency of mutations in the rpoB gene in rifampin-resistant clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis from Singapore. J Clin Microbiol 2005; 43(4): 2026-2027.
17. Tan T, Hu Z, Zhao Y, Cai X, Luo C, Zou C, et al. The Beginning of the rpoB Gene in Addition to the Rifampin Resistance Determination Region Might Be Needed for Identifying Rifampin/Rifabutin Cross-Resistance in Multidrug-Resistant Mycobacterium tuberculosis Isolates from Southern China. J Clin Microbioly 2012; 50(1): 81-95.
18. Cavusoglu C, Hilmioglu S, Guneri S, Bilgic A. Characterization of rpoB Mutations in Rifampin-Resistant Clinical Isolates of Mycobacterium Tuberculosis from Turkey by DNA Sequencing and Line Probe Assay. J Clin Microbiol 2002; 40(12): 4435-4438.
19. K Phillips K, McCallum N, Welch. A comparison of methods for forensic DNA extraction: Chelex-1001 and the QIAGEN DNA Investigator Kit (manual and automated). Forensic Sci Int Genet 2012; 6(2): 282-285.