

Rapid detection of rifampicin resistant *Mycobacterium tuberculosis* by using real time PCR

Taheri B (M.Sc)¹, Mirab Samiee S (Ph.D)^{2,3,4}, Paryan M (M.Sc)⁵, Ghaznavi-Rad E (Ph.D)⁶ *

1- Department of Biotechnology and Microbiology, Faculty of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

2- Food and Drug Laboratory Research Center, Ministry of Health and Medical Education, Tehran, Iran

3- Reference Health Laboratory, Ministry of Health and Medical Education, Tehran, Iran.

4- Department of Molecular Pathology, Day General Hospital Laboratory, Tehran, Iran

5- Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

6- Department of Microbiology, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

Received: 5 Mar. 2013, Accepted: 17 Apr. 2013

Abstract

Background: The emergence of drug-resistant strain of *M. tuberculosis* is one of the most critical issues facing TB researchers and physicians. Rapid diagnosis of drug-resistant tuberculosis is essential to improve treatment outcome and limit transmission of this obstinate disease. The aim of this study was to develop a real-time PCR assay for the detection of mutations in RRDR (rifampicin resistance determinant region) of *rpoB* conferring rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*.

Materials and Methods: In this experimental study, the primer and probe set were designed for a RRDR region of *rpoB* gene using specialized software. Clinical specimens that had previously been evaluated resistant or sensitive by using conventional method were used for assessing the clinical sensitivity and specificity of the assay.

Results: By analysis of 40 clinical samples (20 resistant and 20 sensitive samples), sensitivity of the probe for detection of mutation at codons 526 and 531 was determined 100%. The designed primers and probes were *rpoB* specific and no cross-reaction was observed with other microorganisms and human genome bio-informatically. The clinical specificity of the developed real-time PCR assay was examined experimentally using 25 negative samples and it was determined to be 100%.

Conclusion: The developed real-time PCR assay can be used as an appropriate and efficient tool for the rapid detection of Rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, Rifampicin resistance, *rpoB* gene, real-time PCR

*Corresponding author:

Address: Department of Microbiology, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

E-mail: e.ghaznavirad@arakmu.ac.ir

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

بهناز طاهری¹، سیامک میراب سمیعی^{2،3،4}، مهدی پریان⁵، احسان الله غزنوی راد^{6*}

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

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

چکیده

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

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

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

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

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

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

مقدمه

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

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

تخمین زده می شود که 3/2 درصد از موارد جدید ابتلا به سل توسط MDR-MTB ایجاد می شود (6، 7). برای درمان سویه های مقاوم به درمان از خط دوم داروهای درمانی استفاده می شود که کم اثرتر، سمی تر و بسیار گران تر از داروهای خط اول می باشند (8، 9). تا زمانی که نتایج تست حساسیت در دسترس نباشد درمان بیمار با داروهای خط اول انجام خواهد شد بنابر این تشخیص سریع سویه های مقاوم به منظور اجتناب از درمان نامناسب به وسیله داروهای خط اول که عواقبی همچون سمیت، افزایش احتمال انتقال بیماری، شکست درمان و مرگ را دارد ضروری می باشد (10). تشخیص زمان بر MTB مقاوم به درمان مهم ترین نقش را در انتقال MDR-MTB دارد. در اکثر کشورهای با شیوع بالای TB که عمدتاً کشورهای در حال توسعه هستند MDR-MTB تنها زمانی که درمان با داروهای خط اول طول می کشد و یافته های کلینیکی نا کار آمد بودن درمان را نشان می دهد تشخیص داده می شود. علاوه بر این تست های حساسیت فنوتیپی (DST) که مبتنی بر کشت هستند معمولاً زمان بر هستند و به 2-4 ماه زمان نیاز دارند (3). استاندارد طلایی پذیرفته شده جهانی برای تشخیص MDR-MTB

کشت باکتری و بررسی رشد در محیط INH, RIF می باشد. تست حساسیت دارویی بعد از اطمینان از پاسخ مثبت تست MB صورت می گیرد که معمولاً حدود 3-6 هفته برای تشخیص اولیه MB به علاوه 3 هفته برای بررسی حساسیت MTB طول می کشد. به همین دلیل سازمان جهانی بهداشت به کشورها توصیه می کند که هر چه سریع تر ظرفیت های تشخیصی مبتنی بر متدهای ملکولی که شامل آنالیز مستقیم DNA استخراج شده بدون نیاز به کشت باکتری می باشد را جهت تشخیص سریع MDR-MTB افزایش دهند (11)، بدین ترتیب زمان لازم برای تشخیص سویه های مقاوم کاهش می یابد (7). بیشتر سویه های مقاوم به RIF دارای یک جهش در ناحیه 81 bp (ناحیه مرکزی rpoB یا RRDR) می باشند که قسمتی از ژن rpoB است که زیرواحد β از RNA پلیمراز وابسته به DNA را کد می کند (13، 14). RIF از طریق اتصال به این زیر واحد فرایند نسخه برداری را مختل می کند (15). از آن جایی که تغییرات هم معنی در ناحیه RRDR غیر معمول است تشخیص جابه جایی هرنوکلئوتید در این منطقه ژنتیکی مارکری برای مقاومت است و جهش هایی که در این ناحیه رخ می دهند مسئول 98 درصد از مقاومت به ریفامپسین هستند. بیش از 95 درصد از موتاسیون های miss sense در ناحیه RRDR بین کدون های 507-533 واقع شده اند (15). بیش ترین تغییر گزارش شده مربوط به کدون 531 (ser \rightarrow lue) و 526 (Tyr \rightarrow His) و 516 (Asp \rightarrow Val) می باشد (16)، که در قسمت عمده نمونه های مقاوم به RIF دیده شده است. روش MIC نشان داده که مقاومت بالای RIF همراه با جهش در کدون 526 [CAC \rightarrow GAC] و 531 [TCG \rightarrow TTG] است در حالی که تغییر در سایر کدون ها مقاومت نسبی ایجاد می کنند (15).

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

مقاوم MTB توسط سازمان جهانی بهداشت تایید و توصیه شده مبتنی بر Real-Time PCR می باشد. در این مطالعه ما به دنبال طراحی روشی بر اساس Sequence specific Real-Time PCR هستیم تا بر اساس طراحی پروپ در برگیرنده کدون 526 و 531 وجود یا عدم وجود جهش در نمونه های بالینی و متعاقب آن مقاومت را تعیین کنیم.

مواد و روش ها

این پژوهش یک مطالعه تجربی با کد اخلاقی به شماره 8-124-91 می باشد. طراحی پروپ و پرایمر: توالی ژن rpoB با شماره دسترسی L27989 و با طول 3519 جفت باز از بانک ژنی NCBI National Center for Biotechnology (Information) تهیه شد، توالی ناحیه rifampicin resistance determinant (RRDR)

region) که در محدوده کدون 531-507 ژن می باشد مشخص شده سپس با استفاده از نرم افزار AlleleId پرایمر و پروپ های مناسب طراحی گردید (جدول 1). پروپ حسگر (sensor) به گونه ای طراحی شد که هنگام اتصال به DNA الگو دو کدون مورد بررسی را تحت پوشش قرار دهد. همچنین پروپ لنگر (anchor) مکمل با ناحیه ای فرادست (upstream) پروپ حسگر و به فاصله 4 نوکلئوتید از آن طراحی شد. تا در مرحله اتصال (Annealing) واکنش PCR که هر دو پروپ به DNA الگو متصل هستند رنگ LC640 به اندازه کافی به رنگ فلورسین نزدیک باشد. به این ترتیب امواج ساطع شده از رنگ فلورسین باعث تحریک رنگ LC640 خواهد شد. با تحریک رنگ LC640 امواجی با طول موج بلندتر از آن بازتابش خواهد شد که این امواج توسط دستگاه تشخیص داده خواهد شد. یگانه بودن پروپ و پرایمرها برای قطعه ژنی مورد نظر توسط برنامه Blast تایید شد.

جدول 1. توالی پرایمر و پروپ ها

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

راه اندازی تکنیک: به منظور راه اندازی تکنیک از سه نمونه DNA تعیین توالی شده با روش sequencing شامل یک نمونه با جهش 526 و یک نمونه با جهش 531 و یک نمونه وحشی فاقد جهش استفاده شد. سپس تکثیر ناحیه RRDR از طریق واکنش زنجیره ای پلیمرز توسط دستگاه Light cycler (شرکت رش-آلمان) در حجم 20 میکرولیتر و با استفاده از 0/5 میکرومولار از هر پرایمر، 2/0 میکرومولار از هر یک از پروپ ها و غلظت 1X از مسترمیکس Light Master plus hybprobe (شرکت رش -آلمان) انجام شد. به این صورت که ابتدا حرارت 95 درجه سانتی گراد به مدت 10 دقیقه برای

شروع و فعال سازی آنزیم انتخاب شد. فرایند واسرشتگی (Denaturation) در حرارت 95 درجه سانتی گراد در 45 سیکل به مدت 15 ثانیه، اتصال (Annealing) در 55 درجه سانتی گراد به مدت 10 ثانیه و بازآرایی (Extension) در 72 درجه سانتی گراد به مدت 10 ثانیه انجام گرفت. در هر سیکل در انتهای مرحله اتصال پرایمرها نور ساطع شده از رنگ LC640 توسط دستگاه جمع آوری شده، میزان فلورسنت دریافتی توسط دستگاه افزایش یافته و به صورت نمودار فلورسانت بر حسب زمان نشان داده شد. بعد از آخرین سیکل واکنش برای به دست آوردن دمای منحنی ذوب پروپ (Melting curve)

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

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

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

ارزیابی تکنیک: به منظور بررسی تکنیک، از 40 نمونه مقاوم و حساس MTB (مایکوباکتریوم) تایید شده به وسیله کشت و آنتی‌بیوگرام با روش استاندارد استفاده شد. بدین منظور ابتدا باکتری‌ها در دمای 85 درج سانتی‌گراد و به مدت 60 دقیقه توسط دستگاه Thermo block غیر فعال شدند. سپس DNA نمونه‌ها با استفاده از کیت EZ1 virus mini kit (شرکت کیزن - المان) طبق پروتکل مربوط به نمونه‌های تنفسی و با استفاده از دستگاه Bio-Robot-EZ1 تخلیص شد. واکنش راه اندازی شده PCR برای 40 نمونه

DNA حاصل انجام شد. در انتها منحنی ذوب هر نمونه به دست آمد و بر اساس دمای منحنی ذوب مقاوم یا حساس بودن آن تعیین شد. به منظور ارزیابی و تایید صحت نتایج به دست آمده، این نتایج با نتایج اولیه حاصل از کشت و آنتی‌بیوگرام مقایسه شدند. همچنین به منظور تعیین ویژگی کلینیکی روش از 25 نمونه منفی که عدم وجود MTB در آنها با استفاده از روش کشت تایید شده بود این نمونه‌ها از آرشیو بیمارستان دی به دست آمد.

یافته‌ها

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

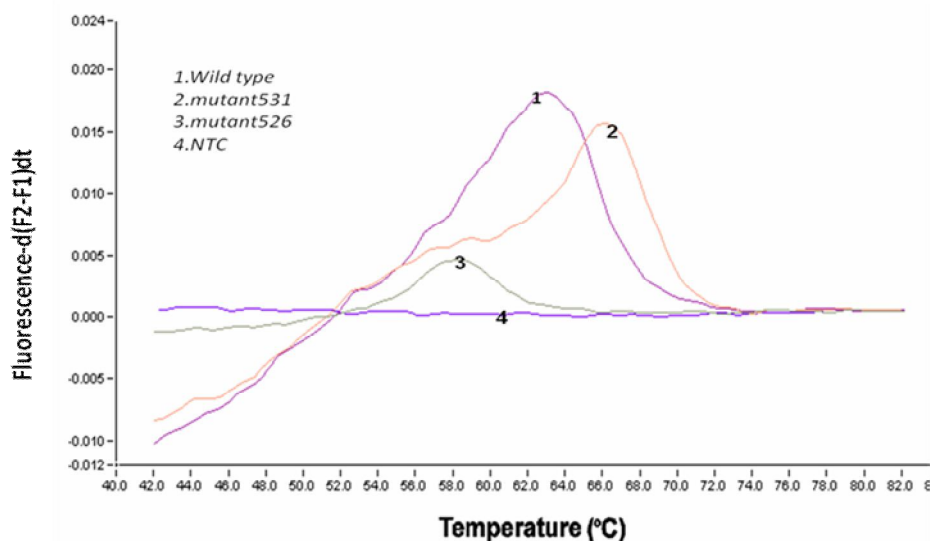
بررسی ویژگی آنالیتیک پرایمر و پروب: توالی پرایمر و پروب‌های طراحی شده با استفاده از نرم افزار Nucleotide blast موجود در سایت NCBI به منظور بررسی ویژگی آنالیتیک مورد ارزیابی قرار گرفته و مشخص گردید پرایمر و پروب‌های طراحی شده به توالی‌های اختصاصی ناحیه RRDR ژن rpoB مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و مایکوباکتریوم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

تعیین حد نهایی تشخیص: برای تعیین حد تشخیص از رقت‌های لگاریتمی DNA استفاده شد. رقت‌های لگاریتمی از DNA تهیه شده معادل 1-104 کپی

ویک نمونه با جهش 531 و یک نمونه وحشی فاقد جهش استفاده شد. بر اساس واکنش راه اندازی شده پروب طراحی شده در اتصال به هریک از 3 نمونه دمای ذوب منحصر به فردی نشان داد. به طوری که تفاوت دما کاملاً قابل تشخیص بوده و از آن به عنوان مبنایی برای افتراق سوش حساس، موتان کدون 526 و موتان کدون 531 استفاده شد (شکل 1).

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

راه اندازی تکنیک و تعیین دمای ذوب نمونه‌ها: به منظور راه اندازی تکنیک از سه نمونه DNA تعیین توالی شده با روش sequencig، شامل یک نمونه با جهش 526



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

رو ویژگی روش راه اندازی شده معادل 100 درصد در نظر گرفته شد.

بحث

با توجه به این که مقاومت عمده به RIF توسط موتاسیون در ناحیه RRDR (ناحیه 81bp موجود در ژن *ipobA*) رخ می‌دهد تلاش‌ها جهت تشخیص مقاومت در باکتری به بررسی وجود جهش در این ناحیه معطوف شده و تکنیک‌های ملکولی متفاوتی از قبیل sequencing، روش‌های مبتنی بر الکتروفورز و روش‌های مبتنی بر هیبریداسیون در این راستا مورد استفاده قرار گرفته‌اند. در این مطالعه به توسعه تکنیک Real Time PCR برای تشخیص سریع مایکوباکتریوم توپر کولوزیس‌های مقاوم به ریفامپین پرداختیم. عدم نیاز به آنالیز وابسته به ژل در انتهای PCR موجب کاهش خطر آلودگی و نیز افزایش سرعت

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

ویژگی کلینیکی: به منظور تعیین ویژگی کلینیکی روش از 25 نمونه منفی تایید شده با روش کشت استفاده شد. در هیچ یک از موارد نتیجه مثبتی مشاهده نشد. از این

از دیگر روش‌های مورد استفاده RFLP است که روش دقیق و حساسی است اما عیب آن این است که همه جهش‌هایی که ما به دنبال آن هستیم باعث ایجاد و یا از بین رفتن سایت آنزیمی که مورد نظر ما است نمی‌شوند (15). با توجه به دقت، سرعت، حساسیت و پتانسیل بالای Real-Time PCR گرایش به این روش برای تشخیص MDR-MTB افزایش یافته به طوری که کیت تشخیصی Xpert MTB/RIF که برای تشخیص سویه‌های مقاوم MTB توسط سازمان جهانی بهداشت تایید و توصیه شده مبتنی بر Real-Time PCR می‌باشد. همچنین در مطالعه‌ای که توسط رامیرز و همکاران صورت گرفت از تکنیک Real-time PCR و HRM برای شناسایی MDR-MTB استفاده شد. حساسیت و اختصاصیت این تکنیک برای شناسایی سویه‌های مقاوم به ریفامپین به ترتیب 91 درصد و 98 درصد تعیین شد (2). با استفاده از این تکنیک می‌توان سویه‌های مقاوم به ریفامپین را با سرعت بالا و با هزینه‌ای بسیار کمتر از روش‌های مبتنی بر کشت و sequencing تشخیص داد.

نتیجه‌گیری

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

تشکر و قدردانی

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

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

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

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

8. Rapeepun A-v, Chalinthorn S, Laura P, Kimberly M, Keerataya N, Busakorn P, et al. Validation of the GenoType MTBDR plus assay for detection of MDR-TB in a public health laboratory in Thailand. *BMC Infectious Diseases*. 2010;10:123-4.
9. Rich M. Guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis: World Health Organization; 2006.
10. Dorman SE, Chaisson RE. From magic bullets back to the magic mountain: the rise of extensively drug-resistant tuberculosis. *Nature medicine*. 2007;13(3):295-8.
11. WHO. Seventh meeting [of the] Strategic and Technical Advisory Group for Tuberculosis (STAG-TB): report on conclusions and recommendations, 11-13 June 2007, Geneva. Geneva: World Health Organization. 2007.
12. World Health Organization. Policy statement: Molecular line probe assay for rapid screening of patients at risk of multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB). Geneva: World Health Organization; 2008.
13. Riska P, Jacobs Jr W, Alland D. Molecular determinants of drug resistance in tuberculosis. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 2000;4(2s1):S4-S10.
14. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Matter L, Schopfer K, Bodmer T, et al. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *The Lancet*. 1993;341(8846):647-51.
15. Johnson R, Streicher E, Victor TC, Van Helden PM, Warren R, Louw G, et al. Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr Issues Mol Biol*. 2002; 8:97-112.
16. Chaves F, Alonso-Sanz M, Rebollo M, Tercero J, Jimenez M, Noriega A. rpoB mutations as an epidemiologic marker in rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 2000;4(8):765-70.

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

منابع

1. Zdrowia ŚO. Global tuberculosis control: epidemiology, strategy, financing: WHO report 2009: World Health Organization; 2009.
2. Ramirez MV, Cowart KC, Campbell PJ, Morlock GP, Sikes D, Winchell JM, et al. Rapid detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by use of real-time PCR and high-resolution melt analysis. *Journal of clinical microbiology*. 2010;48(11):4003-9.
3. Mai H, Edine T, Nguyen L, Frank C, Nguyen D, Dinh S, et al. Validation of the GenoType MTBDR plus assay for diagnosis of multidrug resistant tuberculosis in South Vietnam. 2010; 10:149-50.
4. Wright A, Zignol M, Van Deun A, Falzon D, Gerdes SR, Feldman K, et al. Epidemiology of antituberculosis drug resistance 2002-07: an updated analysis of the Global Project on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance. *The Lancet*. 2009;373(9678):1861-73.
5. Edlin BR, Tokars JI, Grieco MH, Crawford JT, Williams J, Sordillo EM, et al. An outbreak of multidrug-resistant tuberculosis among hospitalized patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *New England Journal of Medicine*. 1992;326(23):1514-21.
6. Dye C, Espinal MA, Watt CJ, Mbiaga C, Williams BG. Worldwide incidence of multidrug-resistant tuberculosis. *Journal of Infectious Diseases*. 2002;185(8):1197-202.
7. Garcia de Viedma D. Rapid detection of resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a review discussing molecular approaches. *Clinical microbiology and infection*. 2003;9(5):349-59.

Mycobacterium tuberculosis. American journal of respiratory and critical care medicine. 1997;155(6):2057-63.

17. Ohno H, Koga H, Kuroita T, Tomono K, Ogawa K, Yanagihara K, et al. Rapid prediction of rifampin susceptibility of