مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره پنجم ـ شماره اول ـ بهار ۹۰
صفحات ۱۹ الی ۲۴

مقاله پژوهشی
(Original Article)

شناسایی مقاومت مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به ریفامپین توسط روشPCR (Multiplex Allele Specific)

فریده دین محمدی[۱]، پریسا فرنیا[۲]، علیرضا بیگلری[۳]، مهدی کاظم‌پور[۴]، محمدرضا مسجدی[۵]، علی‌اکبر ولایتی[۶]

[۱]دانشجوی کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، زنجان، ایران.
[۲]دانشیار میکروبیولوژی پزشکی، مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.
[۳]استادیار ژنتیک انسانی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران.
[۴]کارشناس ارشد آمار، مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.
[۵]استاد بیماری‌های ریه، مرکز تحقیقات سل و بیماری‌های ریوی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.
[۶]استاد بیماری‌های عفونی اطفال، مرکز تحقیقات سل و بیماری‌های ریوی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: مایکوباکتریوم توبرکلوزیس همچنان به‌عنوان شایع‌ترین علت مرگ‌های مرتبط با عوامل بیماریزای عفونی در جهان مطرح است. ریفامپین نیز از مهم‌ترین داروهای خط اول درمان بیماری سل می‌باشد. شایع‌ترین موتاسیون‌های مرتبط با مقاومت به داروی ریفامپین در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بر اثر جابه‌جایی در کدون‌های ۵۳۱، ۵۲۶ و ۵۱۶ در ژن rpoB اتفاق می‌افتد. این مطالعه با هدف معرفی روش PCR (Multiplex Allele Specific) برای شناسایی بیماران مبتلا به سل مقاوم به ریفامپین از طریق یافتن موتاسیون‌های ایجادشده در ژن rpoB صورت گرفت.

روش بررسی: در این پژوهش، وجود جهش در ۳ کدون ژن rpoB در ۹۰ نمونه کشت مثبت بیماران مسلول ریوی مراجعه‌کننده به مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی واقع در بیمارستان مسیح دانشوری تهران در سال ۱۳۸۷-۱۳۸۵ پس از انجام تست‌های حساسیت دارویی، بررسی گردید. برای ارزیابی جهش در ۳ کدون ۵۳۱، ۵۲۶ و ۵۱۶ از روش MAS-PCR استفاده شد.

یافته‌ها: براساس نتایج کشت، ۳۳/۳٪ از نمونه‌ها حساس و ۶۶/۶٪ مقاوم به دارو بودند که از این میزان نمونه مقاوم به دارو، ۴۴/۴٪ مقاوم به ریفامپین بودند. با استفاده از روش MAS-PCR، ۳۲/۲٪ از این مقاومت‌ها شناسایی گردید که ۴۳/۴٪ دارای موتاسیون در کدون rpoB531، ۳۴/۵٪ دارای موتاسیون در کدون rpoB526 و ۳۱٪ دارای موتاسیون در کدون rpoB516 بودند.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد روش MAS-PCR، روشی دقیق و مناسب برای تشخیص سریع مقاومت به ریفامپین در نمونه‌های کلینیکی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می‌باشد.

کلید واژه‌ها: مایکوباکتریوم توبرکلوزیس؛ مقاومت دارویی؛ ریفامپین؛ واکنش زنجیره‌ای پلیمراز.

نویسنده مسئول مکاتبات: مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران؛
تلفن: ۰۲۱-۲۰۱۰۹۵۰۵ آدرس پست الکترونیکی: pfarnia@hotmail.com

تاریخ دریافت: ۸۸/۱۱/۶ تاریخ پذیرش: ۸۹/۴/۲۲

مقدمه

مایکوباکتریوم توبرکلوزیس همچنان به‌عنوان شایع‌ترین علت مرگ‌های مرتبط با عوامل بیماریزای عفونی در جهان شناخته می‌شود. سل مقاوم به چند دارو، یکی از درمان‌های سخت در کنترل سل می‌باشد؛ زیرا شیمی‌درمانی استاندارد کوتاه‌مدت با داروهای ضد سل تنها از مرحله اول درمان می‌کاهد و می‌تواند عامل مرگ و میر بالا، میزان درمان ناکارآمد و افزایش دوره سرایت بیماری باشد (۱). تشخیص اولیه بیماری و شناسایی سریع مقاومت داروهای اولیه ضد

سلی برای درمان مؤثر و کنترل سل مقاوم به دارو ضروری است. طبق توصیه بهداشت جهانی قبل از تجویز آنتی‌بیوتیک باید حساسیت باکتری به انواع داروهای مورد استفاده مشخص گردد. در سال‌های اخیر فراوانی افراد مبتلا به سل مقاوم به چند دارو، افزایش یافته است که گستره‌ای بین ۷۷-۱۵٪ را شامل می‌شود (۲). در ایران شیوع مقاومت در دست‌کم یک دارو ۵٪ و شیوع مقاومت به ایزونیازید و ریفامپین در موارد قبلاً درمان‌شده، ۴۸/۲٪ می‌باشد (۳). طبق مطالعه‌ای که در ایران سال ۲۰۰۷ انجام گرفت، میزان مقاومت چند دارویی در بیماران جدید ۲/۶٪ در مقابل ۵۶٪ بیمارانی بود که قبلاً درمان شده بودند (۴). انجام آزمایش‌های مرسوم تعیین حساسیت در مورد مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، نیاز به حداقل ۴-۳ هفته زمان دارد. امروزه روش‌های مطمئن مولکولی جانشین روش‌های مرسوم شده است. برخی از این روش‌ها سریع، ارزان و در عین حال دقیق هستند (۳). ریفامپین از مهم‌ترین داروهای خط اول درمان بیماری سل می‌باشد. در تحقیقات زیادی مشاهده گردید که ۹۸-۹۵٪ از مقاومت‌های ایجادشده به ریفامپین در سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به ریفامپین، به‌علت موتاسیون در ژن rpoB که کدکننده زیرواحد بتای آنزیم RNA پلیمراز است، اتفاق می‌افتد (۵). این موتاسیون‌ها عموماً یک ناحیه ۸۱bp از ژن rpoB بین کدون‌های ۵۳۳-۵۰۷ را در برمی‌گیرند (۶). در طی سال‌های اخیر انواع و اشکال موتاسیون‌های منجر به مقاومت در برابر ریفامپین مشخص گردیده است. شایع‌ترین موتاسیون‌های مرتبط با مقاومت به داروهای ریفامپین در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به ترتیب شامل: جابه‌جایی در کدون‌های ۵۳۱، ۵۲۶ و ۵۱۶ در ژن rpoB است. موتاسیون در ۳ کدون ۵۳۱، ۵۲۶ و ۵۱۶ rpoB، عامل ۹۵-۷۰٪ مقاومت‌های ریفامپین می‌باشد (۷). هدف از این مطالعه ارائه روش MAS-PCR برای شناسایی بیماران مبتلا به سل مقاوم به ریفامپین، از طریق شناسایی موتاسیون‌های ایجادشده در ژن rpoB می‌باشد. در این روش از ترکیبات چند پرایمری جهت تکثیر بیش از یک ناحیه خاص در ژنوم هر واکنش استفاده شده است.

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی پس از تأیید میکروبی سویه‌های جمع‌آوری‌شده طی سال‌های ۱۳۸۷-۱۳۸۵ از مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی پژوهشکده سل و بیماری‌های ریوی (۹۰ نمونه کشت مثبت بیماران مسلول ریوی) با استفاده از روش MAS-PCR، نوع جهش‌های مرتبط با مقاومت به ریفامپین بررسی شد. جداسازی اولیه سویه‌های مایکوباکتریوم با روش پتروف ۴٪ و با استفاده از محیط L.J (Lowenstein Jensen) انجام گردید، برای شناسایی سویه‌ها از تست‌های بیوشیمیایی مانند: نیاسین، فعالیت کاتالاز، احیای نیترات استفاده شد. حساسیت دارویی در برابر ایزونیازید (۰/۲μg/ml)، ریفامپین (۴۰μg/ml)، استرپتومایسین (۱۰μg/ml) و اتامبوتول (۲μg/ml) به روش تناسبی انجام و سویه‌ها با توجه به حساس بودن و مقاوم به داروهای فوق، شناسایی شدند (۸).

برای استخراج DNA، PCR باکتری‌های رشدکرده بر سطح محیط کشت لونشتاین جانسون جمع‌آوری و پس از غیرفعال کردن با حرارت 80° به مدت یک ساعت، استخراج DNA از باکتری به روش CTAB به شرح ذیل انجام گرفت:

ابتدا نمونه‌های حاوی سوسپانسیون باکتری غیرفعال به کمک بافر TE1x ۳ بار شستشو داده شد. در مرحله بعد TE1x و لیزوزیم را به نمونه‌ها اضافه کرده و در دمای $37^{\circ}C$ انکوبه شد. سپس با استفاده از ۱۰٪ SDS و پروتیناز K و انکوباسیون در دمای $56^{\circ}C$-۵۵ عمل تخریب دیواره سلولی انجام گرفت. در مرحله بعد به همه رسوب‌ها ۵M Nacl و در ادامه CTAB/Nacl اضافه گردید و در $60^{\circ}C$ انکوباسیون شدند. برای جداسازی پروتئین از کلروفرم/ایزوآمیل الکل به همراه سانتریفوژ (با دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۵دقیقه) استفاده گردید. در ادامه به فاز رویی، ایزوپروپانل اضافه نموده و در دمای $-20^{\circ}C$ انکوبه شد. در مرحله بعد، سانتریفوژ با دور ۱۲۰۰۰ ابتدا به مدت ۱۵ دقیقه و پس از اضافه نمودن الکل ۷۰٪ به رسوب، به مدت ۲-۱ دقیقه انجام شد. مرحله آخر حذف RNA بود که توسط آنزیم RNAase صورت گرفت (۹). پس از استخراج DNA از سلول‌های کشت از روش MAS-PCR با ۳ PCR مختلف برای ۳ الل اختصاصی کدون‌های rpoB (کدون ۵۱۶، ۵۲۶ و ۵۳۱) استفاده شد (۱۰). پرایمرهای داخلی فوروارد (R531B, R526B, R516) طوری قرار داده می‌شوند که انتهای ′۳-OH این پرایمرها با باز دوم از کدون‌های مربوطه در الل وحشی جفت می‌شود. اگر موتاسیونی در موقعیت rpoB531/526/516 وجود نداشته باشد، قطعات الل اختصاصی تیپ وحشی (۱۶۷ یا ۱۸۱ یا ۲۱۴ به ترتیب) به‌وسیله پرایمر ریورس RIR و یک پرایمر داخلی فوروارد امپلی‌فایل می‌شود. وجود موتاسیون در کدون‌های مربوط، موجب عدم تطابق در انتهای ′۳ این کدون‌ها با

پرایمر داخلی تیپ وحشی گردیده و بنابراین محصول PCR فاقد الل اختصاصی می‌باشد. ۲ پرایمر خارجی ROF و RIR در ناحیه rpoB تحت مطالعه (موقعیت ۱۵۰۰-۱۲۵۲ rpoB) در استرین H37Rv و همه استرین‌ها یک قطعه ۲۴۹bp را امپلی‌فایل می‌کنند. بنابراین این قطعه آمپلی‌فایل‌شده در همه استرین‌ها (وحشی و موتانت) ثابت است. فقدان هریک از قطعات ۱۶۷bp، ۱۸۱bp و ۲۱۴bp به ترتیب در اثر موتاسیون در کدون‌های ۵۳۱، ۵۲۶ و ۵۱۶ می‌باشد. توالی پرایمرهای استفاده‌شده در این مطالعه در جدول شماره ۱ آمده است.

جدول شماره ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده در روش MAS-PCR

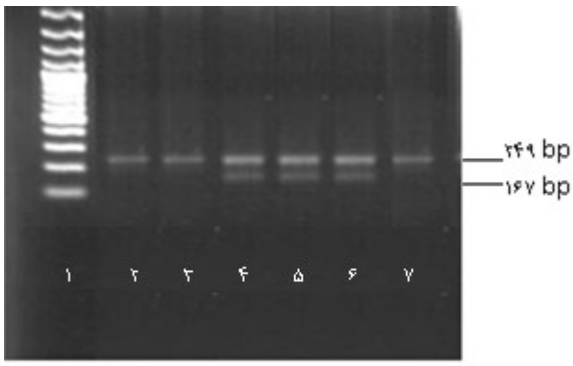
پرایمرها	توالی
ROF	5′-GTCGCCGCGATCAAGGA
RIR	5′-TGACCCGCGCGTACAC
R531B	5′-ACAAGCGCCGACTGTC
R526B	5′-GTCGG GGTTGACCCA
R516B	5′-GCTGAGCCAATTCATGGA

از پرایمرهای ROF و RIR به‌عنوان پرایمرهای خارجی و R531B، R526B و R516B به‌عنوان پرایمرهای الل اختصاصی داخلی استفاده شد. سیکل حرارتی برای انجام PCR برای کدون R531B شامل: دمای اولیه $94^{\circ}C$ به مدت ۴ دقیقه، ۳۰ سیکل به‌صورت: $94^{\circ}C$ به مدت ۳۰ ثانیه، $57^{\circ}C$ به مدت ۳۰ ثانیه، $72^{\circ}C$ به مدت ۱ دقیقه، دمای پایانی $72^{\circ}C$ به مدت ۷ دقیقه، $4^{\circ}C$ به مدت ۱ دقیقه بود (شکل شماره ۱).

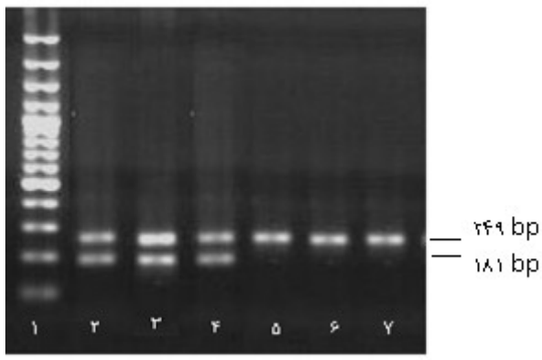
سیکل حرارتی برای انجام PCR کدون rpoB526 شامل: دمای اولیه $94^{\circ}C$ به مدت ۴ دقیقه، ۳۰ سیکل به‌صورت: $94^{\circ}C$ به مدت ۳۰ ثانیه،$58/8^{\circ}C$ به مدت ۳۰ ثانیه، $72^{\circ}C$ به مدت ۱ دقیقه و دمای پایانی $72^{\circ}C$ به مدت ۷ دقیقه، $4^{\circ}C$ به مدت ۱ دقیقه بود (شکل شماره ۲).

سیکل حرارتی برای انجام PCR برای کدون rpoB516 شامل: دمای اولیه $94^{\circ}C$ به مدت ۴ دقیقه، ۳۰ سیکل به‌صورت: $94^{\circ}C$ به مدت ۳۰ ثانیه، $53/7^{\circ}C$ به مدت ۳۰ ثانیه، $72^{\circ}C$ به مدت ۱ دقیقه و دمای پایانی $72^{\circ}C$ به مدت ۷ دقیقه، $4^{\circ}C$ به مدت ۱ دقیقه بود (شکل شماره ۳).

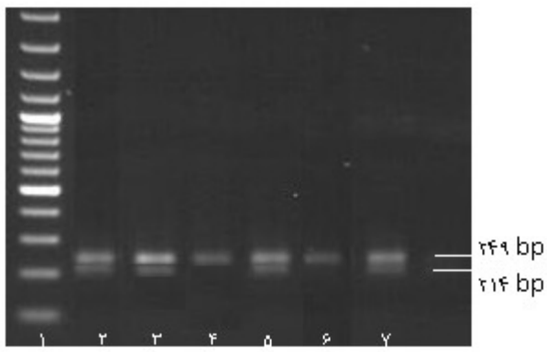
محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ الکتروفورز شد.



شکل شماره ۱: آزمون MAS-PCR و تکثیر کدون ۵۳۱ از rpoB. ستون ۱ مارکر ۱۰۰ bp، ستون‌های ۲، ۳ و ۷، سه نمونه دارای موتاسیون در کدون rpoB 531، ستون ٤ سوش استاندارد H37RV، ستون‌های ٥ و ٦ دو نمونه فاقد موتاسیون در این ناحیه



شکل شماره ۲: آزمون MAS-PCR و تکثیر کدون ٥٢٦ از rpoB. ستون ۱ مارکر ۱۰۰ bp، ستون ۲ سوش استاندارد H37RV، ستون‌های ۳ و ٤، دو نمونه فاقد موتاسیون در کدون rpoB526، ستون‌های ٥، ٦ و سه نمونه دارای موتاسیون در این ناحیه



شکل شماره ۳: آزمون MAS-PCR و تکثیر کدون ٥١٦ از rpoB. ستون ۱ مارکر ۱۰۰bp، ستون ۲ سوش استاندارد H37RV، ستون‌های ۳، ٥ و ۷ نمونه‌های فاقد موتاسیون در کدون rpoB 516، ستون‌های٤ و ٦، دو نمونه دارای موتاسیون در این ناحیه

یافته‌ها

در این مطالعه، ۹۰ نمونه جمع‌آوری‌شده از مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی طی سال‌های ۱۳۸۸-۱۳۸۷ برای تعیین حساسیت دارویی، کشت و آنتی‌بیوگرام گردید. نتیجه روش پروپورشن نشان داد که ۳۰ نمونه (۳۳/۳٪) حساس و ۶۰ نمونه (۶۶/۶٪) مقاوم به دارو می‌باشند. از این ۶۰ نمونه، ۳۷ نمونه (۴۴/۴٪) مقاوم به ریفامپین بودند. با استفاده از روش MAS-PCR برای شناسایی موتاسیون‌های ایجادشده در مناطقی از rpoB، ۲۹ نمونه (۳۲/۲٪) مقاوم به ریفامپین شناسایی شد. موتاسیون در کدون‌های ۵۱۶، ۵۲۶ و ۵۳۱ پس از استانداردسازی PCR به‌طور موفقیت‌آمیزی به‌وسیله تست‌های PCR اختصاصی هر کدون شناسایی گردید. ۱۲ نمونه از ۲۹ نمونه (۴۳/۴٪) دارای موتاسیون در کدون rpoB531، ۱۰ نمونه (۳۴/۵٪) دارای موتاسیون در کدون rpoB526 و ۹ نمونه (۳۱٪) دارای موتاسیون در کدون rpoB516 بودند. در مقایسه روش مولکولی استفاده‌شده با روش کشت به‌عنوان استاندارد طلایی، از ۹۰ نمونه ۵۲ مورد با هر دو روش حساس و ۲۸ مورد مقاوم به ریفامپین تشخیص داده شدند. ۹ نمونه با روش کشت، مقاوم ولی با روش مولکولی، حساس به ریفامپین و یک نمونه برعکس با روش کشت، حساس و با روش مولکولی مقاوم به ریفامپین تشخیص داده شدند.

بحث

آخرین گزارش منتشرشده از وضعیت مقاومت چند دارویی در دنیا، بیانگر شیوع این نوع مقاومت در مناطق مختلف دنیا است که البته این شیوع از شدت و ضعف متفاوتی در نقاط مختلف برخوردار است (۱۱). در این گزارش از برخی نقاط همچون ناحیه اروپای شرقی و روسیه به‌عنوان مناطق دارای شیوع بالای سل مقاوم به چند دارو نام برده شده است. ایران نیز از جمله سایر نقاط ذکرشده به‌عنوان منطقه دارای شیوع بالای سل مقاوم به چند دارو می‌باشد. مطالعات انجام‌شده براساس آمار مقاومت دارویی ضد سلی و برنامه‌های کنترل سل کشورهای مختلف، بیانگر تأثیر عوامل مختلف بر پیدایش مقاومت دارویی است. مقاومت دارویی ارتباط نزدیکی با نسبت بیماران سلی دارای سابقه درمان قبلی شناسایی‌شده در هر کشور دارد. این دسته بیماران منبع عمده باسیل مقاوم به درمان در یک جامعه هستند. این بیماران همچنین منبع عمده گسترش بیماری سل در یک جامعه می‌باشند؛ زیرا بیماری آنها طولانی‌تر از سایرین است (۱۲). بنابراین غربالگری این بیماران برای کنترل سل مقاوم به دارو امری ضروری به‌نظر می‌رسد. ریفامپین یکی از کلیدی‌ترین داروهای ضد سل محسوب می‌شود. این دارو از طریق تداخل با زیرواحد بتای آنزیم (rpoB) RNA Polymerase عمل می‌کند. موتاسیون در لوکوس rpoB موجب تغییراتی در فرم فضایی آنزیم شده و این امر موجب می‌گردد، تا اتصال دارو به rpoB مختل و در نتیجه منجر به مقاومت ایزوله‌های(Mycobacterium Tuberculosis (MTB گردد (۱۳). در تحقیقی که توسط Igor Makrousov و همکارانش در سال ۲۰۰۳ انجام گرفت، جهش در ۳ کدون ۵۱۶، ۵۲۶ و ۵۳۱ ژن rpoB، در سویه‌های مایکوباکتریوم جداسازی‌شده از روسیه بررسی گردید. ۸۶/۱٪ سویه‌های مقاوم به RIF در ۲۸۷ سویه مقاوم در روسیه در این ۳ کدون جهش داشتند (۱۴). در مطالعه‌ای که توسط فرحنوش دوستدار در ایران (سال ۱۳۸۶) انجام شد، فراوانی موتاسیون‌ها ژن rpoB سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بررسی شد. در این تحقیق، تعداد ۲۵ نمونه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به ریفامپین و ۵۰ مایکوباکتریوم توبرکلوزیس حساس به ریفامپین جداشده از بیماران، انتخاب گردید. ژن rpoB کلیه نمونه‌های انتخاب‌شده پس از تکثیر به‌وسیله PCR، کاملاً تعیین توالی شد؛ تا انواع و فراوانی موتاسیون‌های مرتبط با مقاومت به ریفامپین در این ناحیه بررسی شود. براساس نتایج حاصل، ۹۶٪ از سویه‌های مقاوم به ریفامپین، تغییرات ژنتیکی در ژن rpoB را نشان دادند و ۷۲٪ از سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به ریفامپین دارای موتاسیون‌های Missense بودند که منجر به عوض شدن اسید آمینه در کدون ۵۳۱ (۶۰٪) و کدون ۵۱۶ (۸٪) در ناحیه مرکزی ژن rpoB گردید، درحالی‌که بیشترین تغییر در کدون ۵۳۱ مشاهده شد، فراوانی موتاسیون در ۲ کدون شایع دیگر یعنی ۵۲۶ و ۵۱۶ متفاوت از فراوانی موتاسیون گزارش‌شده از سایر نقاط دنیا بود (۱۵). در مطالعه حاضر با استفاده از روش پورپورشن به‌عنوان «استاندارد طلایی» از ۹۰ نمونه، ۵۲ مورد با هر دو روش، حساس به ریفامپین و ۲۸ مورد مقاوم بودند. ۹ نمونه با روش کشت، مقاوم

ولی با روش مولکولی، حساس به ریفامپین و یک نمونه برعکس با روش کشت، حساس و با روش مولکولی، مقاوم به ریفامپین تشخیص داده شدند. عوامل متعددی در عدم شناسایی مقاومت دخیل هستند. مطالعات قبلی نشان داده است در این نمونه‌ها، موتاسیون ممکن است در ناحیه خارج از ناحیه مورد بررسی این مطالعه انجام گرفته باشد (۱۶). احتمال دیگر آن است که در این استرین‌های مقاوم، سایر موتاسیون‌های نادر ژن rpoB صورت گرفته و یا مخلوطی از سویه‌های مقاوم همراه با سویه‌های حساس وجود داشته است، و یا به احتمال کمتر مکانیسم‌های دیگر مقاومت دخیل بوده‌اند (۱۷). همچنین در این مطالعه، مشخص گردید کدون ۵۳۱ رایج‌ترین محل بروز موتاسیون است که این یافته‌ها با نتایج گزارش‌شده از سایر نقاط جهان و همچنین با پژوهش صورت گرفته در ایران توسط دوستدار و همکارانش همخوانی دارد. فراوانی بروز موتاسیون در ۲ کدون رایج دیگر یعنی کدون‌های ۵۲۶ و ۵۱۶ در استرین‌های مورد بررسی در مطالعه حاضر، متفاوت از نواحی جغرافیایی دیگر بود (۱۸). میزان بالای موتاسیون در ژن rpoB به‌ویژه کدون‌های بررسی‌شده در تحقیق حاضر برای نمونه‌های ایرانی، تأییدکننده این مطلب است که غربالگری این ناحیه ژنی برای تعیین مقاومت به ریفامپین در نمونه‌های کلینیکی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس جداشده از ایران مناسب می‌باشد. در روش MAS-PCR علاوه بر سادگی و ارزان بودن نسبت به روش‌های دیگر، می‌توان در مدت زمان کمتری نتایج دقیق و مطمئنی را به دست آورد. همچنین مطالعه این روش بر روی نمونه‌های مستقیم بیمار در حال انجام است.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد MAS-PCR روشی دقیق و مناسب برای تشخیص سریع مقاومت به ریفامپین در نمونه‌های کلینیکی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می‌باشد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همکاری مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی آزمایشگاه رفرانس سل کشوری و همچنین از پرسنل این مرکز به خاطر کمک‌های آزمایشگاهی روتین تشکر و قدردانی می‌گردد.

References:

1. Cheng X, Zhang J, Yang L, Xu X, Liu J, Yu W, Su M, Hao Xi. A New Multi-PCR-SSCP Assay for Simultaneous Detection of Isoniazid Andrifampin Resistance in Mycobacterium Tuberculosis. Journal of Microbiological Methods 2007;70:301-305.

2. Soo-Young K, Yeon-Joon P, Eunsil S, Hyunjung J, Cheolmin K. Evaluation of the CombiChip Mycobacteriak Drug-Resistance Detection DNA Chip for Identifying Mutations Associated with Resistance to Isoniazid and Rifampin in Mycobacterium Tuberculosis. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 2006;54:203-210.

3. Doustdar F. High Frequency of Mutations in the rpoB Gene in Rifampicin-Resistant Clinical Isolates of Mycobacterium Tuberculosis from Iran. International Journal of Antimicrobial Agents 2007.

4. Mirsaeidi MS, Tabarsi P, Farnia P, Ebrahimi G. Trends of Drug Resistant Mycobacterium Tuberculosis in a Tertiary Tuberculosis Center in Iran. Saudi Med j 2007 Apr; 28(4):544-50.

5. Ramaswamy SV, Musser JM. Molecular Genetic Basis of Antimicrobial Agent Resistance in Mycobacterium Tuberculosis. Tuberc Lung Dis 1998;79:3-29.

6. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Lowrie D, Cole S, Colston MJ, Matter L, Schopfer K, Bodmer T. Detection of Rifampicin-Resistant Mutations in Mycobacterium Tuberculosis. Lancet 1993;341:647-650.

7. 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;40:4435-4438.

8. Ramazanzadeh R, Amirmozafari N, Farnia P, Ghazi F. Genotyping of Mycobacterium Tuberculosis Isolates from TB Patients with Spoligotyping . Cientific Journal of Kurdistan University of Medical Sience 2006;11:50-59.

9. Amaro A, Duarte E, Amado A, Ferronha H, Botelho A. Comparison of Three DNA Extraction Methods for Mycobacterium Bovis, Mycobacterium Tuberculosis and Mycobacterium Avium Subsp. Letters in Applied Microbiology; 2008. p. 8-11.

10. Otten T, Vyshnevskiy B, Narvskaya1 O. Allele-Specific rpoB PCR Assays for Detection of Rifampin-Resistant Mycobacterium Tuberculosis in Sputum Smears. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2003 July; 2231-2235.

11. World Health Organization, Antituberculosis Drug Resistance in the World, Report No. 2 Prevalence and Trends. The WHO/IUATLD Global Project on Antituberculosis Surveillance. Geneva, Switzerland: WHO/CDS/TB/; 2000. p. 278.

12. Qian L, Abe C, Lin TP, Yu MC, Cho SN, Wang S, Douglas JT. rpoB Genotypes of Mycobacterium Tuberculosis Beijing Family Isolates from East Asian Countries. J Clin Microbiol 2002;40:1091-1094.

13. Heep M, Brandtstatter B, Rieger U, Lehn N, Richter E, Sch-Gerdes SRu, Niemann S. Frequency of rpoB Mutations Inside and Outside the Cluster I Region in Rifampin Resistant Clinical Mycobacterium Tuberculosis Isolates. J Clin Microbiol 2001;39:107-110.

14. Mokrousov I, Narvskaya O, Limeschenko E, Otten T, Vyshnevskiy B. Detection of Ethambutol-Resistant Mycobacterium Tuberculosis Strains by Multiplex Allele-Specific PCR Assay Targeting embB306 Mutations. Journal of Clinical Microbiology 2002;40:1617-1720.

15. Doustdar F, khosravi AD, Farnia F, Masjedi M, Velayati A. Molecular Analysis of Isoniazid Resistance in Different Genotype of Mycobacterium Tuberculosis Isolates fram Iran. Microbial Drug Resistance 2008;4:14.

16. Ulukanligil M, Aslan G, Tasci S. A Comparative Study on the Different Staining Methods and Number of Specimens for the Detection of Acid Fast Bacilli. Mem Inst Oswaldo Cruz 2000;95(6):855-858.

17. Loddenkemper R, Sagebiel D, Brendel A. Strategies Against Multidrug-Resistant Tuberculosis. Eur Respir J 2002;20:66-77.

18. Garcia L, Alonso-Sanz M, Rebollo MJ. Mutations in the rpoB Gene of Rifampin-Resistant Mycobacterium Tuberculosis Isolates in Spain and Their Rapid Detection by PCR-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. J Clin Microbiol 2001;39:1813-8.

This document was created with Win2PDF available at http://www.daneprairie.com.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.