

مطالعه جهش های مرتبط با مقاومت به ایزونیازید در سویه های مایکوباکتریوم توبرکولوزیس مراکز سل استان های اصفهان و تهران به روش PCR-RFLP (۸۴-۱۳۸۳)

دکتر اکبر توکلی*؛ دکتر پرویز مهاجری**؛ دکتر حسن شجاعی***؛ دکتر رحمت ا... یزدانی****؛

دکتر شراره مقیم****؛ دکتر بهرام نصر اصفهانی****

چکیده

سابقه و هدف: به رغم اینکه ایزونیازید به عنوان مؤثرترین دارو برای از میان بردن باسیل سل مطرح است، مقاومت به این دارو به سهولت پدید می آید. جهش هایی که در *katG*، *inhA* و *ahpC* روی می دهد، در اغلب موارد عامل مقاومت به ایزونیازید است. البته فراوانی این جهش ها در جمعیت ها، متفاوت است. هدف از این مطالعه تعیین مشخصات مولکولی مقاومت به ایزونیازید در سویه های مایکوباکتریوم توبرکولوزیس است که می تواند در تشخیص سریع مقاومت دارویی کاربرد وسیعی داشته باشد.

مواد و روش ها: این مطالعه به روش توصیفی-تحلیلی انجام شد. وجود جهش در نواحی خاصی از ژن های *katG*، *inhA* و *ahpC* در ۳۲ سویه مقاوم به ایزونیازید مایکوباکتریوم توبرکولوزیس مراکز سل استان های اصفهان و تهران بررسی شد. برای تعیین جهش های کدون ۳۱۵ ژن *katG* از تکنیک PCR-RFLP استفاده شد و بدین منظور محصول ۳۵۵ جفت بازی PCR با آنزیم های *MspI* و *MspAII* برش داده شد. برای بررسی جهش ژن های *inhA* و *ahpC* نیز از سکونسینگ استفاده شد.

یافته ها: فراوانی جهش در کدون ۳۱۵ ژن *katG* (*Ser→Thr*)، *inhA*، *ahpC* ایزوله های مقاوم به ایزونیازید به ترتیب ۷۱/۹، ۱۸/۹ و ۶/۲ درصد بود. یکی از ایزوله ها فاقد جهش در ژن های مورد مطالعه بود.

نتیجه گیری: PCR-RFLP با استفاده از آنزیم *MspI* که توانایی تشخیص جانشینی *Ser315Thr* را در *katG* دارد، می تواند اکثر سویه های مقاوم به ایزونیازید را که دارای جهش در کدون ۳۱۵ هستند، شناسایی نماید. از نتایج این مطالعه می توان دریافت که شناسایی جهش *Ser315Thr* در ژن *katG* می تواند یک روش غربالگری سریع را برای شناسایی ایزوله های مایکوباکتریوم توبرکولوزیس مقاوم به ایزونیازید جدا شده در مراکز سل اصفهان و تهران فراهم آورد.

کلیدواژه ها: مایکوباکتریوم توبرکولوزیس، مقاومت به ایزونیازید، PCR-RFLP، *katG*، *inhA* و *ahpC*

«دریافت: ۸۵/۴/۲۰ پذیرش: ۸۶/۶/۲۷»

*استاد گروه میکروبی شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

**استادیار گروه میکروبی شناسی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

***دانشیار گروه میکروبی شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

****استادیار گروه میکروبی شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

*عهده دار مکاتبات: اصفهان، خیابان هزار جریب، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده پزشکی، گروه میکروبی شناسی، تلفن: ۷۹۲۲۴۰۹

مقدمه

انجام آزمایش‌های مرسوم تعیین حساسیت در مورد مایکوباکتریوم توبرکولوزیس علاوه بر مشکلات موجود در مسیر خالص‌سازی کلنی و تهیه محیط‌های کشت و غلظت‌های مختلف دارو نیاز به حداقل ۳-۴ هفته زمان دارد و گاه ممکن است به بروز آلودگی در آزمایشگاه منجر گردد. بروز اشتباه طی هر یک از این مراحل پرزحمت، پرهزینه و وقت‌گیر می‌تواند نتایج حاصل را مخدوش نماید؛ لذا بهتر است روش‌های مطمئن مولکولی جانشین روش‌های مرسوم گردد. برخی از این روش‌ها سریع، ارزان و در عین حال دقیق هستند (۱). ایزونیازید یکی از مؤثرترین عوامل آنتی مایکوباکتریال است که از طریق مهار یکی از آنزیم‌های دخیل در بیوسنتز مایکولیک اسید مانع سنتز آن می‌شود و بر دیواره سلولی باکتری اثر می‌گذارد. ایزونیازید یک پیش‌دارو است و از طریق آنزیم کاتالاز- پراکسیداز (katG) مایکوباکتریوم توبرکولوزیس دو الکترون دریافت می‌کند و به فرم فعال در می‌آید. کمی پس از پیدایش این دارو در سال ۱۹۵۲ بود که سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکولوزیس مقاوم به آن پدیدار شد. جهش‌های مرتبط با مقاومت به ایزونیازید نسبت به سایر عوامل ضد سل، مانند ریفامپین بسیار پیچیده‌تر است و حداقل هفت ژن و دو ناحیه بین ژنی و تنظیمی ذیل در این میان دخیل هستند:

KatG, furA, inhA, kasA, Rv0340, iniB, iniA, iniC, efpA
oxyR-ahpC intergenic region
mabA-inhA promotor

فراوانی جهش‌های مذکور برحسب منطقه جغرافیایی،

این خصوص در کشورمان ضروری به نظر می‌رسد تا با شناخت بهتر این جهش‌ها بتوان راه‌کارهای مفیدی درخصوص شیوه شناسایی سویه‌های مقاوم مایکوباکتریوم ارائه نمود. هدف از این مطالعه بررسی جهش‌های مرتبط با مقاومت به ایزونیازید در ایزوله‌های بالینی مقاوم مایکوباکتریوم توبرکولوزیس با استفاده از روش‌های PCR و RFLP است.

در این خصوص استفاده از روش‌های مولکولی مرتبط با PCR مثل RFLP و SSCP همواره مدنظر قرار داشته و در این میان RFLP به دلیل سهولت انجام و به صرفه بودن از اهمیت خاصی برخوردار است (۳). در این روش محصول PCR به وسیله آنزیم‌های محدودکننده خاصی برش داده می‌شود؛ به طوری که تعداد باندها و وزن مولکولی آن‌ها می‌تواند گویای نوع جهش روی داده در ژن مورد نظر باشد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه توصیفی تحلیلی تلاش شد تا پس از تأیید میکروبی سویه‌های جمع‌آوری شده از مراکز سل با استفاده از PCR و RFLP نوع جهش‌های مرتبط با مقاومت به ایزونیازید بررسی شود.

۳۲ سویه مقاوم و ۳۲ سویه حساس به ایزونیازید از مراکز سل استان تهران و اصفهان در سال‌های ۸۴-۱۳۸۳ جمع‌آوری شد. به دلیل وجود مراکز سل در این دو استان، نمونه‌ها از این مراکز جمع‌آوری شد. شناسایی سویه‌ها با استفاده از مورفولوژی کلنی، رنگ‌آمیزی زیل نلسون تولید پیگمان، آزمایش‌های مرسوم بیوشیمیایی مانند تولید نیاسین، احیای نترات و همچنین PCR IS6110

ایزوپروپانل افزوده شد و در ۱۴۰۰۰ دور و دمای ۴ درجه برای ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. تغلیظ DNA نیز با استفاده از اتانول انجام گرفت. در مرحله آخر RNA به کمک ریبونوکلاز حذف شد (۵).

● PCR و RFLP: واکنش های آمپلیفیکاسیون در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر، دارای ۱۰ نانوگرم DNA استخراج شده، ۲۰ پیکومول از هر پرایمر، ۰/۲ میلی مولار از dNTP Mix و ۲/۵ واحد آنزیم Taq سیناژن انجام شد. در جدول ۱ توالی پرایمرهای به کار رفته آمده است (۶).

سیکل حرارتی که برای آمپلی فای کردن نواحی katG، inhA و ahpC به کار رفت، شامل: ۹۴ درجه به مدت ۳ دقیقه، ۳۰ سیکل شامل ۹۴ درجه به مدت ۴۵ ثانیه، ۶۵ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه بود.

محصول PCR ژن katG به کمک آنزیم های محدودکننده MspI و MspAII در ۳۷ درجه برای یک ساعت برش داده شد و محصولات حاصل از هضم آنزیم های محدودکننده مذکور به روی پلی آکریل ژل ۱۰ درصد الکتروفورز شد. DNA موجود در ژل با استفاده از

برای تعیین حساسیت به ایزونیازید به کار رفت (۳ و ۴). در این روش سویه ها را در صورتی مقاوم می شناسند که تعداد کلنی موجود در پلیت حاوی دارو حداقل ۱ درصد تعداد کلنی موجود در پلیت های فاقد دارو باشد؛ برای این منظور غلظت ۰/۲ میکروگرم در میلی لیتر ایزونیازید و محیط کشت لونشتاین جانسون استفاده شد. نتایج آزمایش حساسیت با استفاده از محیط کشت میدل بروک 7H10 و غلظت مشابه از ایزونیازید تأیید شد.

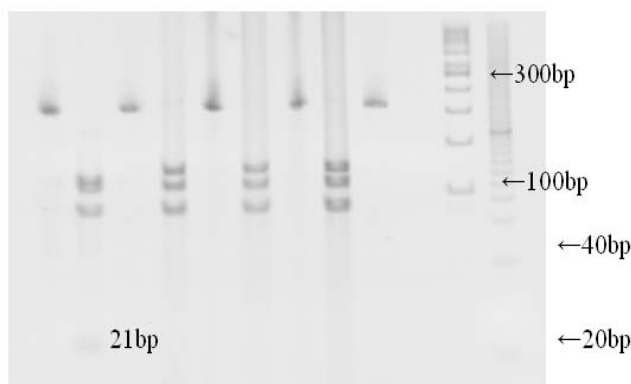
● استخراج DNA از سویه ها: باکتری های رشد کرده بر سطح محیط کشت لونشتاین جانسون جمع آوری و پس از غیرفعال کردن با حرارت ۸۰ درجه به مدت ۱ ساعت، DNA باکتری با استفاده از CTAB (ستیل تری متیل آمونیوم بروماید) استخراج گردید؛ بدین منظور ابتدا رسوب باکتری با لایزوزیم (۳۷ درجه، ۱ ساعت) و سپس پروتیناز k و SDS (۶۵ درجه، ۱۰ دقیقه) مجاور شد. محصول تحت اثر CTAB/ NaCl (۶۵ درجه، ۱۰ دقیقه) قرار گرفت. برای جدا کردن DNA از پروتئین ها، کلروفرم/ ایزوآمیل الکل و سانتریفیوژ (۱۴۰۰۰ دور، ۵ دقیقه) استفاده گردید. به محصول رویی،

جدول ۱- توالی پرایمرهای به کار رفته در مطالعه

اندازه محصول (جفت باز)	سکانس پرایمر	نام پرایمر
۳۵۵	5'-CCC ATG GCC GCG GCG GTC GAC ATT-3'	katGF
	5'-CGC CGT CCT TGG CGG TGT ATT GCC-3'	katGR
۲۴۸	5'-CCT CGC TGC CCA GAA AGG GA-3'	inhA-TB92
	5'-ATC CCC CGG TTT CCT CCG GT-3'	inhA-TB93
۲۳۷	5'-CCG ATG AGA GCG GTG AGC TG-3'	ahpC-TB90

است. همان‌طور که دیده می‌شود در مورد MspI، شکست قطعه ۱۵۱ جفت بازی به قطعات ۱۳۰ و ۲۱ جفت بازی در سویه‌های مقاوم و در خصوص MspAII شکست قطعه ۱۹۹ جفت بازی به قطعات ۱۳۱ و ۶۸ جفت بازی در سویه‌های حساس به ایزونیازید روی می‌دهد.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 L1 L2



شکل ۲- آمپلیفیکاسیون ژن katG با استفاده از پرایمرهای katG F,R (ستون‌های ۱ و ۳ و ۵ و ۷ و ۹). الگوهای RFLP ژن katG پس از هضم آنزیمی MspI ایزوله مقاوم ایزونیازید (ستون ۲) و سه ایزوله حساس ایزونیازید (ستون‌های ۴ و ۶ و ۸) در شکل آمده است. DNA لدرهای ۱۰۰ و ۲۰ جفت بازی فرمتاس به ترتیب در ستون‌های L1 و L2 قرار دارند. الگوی ستون دوم مشخصه جانشینی S315T در کدون ۳۱۵ است.

جدول ۲- اندازه قطعات (برحسب جفت باز) حاصل از هضم آنزیمی محصولات PCR ژن katG سویه‌های حساس و مقاوم ایزونیازید

مایکوباکتریوم توبرکولوزیس

ایزوله		آنزیم
مقاوم به ایزونیازید	حساس به ایزونیازید	
۱۳۰-۱۱۴-۷۹-۲۱	۱۵۱-۱۱۴-۷۹	MspI

۱۳۰-۱۱۴-۷۹-۲۱ ۱۵۱-۱۱۴-۷۹ MspI

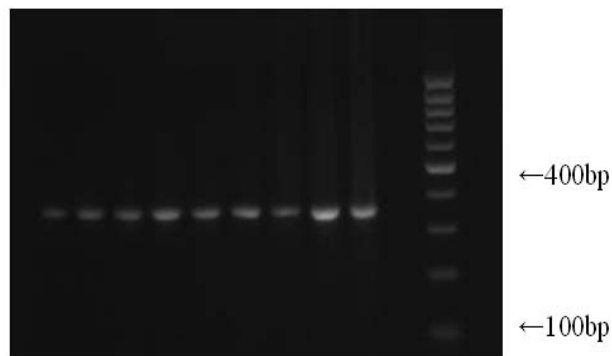
کیت DNA Gel Extraction V-gene استخراج شد و به کمک MacroGene تعیین توالی گردید. نتایج سکونسینگ (الکتروفورگرام) با نرم‌افزارهای Chromas و Blastn بررسی شد تا محل دقیق جهش‌ها تعیین گردد. ذکر این نکته ضروری است که در خصوص جهش‌های روی داده‌شده در نواحی inhA و ahpC مستقیماً به نتایج سکونسینگ رجوع شد.

یافته‌ها:

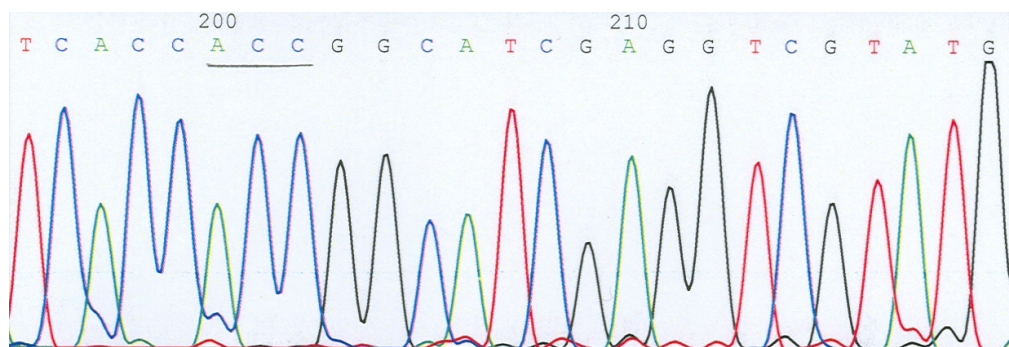
محصول PCR ژن katG قطعه ۳۵۵ جفت بازی است که در شکل ۱ نشان داده شده است. نتیجه هضم این قطعه ۳۵۵ جفت بازی در نمونه‌های حساس و مقاوم به ایزونیازید مایکوباکتریوم توبرکولوزیس قطعاتی با وزن‌های مختلف خواهد بود که با توجه به آن‌ها می‌توان به حساسیت ایزوله مورد نظر به ایزونیازید پی برد.

جزئیات این یافته‌ها در جدول ۲ و شکل ۲ آمده

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 L



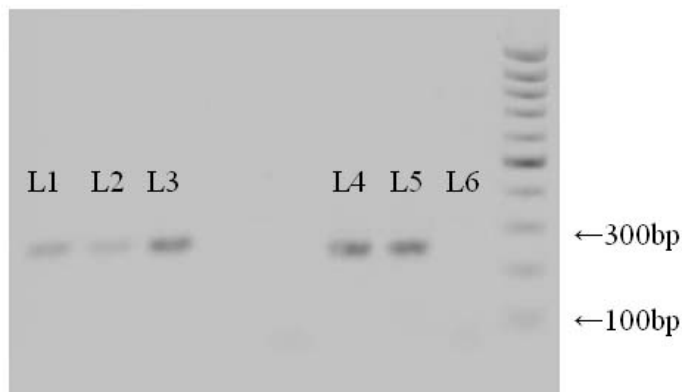
شکل ۱- ژل الکتروفورز قطعه ۳۵۵ جفت بازی حاصل از katG PCR. هشت نمونه اول مربوط به سویه‌های مورد مطالعه، نمونه نهم مربوط به سویه استاندارد H37Rv و نمونه دهم کنترل منفی است.



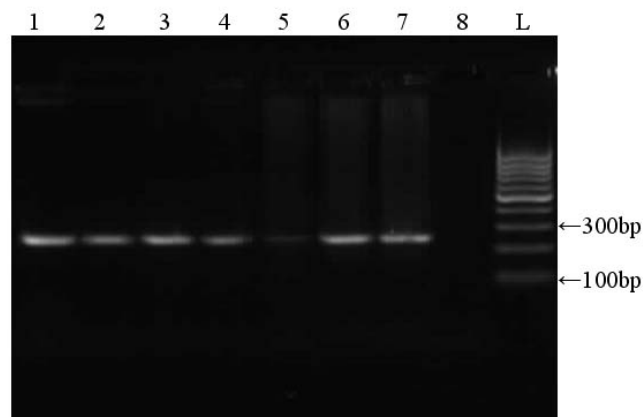
شکل ۳- الکتروفورگرام ژن katG یکی از ایزوله های مقاوم به ایزونیازید میکوباکتریوم توبرکولوزیس مورد مطالعه، که در کدون ۳۱۵ دارای جهش AGC→ACC (Ser→Thr) بود.

همانطور که در جدول ۳ آمده است، ۲۳ مورد (۷۱/۹٪) از جهش های سویه های مقاوم به ایزونیازید مربوط به جانشینی سرین با تره اونین در محل کدون ۳۱۵، ۶ مورد (۱۸/۸٪) مربوط به ناحیه inhA و ۲ مورد (۶/۲٪) مربوط به ناحیه oxyR-ahpC است. در مورد یکی از نمونه های مقاوم به ایزونیازید (۳/۱٪) نیز جهشی در سه ناحیه مورد مطالعه یافت نشد (جدول ۳).

برای اطمینان و تأیید نتایج حاصل از هضم آنزیمی ناحیه katG نمونه ای از محصول PCR این ژن برای سکونسینگ ارسال شد. شکل ۳ الکتروفورگرام مربوطه و محل بروز جهش را نشان می دهد. علاوه بر ژن katG دو ناحیه دیگر از ژنوم سویه های مقاوم به ایزونیازید بررسی شد. PCR ژن inhA و ناحیه oxyR-ahpC محصولاتی با اندازه های ۲۴۸ و ۲۳۷ جفت باز را به وجود آورد که در شکل های ۴ و ۵ قابل مشاهده است.



شکل ۵- ژل الکتروفورز قطعه ۲۳۷ جفت بازی حاصل از oxyR-ahpC PCR L1-4 مربوط به سویه های مورد مطالعه، L5 مربوط به سویه استاندارد H37Rv و نمونه L6 کنترل منفی است. ستون آخر



شکل ۴- ژل الکتروفورز قطعه ۲۴۸ جفت بازی حاصل از inhA PCR. شش نمونه اول مربوط به سویه های مورد مطالعه، نمونه هفتم مربوط به سویه استاندارد H37Rv و نمونه هشتم کنترل

جدول ۳- فراوانی هر یک از جهش‌ها در سویه‌های مقاوم به ایزونیازید

ژن	نوع جهش	تعداد نمونه‌ها	در صد نمونه‌ها
katG	in codon 315 AGC→ACC (Ser→Thr)	۲۳	۷۱/۹٪
inhA	GGG→GAG (Gly→Glu) in codon 26	۲	۶/۳٪
inhA	AAA→AAC (Lys→Asn) in codon 10	۲	۶/۳٪
inhA	G-58C	۱	۳/۱٪
inhA	G-60C	۱	۳/۱٪
oxyR-ahpC	C insertion in 45	۱	۳/۱٪
oxyR-ahpC	G-33A	۱	۳/۱٪
Others	---	۱	۳/۱٪

بحث

هر کدام از آنزیم‌های محدودکننده به کار رفته دارای مزیتی بود. مزیت آنزیم MspI آن است که امکان شناسایی مستقیم جهش AGC→ACC را در katG315 فراهم می‌آورد و مزیت آنزیم MspAII آن است که شناسایی تمام جهش‌های روی داده را در این کدون میسر می‌سازد. همان‌طور که ذکر شد فراوانی جهش در نواحی katG، پروموتور inhA و ناحیه پیش‌ژنی oxyR-ahpC به ترتیب ۷۱/۹، ۱۸/۹ و ۶/۲ درصد تعیین شد. طبق جدول ۴ مطالعات مختلفی که در نواحی جغرافیایی گوناگون در این خصوص انجام گرفته، نتایج متنوع و متفاوتی را ارائه داده است. محدودده درصد فراوانی جهش‌های گزارش شده بسیار وسیع است؛ به طوری که برای katG محدودده ۳۹/۴ تا ۹۱/۳ درصد، برای پروموتور inhA محدودده ۴/۳ تا ۳۴/۴ درصد و برای ناحیه بین ژنی oxyR-ahpC محدودده ۰ تا ۲۸/۵ درصد گزارش شده است (۹ و ۱۰).

همان‌طور که انتظار می‌رفت در مطالعه حاضر، جهش در ژن katG بیشترین مقدار را به خود اختصاص داده است. پس از آن نیز: جهش در ژن inhA و ناحیه

پس از تشخیص صحیح علت بیماری‌های باکتریایی، فراهم نمودن روش‌هایی برای تعیین میزان حساسیت سویه‌های فوق به دارو امری ضروری به نظر می‌رسد. بیشتر محققین شایع‌ترین و مهم‌ترین تغییر ژنتیکی را که در سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکولوزیس مقاوم به ایزونیازید اتفاق می‌افتد، جانشینی سرین با تره‌اونین می‌دانند که در کدون ۳۱۵ ژن katG اتفاق می‌افتد. البته دیدگاه‌های مخالفی نیز در این خصوص وجود دارد (۷ و ۸). حضور این جهش را می‌توان با آنزیم محدودکننده MspI بررسی نمود، چون تغییر توالی مذکور که از GCGG به CCGG است، موجب به وجود آمدن یک سایت برش جدید برای آنزیم مذکور می‌شود. بدین منظور برای تعیین فراوانی جانشینی فوق در سویه‌های مقاوم به ایزونیازید از تجزیه PCR-RFLP استفاده شد. همچنین این کار در روی سویه‌های حساس به ایزونیازید که از مراکز مذکور جدا شده بود، انجام شد تا تأییدی بر عدم وجود جهش در ایزوله‌های حساس باشد. در این مطالعه از MspAII نیز استفاده شد.

جدول ۴- فراوانی جهش های مرتبط با مقاومت به ایزونیازید در مایکوباکتریوم توبرکولوزیس گزارش شده در مطالعات قبلی

منبع	oxyR- ahpC	inhA	سایر نواحی katG	katG S315T	کشور	زمان مطالعه
۱۹	٪۲۳/۷	٪۱۳	-	٪۶۲/۷	انگلستان	۲۰۰۵
۲۰	-	-	-	٪۶۳	ترکیه	۲۰۰۵
۲۱	-	٪۲۵	-	٪۶۵/۴	استرالیا	۲۰۰۵
۲۴	٪۱۱/۵	٪۱۴/۹	-	٪۹۴/۳	چین	۲۰۰۵
۶	-	-	٪۵	٪۶۰	کویت	۲۰۰۴
۲۲	-	٪۱۰/۳	٪۶/۲	٪۸۵/۶	برزیل	۲۰۰۴
۲۳	٪۶/۲	٪۲۲/۲	٪۳/۷	٪۵۹/۲	فیلیپین	۲۰۰۴
۱۱	-	-	-	٪۹۸	روسیه	۲۰۰۴
۷	-	-	-	٪۳۰	لهستان	۲۰۰۴
۸	-	-	-	٪۳۵	بیروت	۲۰۰۲
۹	٪۰	٪۴/۳	٪۹/۱	٪۵۸	اسپانیا	۲۰۰۲

مقاومت به ایزونیازید در سویه های مایکوباکتریوم توبرکولوزیس در ایران پردازد، یافت نشد.

با توجه به موارد مذکور معرفی آزمایش غربالگری ژنوتیپیک مناسب برای بررسی سویه های مقاوم ایزونیازید ضروری به نظر می رسد. از سویی نیز نواحی ژنتیکی مرتبط با مقاومت به ایزونیازید باعث می شود که انجام یک آزمایش غربالگری به تنهایی نتواند جواب گوی انواع جهش هایی باشد که مقاومت به ایزونیازید را در پی دارد؛ لذا می بایست بیشتر به آزمایش هایی توجه نمود که در عین سادگی و دقت بالا، بتواند تعداد زیادی از ایزوله های مقاوم را شناسایی کند.

در تأیید تحقیقات قبلی، در مطالعه ما هیچ کدام از سویه های حساس، جهش S315T را دارا نبودند که نشان از ویژگی بالای این نوع جهش است (۹) و نیز حذف کامل ژن های katG، inhA یا ahpC مشاهده نشد.

oxyR-ahpC بیشتر موارد را تشکیل داده است. بدین ترتیب می توان نتیجه گرفت که با در نظر گرفتن این نوع جهش ها می توان در حدود ۹۷ درصد از سویه های مقاوم به ایزونیازید را تشخیص داد. در مطالعه ای که انجام شد تمام جهش های مربوط به ژن katG در کدون ۳۱۵ و به صورت تغییر از سرین به تراهونین اتفاق افتاد که حاکی از فراوانی بسیار بالای این نوع جهش در نمونه های مورد مطالعه است. فراوانی سویه های مایکوباکتریوم توبرکولوزیس مقاوم ایزونیازید که دارای جهش در کدون ۳۱۵ ژن katG هستند، نیز در نقاط مختلف جغرافیایی متفاوت است (جدول ۴). بیشترین میزان شیوع جهش S315T ژن katG در سویه های مقاوم ایزونیازید مایکوباکتریوم توبرکولوزیس از روسیه و چین (بیش از ۹۰ درصد) و کمترین مقدار از لهستان و لبنان (حدود ۳۰ درصد) گزارش شده است (۷، ۸، ۱۱ و ۱۲).

به کمک تکنیک مذکور انجام گرفت، حدود ۷۲ درصد از نمونه‌های مقاوم به ایزونیازید تشخیص داده شد. البته باید توجه داشت که تشخیص جهش مذکور به تنهایی قادر به معرفی تمام سویه‌های مقاوم ایزونیازید نیست. از جمله مزایای این آزمایش می‌توان به عدم استفاده از ایزوتوپ‌های رادیواکتیو، سرعت عمل، ارزانی و عدم نیاز به دستگاه‌های گران‌قیمت اشاره کرد. البته باید ذکر نمود که بسیاری از جهش‌ها را هم نمی‌توان با این روش ردیابی کرد، زیرا رابطه‌ای بین سایت برش آنزیم‌های محدودکننده و جهش وجود ندارد.

در ادامه پیشنهاد می‌گردد که در مطالعه‌ای گسترده‌تر و نمونه‌هایی بیشتر به بررسی انواع جهش‌های مرتبط با مقاومت به انواع مختلف داروهای ضد سلی پرداخته شود، چون نتایج مطالعه حاضر به واسطه محدود بودن نمونه‌ها تنها می‌تواند گویای این حقیقت باشد که جهش‌های گزارش شده در سایر کشورها در ایران نیز به چشم می‌خورد، ولی نمی‌توان نتایج حاصل از آن را به سایر استان‌ها و مراکز تعمیم داد.

تشکر و قدردانی

از زحمات آقایان دکتر بهره‌مند، صالحی، کریمی، رادی، عجمی، حسن‌زاده و همایی و سرکارخانم دکتر فرنی که ما را در انجام این تحقیق یاری دادند، صمیمانه سپاس‌گزاریم.

وجود دارد که دلالت بر احتمال حذف کامل یا جزئی katG دارد (۱۴). برخلاف برخی مطالعات، تنوع زیادی در بین جهش‌های هر یک از ژن‌های دخیل در مقاومت به ایزونیازید دیده نشد (۱۵)، به طوری که در مورد ژن‌های katG، inhA و ahpC به ترتیب ۱، ۴ و ۲ نوع جهش در ایزوله‌های مقاوم به ایزونیازید مشاهده شد که البته موارد مشابهی قبلاً گزارش شده بود (۱۶ و ۱۷).

گرچه سکونسینگ DNA آمپلی‌فای شده کدون ۳۱۵ ژن katG می‌تواند امکان شناسایی تمام انواع جهش‌های این ناحیه را فراهم آورد، این روش نسبتاً گران و وقت‌گیر است و نمی‌توان از آن به عنوان روشی معمول در مناطق مختلف استفاده نمود. به این دلیل روش‌های ساده مانند PCR-RFLP مناسب‌تر است. در این خصوص، PCR-RFLP با استفاده از آنزیم‌های MspAII و MspI قادر به تشخیص انواع جهش‌هایی خواهد بود که در ناحیه 315 ژن katG اتفاق می‌افتد. این آزمایش برای تسهیل در شناسایی سویه‌های چند مقاومتی (MDR) به کار می‌رود. حساسیت و ویژگی این روش به ترتیب ۹۹/۵ و ۱۰۰ درصد تعیین شده که بسیار شبیه به سکونسینگ است (۱۸). این روش برخلاف برخی از تکنیک‌های آزمایشگاهی به راحتی قابل‌اندازی و نسبتاً ارزان است و در مدت‌زمان کوتاهی، نتایج دقیق و مطمئنی را فراهم می‌آورد. برای مثال در مطالعه‌ای که

Abstract:***Study of Mutations Associated with Isoniazid-Resistance in Clinical Mycobacterium Tuberculosis Strains, Tehran and Isfahan Province Tuberculosis Centers by PCR and RFLP-Based Technique (2004-5)***

Tavakoli, A.¹; Mohajeri, P.²; Shojai, H.³; Yazdani, R.⁴; Moghim, Sh.⁴; Nasr Isfahani, B.⁴

1. Professor of Microbiology, Faculty of Medicine, Isfahan university of medical sciences, Isfahan, Iran.

2. PhD student of Medical Bacteriology, Faculty of Medicine, Isfahan university of medical sciences, Isfahan.

3. Associate professor of Microbiology, Faculty of Medicine, Isfahan university of medical sciences, Isfahan, Iran.

4. Assistant professor of Microbiology, Faculty of Medicine, Isfahan university of medical sciences, Isfahan, Iran.

Background & Objectives: *Although isoniazid is the most efficient in killing the tuberculosis bacilli, resistance to this drug also develops most readily. Mutations in katG, inhA and ahpC are responsible for isoniazid resistance in a large proportion of tuberculosis cases. The frequency of these mutations varies with population samples, however. This study provided the first molecular characterization of Isoniazid-resistance in M. Tuberculosis strains that is widely applicable for rapid drug resistance detection.*

Materials and Methods: *The study was a descriptive and analytical and the presence of mutations in specific regions of the katG, inhA and ahpC genes was analyzed in 32 M. tuberculosis Isoniazid-resistant strains in Isfahan and Tehran. To determine the mutations in codon 315 of katG, PCR-RFLP technique was performed. In this way, 355 bp PCR products were digested by MspI and MspAII. Mutations in inhA and ahpC genes were detected by sequencing.*

Results: *The frequency of mutations in the katG 315(Ser→Thr), inhA and ahpC were detected in 71.9%, 18.9% and 6.2% of the 32 Isoniazid resistant isolates, respectively. Mutation was not found in one of the isolates.*

Conclusion: *The PCR-RFLP with MspI, being able to detect katG Ser315Thr substitution, can identify more Isoniazid-resistant strains with mutations at codon 315 in the katG. Elucidation of the molecular basis of Isoniazid resistance in M. tuberculosis has led to the development of different genotypic approaches for the rapid detection of Isoniazid resistance in clinical isolates. The results also suggest that the detection of the Ser315Thr in the katG gene may be used as a rapid screening method for identifying Isoniazid-resistant clinical M.tuberculosis isolates recovered from Isfahan and Tehran tuberculosis centers.*

منابع

1. Nikolayevsky V, Brown T, Balabanova Y, Ruddy M, Fedorin I, Drobniewski F. Detection of mutations associated with Isoniazid and Rifampin resistance in Mycobacterium tuberculosis isolates from Samara region, Russian Federation. *J Clin Microbiol* 2004; 42(10):4498-502
2. Ramaswamy S, Musser JM. Molecular genetic basis of antimicrobial resistance in Mycobacterium tuberculosis: 1998 update. *Tubercle Lung Dis* 1998; 79(1):3-29
3. Tavakoli A, Safaee HG, Navvabakbar F, Salehi M, Bahreman A, Isfahani BN. Mutations in the rpoB gene of rifampin resistant Mycobacterium tuberculosis isolated from Isfahan by PCR-SSCP. *J Sci* 2005; 16(2):131-8
4. Canetti G, Forman S, Grosset J, Hauduroy P, Langerova M, Mahler HT, Meissner G, et al. Laboratory methods for testing drug sensitivity and resistance. *Bull World Org* 1963; 29:565-6
5. TA Brown. Gene cloning and DNA analysis. 4th ed. Oxford: Blackwell Science; 2001, PP. 33-5
6. 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 the Middle East. *J Antimicrob Agent* 2004; 23:473-9
7. Wojtyczka RD, Dworniczak S, Panch J, Idazik D, Kepa M, Wydmuch Z, et al. PCR-RFLP analysis of a mutation in codon 315 and 463 of the katG gene of Mycobacterium tuberculosis isolates from patients in Silesia, Poland. *Pol J Microbiol* 2004; 53(2):89-93
8. Ahmad S, Fares E, Araj GF, Chaug TD, Mustafa AS. Prevalence of S315T mutation within the katG gene in isoniazid-resistant clinical Mycobacterium tuberculosis isolates from Dubai and Beirut. *Int J Tuberc Lung Dis* 2002; 6:920-6
9. Torres MJ, Criado A, Gonzalez N, Palomares JC, Aznar J. Rifampin and isoniazid resistance associated mutations in Mycobacterium tuberculosis clinical isolates in Seville, Spain. *Int J Tuberc Lung Dis* 2002;6:160-3
10. William DL, Waguespack C, Eisenach K. Characterization of rifampin resistance in pathogenic Mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38:2380-6
11. Shemyakin IG, Stepanshina VN, Ivanov IY, Lipin MY, Anisimova VA, Onasenko AG, et al. Characterization of drug-resistant isolates of Mycobacterium tuberculosis derived from Russian inmates. *Int J Tuberc Dis* 2004; 8(10):1194-203
12. Zhang M, Yue J, Yang YP, Lei JQ, Jin EL, Zhang XL, et al. Detection of mutation associated with isoniazid

13. Makaigawa J, Endoh M, Yanagawa Y, Morozumi S. Anti-drug pattern of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* and analysis of mutation in drug-target genes. *Kansenshogaku Zasshi* 2005; 79(6):388-96
14. Zhang Y, Heym B, Allen B, Young D, Cole S. The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature* 1992; 358(6387):591-4
15. Nair J, Rouse DA, Bai Gh, Morris SL. The rpsL gene and streptomycin resistance in single and multiple drug resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* 1993; 19(3):521-7
16. Sreevatsan S, Pan X, Zhang Y, Deretic V, Musser JM. Analysis of the oxyR-ahpC region in isoniazid-resistant and susceptible *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms recovered from diseased humans and animals in diverse localities. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41:600-6
17. Ramaswamy SV, Reich SJ, Dou I, Japerse X. Single nucleotide polymorphism associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agent Chemother* 2003; 47:1241-50
18. Bakonyte D, Baranauskaitė A, Cicinaite J, Sosnovskaja A, Stakenas P. Molecular characterization of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in Lithuania. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2003; 47(6):2009-11
19. Baker LV, Brown TJ, Maxwell O, Gilson AL, Fang Z, Yates MD. Molecular analysis of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from England and Wales reveals the phylogenetic significance of the ahpC-46A polymorphism. *Antimicrobial Agents Chemother* 2004; 49(4):1455-64
20. Aktas E, Durmaz R, Yang D, Yang Z. Molecular characterization of isoniazid and rifampin resistance of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Malatya, Turkey. *Microb Drug Resist* 2005; 11(2):94-9
21. Lavender C, Globan M, Sievers A, Billman-Jacobe H, Fyfe J. Molecular characterization of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates collected in Australia. *Antimicrobiol Agents Chemother* 2005; 49(10): 4068-74
22. Cardoso RF, Cooksey RC, Morlock GP, Barco P, Cecon L, Forestiero F, et al. Screening and characterization of mutations in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates obtained in Brazil. *Antimicrobial Agents Chemother* 2004; 48(9):3373-81
23. Herrera L, Valverde A, Saiz P, Saez JA, Portero JL, Jimenez MS. Molecular characterization of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical strains isolated in the Philippines. *Int J Antimicrob Agents* 2004; 23:572-6