فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال سوم، شماره ۹، بهار ۱۳۹۳، صفحه ۲۱- ۳۴
تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۰/۱۹ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۷/۱۵

تشخیص مقاومت به افلوکساسین با روش مولکولی سریع Allele Specific PCR در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس

وحیده وحیدی: دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، گروه میکروبیولوژی، قم، ایران، vahide.vahidi@yahoo.com
محمدرضا ذوالفقاری: استادیار میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، گروه میکروبیولوژی، قم، ایران، mreza.zolfaghary@gmail.com
اعظم احمدی: دانشجوی دکتری تخصصی ژنتیک مولکولی، دانشگاه تربیت مدرس و مرکز تحقیقات سل و عفونی کودکان، علوم پزشکی اراک، ایران، ahmadia22@yahoo.com
مانا شجاع پور: دانشجوی دکتری تخصصی پزشکی مولکولی، مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، ایران، mana_shojapuor@yahoo.com
سید رضا مودب: استادیار مرکز تحقیقات سل و ریه، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، ایران، seyyedreza_moaddab@yahoo.com
محمد ارجمند زادگان: استادیار باکتری شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات سل و عفونی کودکان، دانشگاه علوم پزشکی اراک، ایران، arjomandzadegan@arakmu.ac.irn *

چکیده

مقدمه: مقاومت به فلوروکینولون‌ها در بیماری سل رو به گسترش است. تشخیص مقاومت به روش کشت خلط دو ماه به طول می‌انجامد. مطالعه حاضر، به منظور طراحی روشی برای تشخیص سریع مقاومت سویه‌های کلینیکی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به افلوکساسین انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، DNAهای استخراج شده از ۴۱ سویه کلینیکی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس حساس و مقاوم به افلوکساسین موجود در بانک DNA مرکز تحقیقات سل و بیماری‌های عفونی با دو روش مولکولی آلل اسپسیفیک پی سی آر (AS-PCR) و تعیین ترادف (سکوئنس)، برای تعیین موتاسیون در منطقه مرتبط با مقاومت ژن *gyrA* با هم مقایسه شدند. پرایمرهای داخلی برای تشخیص موتاسیون‌های مرتبط با مقاومت طراحی و شرایط PCR تعیین شد. قطعه مورد نظر درتعدادی از نمونه‌ها تعیین ترادف شده و به‌عنوان استاندارد طلایی با روش‌های ارائه شده مقایسه شد.

نتایج: روش AS-PCR به خوبی قادر به تشخیص موتاسیون با تشکیل یا عدم تشکیل باند داخلی شد که نشان دهنده طراحی صحیح پرایمرها بود. روش AS-PCR اجرا و با توجه به نتایج بسیار خوب به عنوان روش عادی استفاده شد. در مجموع، از ۴۱ سویه کلونیکی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مطالعه شده، ۳۷ سویه از نظر فنوتیپی (به روش کشت proportion) مقاوم به افلوکساسین و ۴ سویه حساس به این دارو بودند. از ۳۷ سویه مقاوم از نظر فنوتیپی، ۳۲سویه با روش AS-PCR مقاوم به افلوکساسین و ۵ نمونه حساس تعیین شدند. نتایج تعیین ترادف، با نتایج روش‌های استفاده شده انطباق داشت. حساسیت و ویژگی روش به ترتیب معادل ۸۶/۱۱ درصد و ۱۰۰ درصد به دست آمد.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که روش AS-PCR طراحی شده می‌تواند به عنوان یک روش ساده و سریع برای تعیین حساسیت و مقاومت به افلوکساسین در سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس استفاده شود. این روش تا کنون در منابع علمی گزارش نشده است.

واژه‌های کلیدی: افلوکساسین، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، Allele Specific –PCR

* نویسنده مسؤول مکاتبات، mmatinam81@yahoo.com

مقدمه

امروزه یکی از بزرگ‌ترین مسائل بهداشتی جهان، بیماری سل است. حدس زده می‌شود که از هر سه نفر جمعیت جهان، یک نفر به باسیل سل آلوده بوده و در هر ثانیه یک نفر به تعداد آنان افزوده می‌شود. طبق برآوردهای موجود، ۵۰ میلیون نفر از این افراد، به باسیل سل مقاوم به چند دارو (MDR-TB) آلوده هستند و این مساله به شدت نگران کننده است (۱). در سال‌های اخیر بروز گسترش سل مقاوم به دارو و همچنین، مقاومت به فلوروکینولون‌ها و البته مقاومت به یکی از داروهای تزریقی نگرانی‌های زیادی در کنترل سل به وجود آورده است (۴). درمان نامناسب بیماران TB، به موتاسیون در سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس منجر خواهد شد که سبب مقاومت دارویی می‌شود (۵). تجمع موتاسیون در ژن‌های هدف سبب ایجاد سویه‌های MDR-TB و XDR-TB می‌شود (۲). از این رو تشخیص سریع مقاومت نکته کلیدی در کنترل و درمان سل است (۱). هدف سلولی فلوروکینولون‌ها در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، آنزیم DNAgyrase است که پیچش DNA را هنگام همانندسازی باز می‌کند تا همانندسازی DNA انجام گیرد (۵ و ۶). این آنزیم شامل دو زیر واحد آلفا و بتا است که زیر واحد آلفا توسط ژن *gyrA* و زیرواحد بتا توسط ژن *gyrB* کد می‌شوند. با توجه به مطالعاتی که تاکنون بر روی مقاومت به فلوروکینولون‌ها در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس انجام شده، مشخص شده که مقاومت به این دارو وابسته به موتاسیون در یکی از کدون‌های منطقه QRDR، ژن *gyrA* کد کننده زیر واحد آلفای آنزیم DNAgyrase است (۵- ۷) تحلیل ناحیه QRDR به تنهایی از طریق آزمایش‌های ژنوتایپینگ انجام می‌شود که این آزمایش‌ها به عنوان آزمایش‌های سریع شناسایی، شناخته شده اند. تا کنون برای تعیین رخداد جهش‌ها در ناحیه QRDR از کدون ۸۹ تا ۹۴ از روش‌های تعیین ترادف، real-time PCR و SSCP استفاده شده است (۵، ۶، ۸-۱۰).

حالت وحشی[1] به عنوان شاخص در نظر گرفته شده و هر گونه حالت غیر طبیعی به عنوان موتان در نظر گرفته می‌شود. به این ترتیب فارغ از نوع موتاسیون و تبدیل اسید آمینه ASP به هر اسید آمینه دیگردر کدون ۹۴ پرایمرهایی برای حالت وحشی طراحی شده که تمام انواع موتاسیون‌های احتمالی شناخته شده یا نشده را پوشش می‌دهد.

از آن‌جایی که افلوکساسین، یکی از داروهای رده دوم درمان سل است که امروزه به شکل گسترده برای درمان سل مقاوم به چند دارو استفاده می‌شود، متاسفانه به علت مصرف فراوان و نامنظم دارو، مقاومت اکتسابی به این دارو، رو به افزایش است. بنابراین، پیدا کردن روش سریع برای تشخیص مقاومت فرد مبتلا به این دارو، بسیار مهم است. روش AS-PCR یک تکنیک مناسب برای تشخیص موتاسیون‌های نقطه ای یا حذف‌های کوچک است. این روش نوعی از PCR است که در آن علاوه بر پرایمرهای رفت و برگشت، یک پرایمر داخلی نیز استفاده می‌شود. طراحی این پرایمر داخلی کاملا اختصاصی بوده و مبتنی بر شناخت موتاسیون‌های احتمالی در سایت مورد نظر است. با این توضیح که منطقه ای از پرایمر که باید کاملامنطبق با الگو باشد، انتهای $3'$ است. پرایمر از قسمت $3'$ به محل اختصاصی خود در الگو متصل شده و طویل شدن پرایمر (تشکیل رشته جدید) از همین بخش توسط DNA پلی‌مراز انجام می‌شود. پرایمر به گونه‌ای طراحی

می‌شود که محل موتاسیون احتمالی در محل اتصال 3′ پرایمر به الگو باشد. بدین ترتیب در صورت رخداد موتاسیون در این نقطه، پرایمر متصل نشده و باند تشکیل نمی‌شود.

این تحقیق، با هدف دستیابی به روشی ساده به منظور تشخیص مقاومت سویه‌های کلینیکی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به فلوروکینولون‌ها، بدون نیاز به دستگاه‌های پیشرفته و روش‌های زمان‌بر انجام شده است.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق، DNAهای استخراج شده از ۴۱ سویه کلینیکی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس حساس و مقاوم به افلوکساسین موجود در بانک DNA مرکز تحقیقات سل و بیماری‌های عفونی با دو روش مولکولی AS-PCR و تعیین ترادف، برای تعیین موتاسیون در منطقه مرتبط با مقاومت ژن *gyrA* با هم مقایسه شدند. از این میان ۳۷ سویه از نظر فنوتیپی مقاوم و ۴ سویه حساس به افلوکساسین بودند.

طراحی پرایمر

بدین منظور از Gene Blast و نرم افزارهای Mega و Integrated DNA Technology استفاده شد (جدول ۲).

انجام PCR

به منظور بررسی وجود موتاسیون در ژن *gyrA* و به منظور تکثیر قطعه 194bp، DNA استخراج شده به همراه پرایمرهای اختصاصی F و R (جدول ۲) در واکنش PCR وارد شده و تکثیر بخش مورد نظر از ژن یاد شده در دستگاه ترموسایکلر انجام شد. واکنش PCR با تغییر دمای اتصال پرایمرها Annealing و غلظت آن‌ها بهینه شد (جدول ۱).

جدول۱- برنامه واکنش زنجیره ای پلیمراز برای تکثیر ژن *gyrA*

مراحل	دما (درجه سانتی‌گراد)	زمان (دقیقه)	تعداد سیکل‌ها
دناتوراسیون اولیه	۹۵	۵	-
دناتوراسیون هر چرخه	۹۶	۰/۵	۴۰
اتصال پرایمرها	۶۸	۱	
طویل شدن	۷۲	۰/۵	
طویل شدن نهایی	۷۲	۱۰	-

جدول ۲- ویژگی‌های پرایمرهای طراحی شده

نام	ترادف (5'-3')	ΔH	Tm (درجه سانتی‌گراد)	GC%	طول	ΔS	ΔG (ΔH-TΔS) تشکیل ساختارهای ثانویه
F	CGATTCCGGCTTCCG CCCGG	-۱/۳۳ تا -۵/۲۶	۶۶	۷۵	۲۰	-۱۰۱/۷۷ تا -۸۶/۰۷	-۲/۷۶ تا -۱/۸۴
R	CGCCAGGCAATGAC CCACCGG	-۱۷/۷ تا -۱۴/۵	۶۵/۹	۷۱/۴	۲۱	-۵۸/۶۶ تا -۵۱/۲۴	-۰/۲ تا +۰/۷۸
94 M1	GCACGGCGACGCGT CGATCTACG	-۴۲/۷ تا -۴۳/۸	۶۶/۲	۶۹/۹	۲۳	-۱۳۴/۰۸ تا -۱۳۸/۸۲	-۲/۸۴ تا -۲/۳۱
94 M2	GCACGGCGACGCGT CGATCTACGA	-۴۴/۹ تا -۴۰/۲	۶۶/۸	۶۶/۷	۲۴	-۳۸/۴۴ تا -۱۲۸/۳۸	-۳/۶۳ تا -۱/۹۴
90	GCAACTACCACCCGC ACGGCGACGC	-۲۶/۹ تا -۲۲/۲	۶۹/۹	۷۲	۲۵	-۸۲/۴۶ تا -۶۷/۶۴	-۲/۳۱ تا -۲/۰۹
91	GCAACTACCACCCGC ACGGCGACGCGT	-۲۶/۹ تا-۳۱/۲	۷۱/۷	۷۰/۴	۲۷	-۸۲/۴۶ تا -۹۸/۱۶	-۲/۳۱ تا -۱/۹۳

روش‌های مولکولی برای تعیین موتاسیون

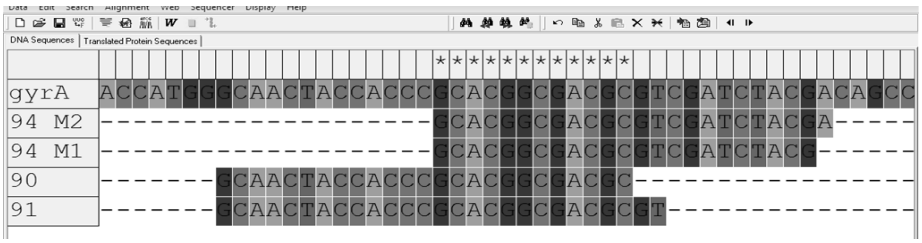
در این تحقیق، دو روش مولکولی AS-PCR و تعیین ترادف به شرح زیر برای تعیین موتاسیون در منطقه QRDR بررسی مقایسه ای شدند.

روش AS-PCR

روشی برای تشخیص SNP است. در این تکنیک طراحی دقیق پرایمرهای داخلی مهم است، به گونه ای که موتاسیون‌های احتمالی در ناحیه ′3 آن‌ها شناسایی شود. پرایمرهای اختصاصی برای تکنیک AS-PCR برای کدن‌های ۹۰، ۹۱ و دو آلل کدن ۹۴ (تحت عنوان پرایمرهای داخلی) طراحی و ساخته شدند (جدول ۴) پرایمرهای انتخاب شده به شرح ۱ و ترکیب پرایمرها و شرایط واکنش به شرح جدول ۳ هستند. در هر دو نوع سویه‌های حساس و مقاوم به افلوکساسین، طراحی و اجرای روش Allell specific (ARMS) برای تعیین موتاسیون در ژن *gyrA* در سویه‌های مقاوم به داروی افلوکساسین مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به کار گرفته شد. این روش بر مبنای اتصال یا عدم اتصال پرایمر اختصاصی از انتهای ′3 به نوکلئوتید هدف است.

روش AS-PCR مورد استفاده برای شناسایی موتاسیون‌های موجود در ژن *gyrA*، به منظور تشخیص سویه‌های حساس از سویه‌های مقاوم به افلوکساسین، طبق پروتکل زیر (جدول ۳) و در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد.

شکل ۱ – محل قرارگیری پرایمرهای طراحی شده برای MultiplexAllele specific-PCR با کمک برنامه MEGA



جدول۳- مقدار ترکیبات استفاده شده در مخلوط واکنش Allele Specific-PCR

بررسی موتاسیون در کدن ۹۴- m2		بررسی موتاسیون در کدن – ۹۴m1		بررسی موتاسیون در کدن ۹۱		بررسی موتاسیون در کدن ۹۰	
DNA	۲/۳	DNA	۲/۳	DNA	۲/۳	DNA	۲/۵
BUFFER	۵/۲	BUFFER	۵/۲	BUFFER	۵/۲	BUFFER	۲/۵
F	۸/۲	GF	۸/۲	GF	۸/۲	GF	۲/۸
R	۵/۲	GR	۵/۲	GR	۵/۲	GR	۵/۲
M2	۱/۴	M1	۴/۳	91	۴	90	۵/۳
dNTP	۱	dNTP	۱	dNTP	۱	dNTP	۱
DNA taq polymerase	۰/۸	DNA Taq polymerase	۰/۸	DNA Taq polymerase	۰/۸	DNA Taq polymerase	۰/۸

میکروتیوب‌ها در دستگاه ترمال سایکلر قرار داده و طبق برنامه داده شده به دستگاه PCR انجام شد. سپس، الکتروفورز روی ژل آگاروز ۱/۸درصد انجام و ژل، برای بررسی نتایج با دستگاه ترانس لومیناتور با اشعه U. V مشاهده شد. در پایان انطباق فنوتیپی و ژنوتیپی انجام شد.

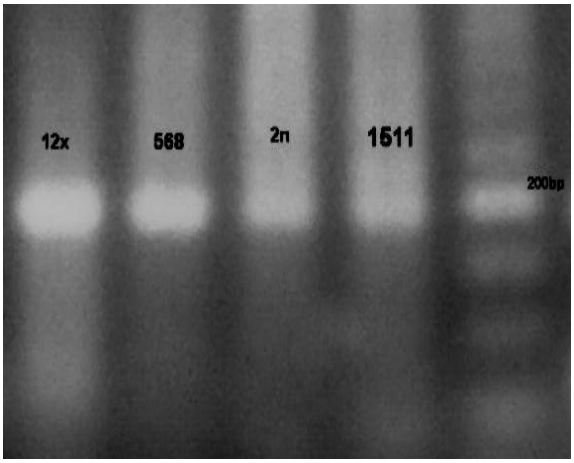
انجام تعیین ترادف[۲]

برای ارزیابی روش تعیین موتاسیون با کمک AS-PCR، از روش تعیین توالی، به‌عنوان استاندارد طلایی مولکولار استفاده شد. در این روش، قطعه مورد نظر که محتوی کدون‌های موتان بود با انجام PCR با پرایمرهای اختصاصی تکثیر شد. محصول PCR پس از تخلیص برای انجام تعیین توالی با دستگاه Applied Biosystem به شرکت SourceBioScience انگلستان فرستاده شد.

نتایج

نتایج PCR

انجام PCR ساده ژن *gyrA* روی تمامی ۴۱ نمونه مطالعه شده، باند 194 bpرا ارائه کرد که نشان دهنده انتخاب صحیح پرایمرها و تعیین برنامه مناسب تکثیر بود. محصول PCR در شکل ۱ برای ۴ نمونه نشان داده شده است.

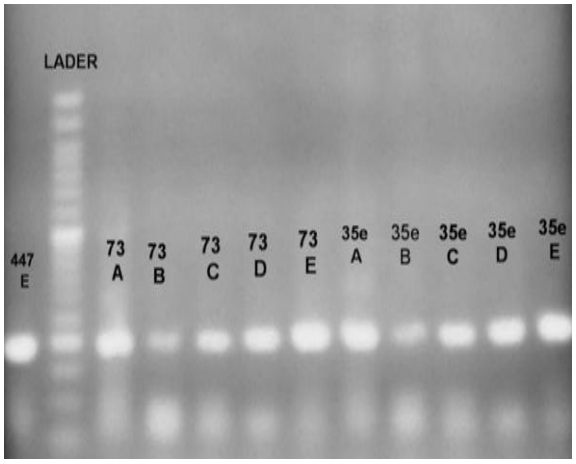


شکل۲- باند bp۱۹۴ حاصل از تکثیر ژن *gyrA* با استفاده از پرایمرهای f و r در ۴ نمونه 12x, 668, 2n, 1511

نتایج AS-PCR

پرایمرهای اختصاصی برای تکنیک AS-PCR برای کدن‌های ۹۰، ۹۱ و دو آلل کدن ۹۴ (تحت عنوان پرایمرهای داخلی) به خوبی قادر به تشکیل باند در محل اختصاصی خود شدند. این مسئله نشانگر صحت طراحی پرایمر، دمای آنیلینگ و برنامه PCR بود.

پرایمرهای طراحی شده در این تحقیق برای حالت وحشی (بدون موتاسیون)، باندهای مناسبی در حالت AS-PCR ارائه کرد که نشانگر دقیق بودن طراحی و انتخاب برنامه مناسب PCR در این حالت است. با توجه به این‌که پرایمر از ′3 به رشته الگو متصل می‌شود، اگر ژن در آن ناحیه جهش داشته باشد پرایمر آن را شناسایی نکرده و اتصال انجام نمی‌شود (عدم تشکیل باند در الکتروفورز). تشکیل باند مشخص کننده سویه حساس (شکل ۳) و عدم تشکیل آن اثبات کننده رخداد موتاسیون است (شکل ۳ ستون‌های E 1511 D,111). در مجموع، از ۴۱ سویه کلونیکی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مطالعه شده، ۳۷ سویه از نظر فنوتیپی مقاوم به افلوکساسین و ۴ سویه حساس به این دارو بودند. از ۳۷ سویه مقاوم از نظر فنوتیپی، ۳۲ سویه با روش AS-PCR مقاوم به افلوکساسین و ۵ نمونه حساس تعیین شدند.



شکل۳- تصویر الکتروفورز دو نمونه حساس ۷۳ و 35 e: باندهای اصلی و داخلی تکثیر شده که نشانگر عدم موتاسیون و حساسیت نمونه‌ها به افلوکساسین است.

جدول ۴- الگوهای متفاوت ایجاد شده در روی ژل توسط پرایمرهای طراحی شده در این مطالعه

الگوی A	الگویB	الگویC	الگوی D	الگویE
پرایمرهایF,R	پرایمرهای F,R,90	پرایمرهای F,R,91	پرایمرهای F,R,94 (M1)	پرایمرهای F,R,94 (M2)
bp۱۹۴ باند اصلی	bp۱۹۴ به تنهایی نشانه رخداد جهش (مقاوم)	bp۱۹۴ به تنهایی نشانه رخداد جهش (مقاوم)	bp۱۹۴ به تنهایی نشانه رخداد جهش (مقاوم)	bp۱۹۴ به تنهایی نشانه رخداد جهش (مقاوم)
	bp۸۸ به همراه bp۱۹۴ عدم جهش (حساس)	bp۹۰ به همراه bp۱۹۴ عدم جهش (حساس)	bp۱۰۰ به همراه bp۱۹۴ عدم جهش (حساس)	bp۱۰۱ به همراه bp۱۹۴ عدم جهش (حساس)

در شکل ۴ محصولات PCR زیر الکتروفورز شده‌اند:

ستونA تکثیر نمونه ۱۱۱ با استفاده از پرایمرهای F ,R است که باند ۱۹۴ جفت بازی می‌دهد.

ستونB تکثیر نمونه ۱۱۱ با استفاده از پرایمرهای F ,R ,90 است که باند اصلی ۱۹۴ جفت بازی و باند داخلی ۸۸ جفت بازی تشکیل شده است. بنابراین، در کدن ۹۰ موتاسیونی رخ نداده است.

ستون C تکثیر نمونه ۱۱۱ با استفاده از پرایمرهای F ,R , 91 است که باند اصلی ۱۹۴جفت بازی و باند داخلی ۹۰ جفت بازی تشکیل شده است. بنابراین، در کدن ۹۱ موتاسیونی رخ نداده است.

ستون D تکثیر نمونه ۱۱۱ با استفاده از پرایمرهای F ,R ,94-M1 است که باند اصلی ۱۹۴ جفت بازی تشکیل شده اما باند داخلی ۱۰۰جفت بازی تشکیل نشده است. بنابراین در نوکلئوتید اول کدن ۹۴ موتاسیون رخ داده است.

ستونE تکثیر نمونه۱۱۱ با استفاده از پرایمرهای F ,R ,94-M2 است که باند اصلی ۱۹۴جفت بازی و باند داخلی ۱۰۱ جفت بازی تشکیل شده است. بنابراین در نوکلئوتید دوم کدن ۹۴ موتاسیونی رخ نداده است. طبق نتیجه به دست آمده نمونه ۱۱۱ با موتاسیون در نوکلئوتید اول کدن ۹۴ ژن *gyrA* دچار مقاومت به افلوکساسین شده است.

علاوه بر این، تحلیل ژنتیکی سویه ۱۵۱۱ نیز در شکل ۳ ارائه شده است.

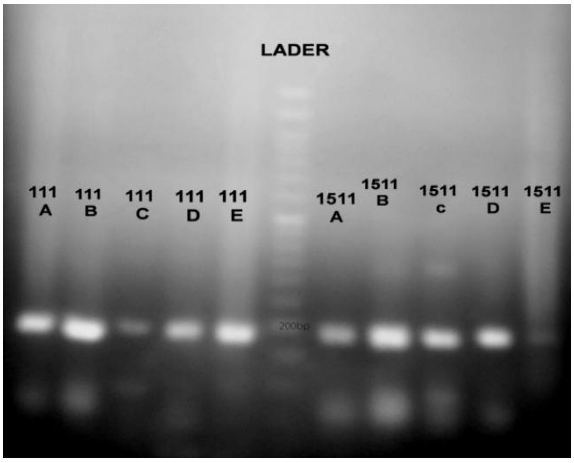
ستون A تکثیر نمونه ۱۵۱۱ با استفاده از پرایمرهای F, R است که باند ۱۹۴ جفت بازی می‌دهد.

ستونB تکثیر نمونه ۱۵۱۱ با استفاده از پرایمرهای F ,R ,90 است که باند اصلی ۱۹۴ جفت بازی و باند داخلی ۸۸ جفت بازی تشکیل شده است. بنابراین، در کدن ۹۰ موتاسیونی رخ نداده است.

ستون C تکثیر نمونه ۱۵۱۱ با استفاده از پرایمرهای F ,R ,91 است که باند اصلی ۱۹۴ جفت بازی و باند داخلی ۹۰ جفت بازی تشکیل شده است. بنابراین، در کدن ۹۱ موتاسیونی رخ نداده است.

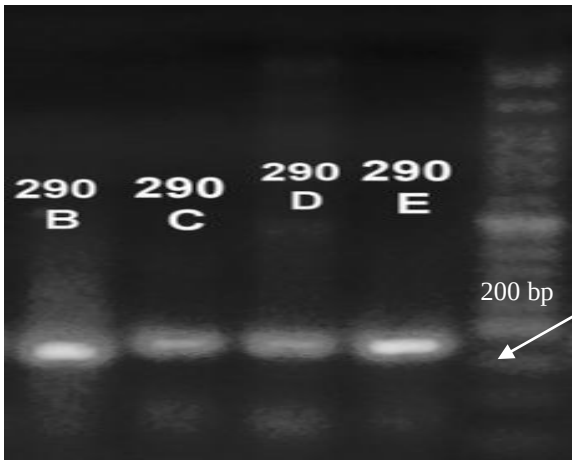
ستون D تکثیر نمونه ۱۵۱۱ با استفاده از پرایمرهای F ,R ,94-M1 است که باند اصلی ۱۹۴ جفت بازی و باند داخلی ۱۰۰ جفت بازی هر دو تشکیل شده اند. بنابراین، در نوکلئوتید اول کدن ۹۴ موتاسیونی رخ نداده است.

ستونE تکثیر نمونه۱۵۱۱ با استفاده از پرایمرهای F ,R ,94-M2 است که باند اصلی ۱۹۴ جفت بازی تشکیل اما باند داخلی ۱۰۱ جفت بازی تشکیل نشده است. بنابراین، در نوکلئوتید دوم کدن ۹۴ موتاسیون رخ داده است. طبق نتیجه به دست آمده نمونه ۱۵۱۱ با موتاسیون در نوکلئوتید دوم کدن ۹۴ ژن *gyrA* دچار مقاومت به افلوکساسین شده است.



شکل ۴- تصویر الکتروفورز محصولات AS-PCR دو نمونه XDR 1511 و ۱۱۱

نمونه ۲۹۰ که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، در کدن ۹۰ دچار جهش است (ستونB شامل: محصول PCR با پرایمرهای f,r,90) زیرا باند داخلی مربوط به این کدن که ۸۸ جفت بازی است تشکیل نشده است و تنها باند اصلی ۱۹۴ جفت بازی مربوط به تکثیر با پرایمرهای f,r تشکیل شده است. در نتیجه، این نمونه به افلوکساسین مقاوم است. در سایر ستون‌ها (C, D, E) باندهای داخلی ۹۰، ۱۰۰ و ۱۰۱ جفت بازی دیده می‌شوند که به ترتیب به کدن‌های ۹۱، m1 94 و m294 مربوط هستند.



شکل ۵- تصویر الکتروفورز نمونه ۲۹۰ مقاوم به افلوکساسین با موتاسیون در کدن ۹۰ (ستون B)

جدول ۵- نتایج AS-PCR و تعیین توالی

ردیف	نمونه	فنوتیپی مقاومت به فلوروکینولون‌ها	۹۰	۹۱	۹۴		وجود موتاسیون در منطقه QRDR	نتیجه تعیین ترادف
					M2	M1		
۱	568	R					Y	Mut:91
۲	535	R					Y	Mut:90
۳	124x	R				mut	Y	MUT90 GCG→GTG
۴	665	R					Y	Mut:m2
۵	2n	R	mut				Y	Mut:90
۶	194	R	mut		mut		Y	MUT:94 GAC→AAC
۷	12x	S	حساس				N	MUT90 GCG→GTG
۸	21N	S	حساس				N	MUT:M1
۹	35e	S	حساس				N	
۱۰	26e	S					N	

جدول نتایج AS-PCR و تعیین توالی

در جدول ۵، همه ۴۱ سویه به همراه نتیجه آزمایش AS-PCR آن‌ها آورده شده است. همان‌طور که در این جدول مشاهده می‌شود با استفاده از روش یاد شده مشخص شده که هر یک از سویه‌ها در کدام کدن خود دچار موتاسون شده و در نتیجه به افلوکساسین مقاومت نشان داده اند. نتایج به دست آمده به شکل تصادفی در مورد برخی نمونه‌ها با نتایج تعیین ترادف مقایسه شده است. تطابق بین نتایج نشان دهنده دقت روش یاد شده است. همانگونه که در جدول مشاهده می‌شود ۴۱ نمونه آزمایش شده اند که از بین آن‌ها به لحظ فنوتیپی ۳۱ نمونه مقاوم و ۱۰ نمونه حساس بودند. با انجام آزمایش AS-PCR بر روی آن‌ها مشخص شد که همه ۳۱ نمونه به لحاظ ژنوتیپی هم مقاوم‌اند. ۱۰ نمونه به لحاظ فنوتیپی حساس بودند که به لحاظ ژنوتیپی و از طریق روش AS-PCR هم حساس شناسایی شدند. از ۳۱ نمونه مقاوم ۵ سویه به علت رخ دادن موتاسیون در کدن ۹۰ ۹، سویه به علت رخداد موتاسیون در کدن ۹۱، ۹ سویه به علت رخداد موتاسیون در کدون M1-۹۴، و۱۳ سویه به علت رخداد موتاسیون در کدن M2-۹۴ خود، ویژگی مقاومت نسبت به افلوکساسین را به دست آورده اند. تعداد ۵ سویه نیز از ۳۱ سویه مقاوم، در دو کدن خود دارای موتاسیون و مقاومت به افلوکساسین بودند. روش مولکولی استاندارد تعیین ترادف است. که روی ۱۶ سویه (۱۰ نمونه حساس و ۶ سویه مقاوم) انجام شد. از این تعداد، ۸ سویه حساس و ۶ سویه مقاوم تعیین شدند. بدین ترتیب حساسیت روش AS-PCR در مقایسه با روش فنوتیپی ۱۰۰ و ویژگی روش نیز ۱۰۰ درصد است. در مقایسه با روش تعیین ترادف حساسیت و ویژگی به ترتیب ۷۵ و ۱۰۰ درصد است.

بررسی نتایج تعیین ترادف

نتایج تعیین ترادف نشان می‌دهد که کدن ۹۰ دارای توالی GCG است که کدکننده اسید آمینه آلانین است. موتاسیون در این کدن سبب جانشینی T به جای C می‌شود و در نتیجه توالی به GTG تغییر می‌یابد که کد کننده اسید آمینه والین است. کدن ۹۱ دارای توالی TCG است که کدکننده اسید آمینه سرین است. موتاسیون در این کدن سبب جانشینیC به جای T می‌شود و در نتیجه توالی به CCG تغییر می‌یابد که کد کننده اسید آمینه پرولین است. همچنین، این نتایج نشان می‌دهد که کدن ۹۴ دارای توالی GAC است که کد کننده اسید آمینه آسپارژین است. اما موتاسیون‌های متعدد در این کدن سبب انواع جانشینی می‌شود. از جمله G به جای A قرار گرفته و توالی GGC تشکیل می‌شود که گلایسین را کد می‌کند. حالت دیگر آن است که C به جای A قرار گرفته، توالی GCG تشکیل می‌شود که کد کننده آلانین است. در حالت سوم A جایگزین G می‌شود و توالی AAC تشکیل می‌شود که کدکننده آسپارژین است. و در حالت دیگر دو T به جای G و A قرار گرفته و توالی TTC شکل می‌گیرد که اسید آمینه فنیل آلانین را کد می‌کند.

بحث و نتیجه‌گیری

فلوروکینولون‌ها، ترکیبات تازه تولید شده ای مثل موکزی فلوکساسین، گاتی فلوکساسین، افلوکساسین و آمینوگلیکوزیدهای تزریقی (کانامایسین و آمیکاسین) و پپتیدهای حلقوی کاپرئومایسین، همگی فعالیت آنتی‌باکتریال خوبی بر ضد مایکوباکتریوم توبرکلوزیس دارند که البته متاسفانه به علت افزایش رنج جهش یافته‌های منجر به مقاومت به این آنتی‌بیوتیک‌ها، سویه‌های XDR-TB و حتی TDR-TB ایجاد شده اند

که درمان بسیار سخت و پر هزینه ای دارند و حتی ممکن است بیمار درمان نشود و ضمن رها بودن در جامعه، می‌تواند افراد بی‌شماری را بیمار کند که بیماری آن‌ها نیز از همان ابتدا به شکل XDR یا TDR (Total Drug Resistance) خواهد بود. که این مطلب از نظر همه‌گیر شدن بیماری بسیار حائز اهمیت است (۳).

هدف سلولی فلوروکینولون‌ها در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، آنزیم DNAgyrase است. این آنزیم شامل دو زیر واحد آلفا و بتا است که زیر واحد آلفا توسط ژن *gyrA* و زیرواحد بتا توسط ژن *gyrB* کد می‌شوند. جهش‌ها در ناحیه کوچک *gyrA* انجام می‌شود که ناحیه معین مقاوم به کینولون‌ها (QRDR) نامیده می‌شود. در تعداد کمتری از سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، مکانیسم اولیه مقاومت به فلوروکینولون‌ها، با رخداد جهش در ژن *gyrB* دیده شده است (۱۱)

تحلیل ناحیه QRDR به تنهایی از طریق آزمایش‌های ژنوتایپینگ انجام می‌شود. این آزمایش‌ها به عنوان آزمایش‌های سریع شناسایی، شناخته شده‌اند. در حدود ۹۰ تا ۹۵ درصد سویه‌های مقاوم به یک یا بیش از یک داروی تزریقی شامل موتاسیون‌هایی در نزدیکی انتهای 3′ ژن rrs (rRNA ۱۶S) شامل نواحی نوکلئوتیدی A1401,C1402,G1484 است. تاکنون از روش‌های تعیین ترادف و SSCP برای تعیین رخداد جهش‌ها در ناحیه QRDR از کدون ۸۹ تا ۹۴ استفاده شده است.

حالت وحشی به عنوان شاخص و هرگونه حالت غیرطبیعی به عنوان موتان در نظر گرفته می‌شود. به این ترتیب فارغ از نوع موتاسیون و تبدیل ASP به هر اسیدآمینه دیگر در کدون ۹۴ پرایمرهایی برای حالت وحشی طراحی شده و که تمام انواع موتاسیون‌های احتمالی شناخته شده یا نشده را پوششش می‌دهد. اطلاعات به دست آمده نشان داده اند که تمرکز موتاسیون‌ها در کدون ۹۰-۹۱ و ۹۴ و البته به شکل پراکنده در کدون‌های ۷۴ و۸۷ است. در این مطالعات روی این سه کدون اصلی ۹۰-۹۱ و ۹۴ تمرکز شد. موتاسیون در کدون ۹۰ به شکل Ala-90-Val و Ser-91-Pro انجام می‌شود. اما در ۹۴در هر دو جایگاه ۱و ۲ به شکل کاملا متنوع رخ می‌دهد (۱۱ و ۱۲).

در مطالعاتی که در کشور کویت انجام شده مشخص شده که اگرچه فلوروکینولون‌ها، برای شیمی درمانی سل و آزمایش‌های حساسیت دارویی برای داروهای خط دوم استفاده نمی‌شوند اما در ۷درصد از سویه‌های MDR-TB موتاسیون در ژن *gyrA* وجود دارد. و بنابراین، آزمایش‌های حساسیت دارویی عادی برای این داروی مهم خط دوم نیاز هستند. (۱۳).

اهمیت تعیین موتاسیون‌های منطقه QRDRژن *gyrA* بدین دلیل است که موتاسیون در هر یک از کدون‌های ۹۱، ۹۰ و ۹۴ باعث مقاومت به هر یک از فلوروکینولون‌ها می‌شود (۱۱ و ۱۲). علاوه بر آن، براساس تعریف WHO و CDC اثبات موتاسیون در فلوروکینولون‌ها به همراه موتاسیون در ژن *rrs*، در یک سویهMDR، بیانگر سویه XDR است (۱۴). این مطالعه روی ۳ کدون اصلی ۹۰- ۹۱ و۹۴ تمرکز شد. موتاسیون در کدون ۹۰ به شکل Ala-90-Val و Ser-91-Pro انجام می‌شود. اما در ۹۴ در هر دو جایگاه ۱و ۲ به شکل کاملا متنوع رخ می‌دهد.

علت انتخاب کدون‌های ۹۰-۹۱ و ۹۴ بر اساس بررسی متون و رخداد موتاسیون در این کدون‌ها در

سویه‌های مقاوم بوده است. بدین معنی که سویه‌های مقاوم به فلوروکینولون‌ها، بیشتر در کدون ۹۴ با فراوانی بسیار زیاد (بیش از ۷۰ درصد) در کدون ۹۱ با فراوانی ۱۰ تا ۱۵درصد و در کدون ۹۰ با فراوانی ۵ درصد دچار جهش شده اند. موتاسیون در سایر کدون‌ها در ناحیه QRDR با فراوانی کمتر از ۲ درصد رخ می‌دهد (۱۱)

علت مولکولی انتخاب این کدون‌ها این است که کدون ۹۴، اسید آمینه ای را کد می‌کند که در محل پیچش DNA به دور پروتئین، قرار می‌گیرد. بنابراین، هر گونه تغییر در این اسید آمینه باعث نقص در عملکرد زیرواحد آلفای آنزیم DNAgyrase می‌شود. به همین دلیل موتاسیون در کدون ۹۵، که اسید آمینه کد شده توسط آن، ارتباط ساختاری با DNA ندارد، هیچگونه تاثیری در بروز مقاومت ندارد و بنابراین، این کدون، کدون پلی مورفیسم محسوب می‌شود (۱۵).

تشخیص مقاومت به فلوروکینولون‌ها، اهمیت ویژه‌ای در همه گیری بیماری سل در جامعه دارد. استفاده از کیت‌ها، بیشتر نیاز به تامین دستگاه‌های پرهزینه همراه داشته و وابستگی همیشگی آزمایشگاه به کیت را به‌دنبال دارند. ضمن این‌که هزینه اجرای آزمایش را نیز بسیار افزایش می‌دهند. این روش‌ها پرهزینه و وقت گیر بوده و امکان استفاده از آن به شکل عادی وجود ندارد. بنابراین، روش‌های ساده‌تر در استفاده عادی ترجیح داده می‌شوند (۴)

در اجرای عادی، روش‌های موسوم به In-house، که شامل انواع روش‌های PCR هستند، مناسب‌تر به نظر می‌رسند (۱۶) در جدول۷، از تعیین توالی به عنوان استاندارد طلایی مولکولی استفاده به شده است. نتایج به دست آمده، انطباق قابل قبولی به لحاظ حساسیت و ویژگی، بین نتایج یاد شده را نشان می‌دهد که اثبات کننده کارایی روش در استفاده عادی است. روش اصلی برای بررسی موتاسیون در ژن‌های مرتبط با مقاومت، تعیین موتاسیون‌های احتمالی با کمک تعیین توالی است (۵ و ۹ و ۱۰ و۱۷). این روش هزینه بر و پر زحمت بوده و با توجه به عدم امکان خرید دستگاه و تامین کارکنان متخصص در تمام مراکز، لازم است به مراکز خاص ارسال شود که زمان بیشتری می‌برد. از این روش نمی‌توان در اجرای عادی استفاده نمود (۴). SSCP، روش دیگری است که در چند تحقیق برای بررسی رخداد موتاسیون به ویژه در کدون ۹۴ استفاده شده است (۱۸). این روش به خطای آزمایشگر بسیار حساس بوده و بنابراین، هر گونه بی دقتی آزمایشگر به تشخیص اشتباه مقاومت منجر می‌شود. به ویژه در تشابه الگوی به دست آمده از موتاسیون در کدون ۹۴ (وابسته به مقاومت) و ۹۵ (غیر مرتبط با مقاومت) می‌شود.

با توجه به نتایج این تحقیق، روش As-PCR ارائه شده می‌تواند به عنوان یک روش ساده و سریع برای تعیین مقاومت به افلوکساسین در سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس استفاده شود.

کوشش‌ها در برای دستیابی به روش RFLP و یافتن آنزیم‌های اندونوکلئازی که قادر به برش منطقه ۹۴ باشد، به جایی نرسیده است. بنابراین، در این تحقیق از روش آلل اسپسیفیک پی سی آر (AS-PCR)[3] استفاده شد. به این منظور پرایمرهای اختصاصی طراحی شدند. این پرایمرها برای شناسایی حالت وحشی در جایگاه شماره ۲ در ۹۰، ۱ در ۹۱، ۱ و ۲ در ۹۴ تحت عنوان m1 و m2. این طراحی با توجه به بررسی متون انجام شد و تعیین این مطلب که موتاسیون در کدون ۹۴، در هر دو جایگاه۱ و۲ به کرات شناسایی شده است، انجام شد.

از میان ۴۱ سویه ای که نتیجه آزمایش AS-PCR آن‌ها موتاسیون و مقاومت را نشان داد: ۵ سویه به علت رخ دادن موتاسیون در کدن ۹۰، ۸ سویه به علت رخداد موتاسیون در کدن ۹۱، ۸ سویه به علت رخداد موتاسیون در کدون M1-۹۴، و ۱۲سویه به علت رخداد موتاسیون در کدن M2-۹۴ خود، ویژگی مقاومت نسبت به افلوکساسین را به دست آورده اند.

تعداد ۵ سویه نیز از ۴۱ سویه آزمایش شده نیز، در دو کدن خود دارای موتاسیون و مقاومت به افلوکساسین بودند. همچنین، از این تعداد سویه آزمایش شده، ۵ سویه حساسیت به افلوکساسین را نشان دادند. از ۴ سویه حساس فنوتیپی هم به عنوان شاهد در انجام آزمایش‌ها استفاده شد.

جدول ۶- پیشینه بررسی موتاسیون در ژن *gyrA* به روش‌های متفاوت درسال‌ها و کشورهای مختلف

روش مولکولی انجام شده	درصد موتاسیون یافته‌ها		تعداد نمونه‌های مقاوم فنوتیپی		تعداد نمونه‌های آزمایش شده			موتاسیون	هدف	بازه زمانی	کشور
	حساس	مقاوم	حساس	مقاوم	حساس	مقاوم	کل				
QRDR of .Sequencing *gyrA* and gyrB	۰	۴۰	۰	۱	۴۶	۷۲	۱۱۸	D94N (GAC/AAC)	*gyrA*	.S .N	هند
PCR-SSCP and QRDR of .Sequencing *gyrA*	۰	۴۰	۰	۱	۱۷۹	۷۱	۲۵۰	D94N (GAC/AAC)	*gyrA*	۱۹۹۴- ۲۰۰۴	هنگ کنگ
QRDR of .Sequencing *gyrA* and gyrB	۰	۲۰	۰	۲	۱۰	۶۳	۷۳	D94N (GAC/AAC)	*gyrA*	۲۰۰۴	کره جنوبی
PCR-SSCP and *gyrA*: .sequencing 320bp fragment	۰	۸۰	۰	۱	۸۳	۵۵	۱۳۸	D94N (GAC/AAC)	*gyrA*	۱۹۹۱- ۲۰۰۰	هنگ کنگ
PCR-SSCP and QRDR of .Sequencing *gyrA*	۰	۰	۰	۰	۲۴	۴۴	۶۸	D94N (GAC/AAC)	*gyrA*	.S .N	چین
QRDR of .Sequencing *gyrA* and gyrB	۰	۲۰	۰	۱۰	۲۲	۴۸	۷۰	D94N (GAC/AAC)	*gyrA*	۲۰۰۶	روسیه
Oligobased chip assay .and sequencing QRDR of *gyrA*	۰	۹۰	۰	۸	۱۱۸	۶۷	۱۸۵	D94N (GAC/AAC)	*gyrA*	.S .N	روسیه

همانگونه که در جدول ۶ مشاهده می‌شود، روش‌های مولکولی مورد استفاده تاکنون، برای تشخیص موتاسیون در منطقه QRDR، بیشتر مبتنی بر روش تعیین توالی است. این روش، کارایی مناسبی دارد اما با توجه به هزینه و زمان بر بودن اجرای این روش در آزمایشگاه‌های عادی، امکان استفاده از آن وجود ندارد.

چنگ[۴] در سال ۲۰۰۴ و هوارد[۵] در سال ۱۹۹۴، از روش sscp استفاده کرده اند. این روش که بر مبنای ژن خالص شده و بررسی مقایسه ای الگوی باندهای به دست آمده، در سویه‌های حساس و مقاوم است، بیشتر با احتمال بالای خطای کارکنان همراه است، که در استفاده عادی و حجم بالا، پاسخ‌های منفی و مثبت

کاذب را افزایش می‌دهد. بر اساس جدول ذکر شده در بیشتر مطالعات، کدن ۸۹ به عنوان کدن مرتبط با مقاومت مطرح نشده است. بنابراین، در مطالعه حاضر، با هدف ساده‌سازی روش، این کدن مطالعه نشده است. ضمن آن‌که بررسی نتایج تعیین توالی نمونه‌ها، هیچگونه موتاسیونی را در این کدن نشان ندادند.

در داخل کشور مطالعه ای روی این ژن در سویه‌های کلونیکی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با کمک روش AS-PCR یافت نشد. در خارج کشور نیز مطالعات انجام شده با کمک روش پرهزینه و وقت گیر تعیین ترادف بوده و در هیچ مطالعه ای استفاده از روش AS-PCR مشاهده نشد.

همان‌طور که ذکر شد مطالعات انجام شده در کشورهای مختلف به این شکل بوده که به منظور انجام تعیین ترادف یکPCR با حجم نهایی ۵۰ یا ۱۰۰ میکرولیتری انجام می‌شده و سپس نمونه‌ها تعیین ترادف می‌شدند که این روشی وقت‌گیر و برای بیماران پر هزینه است و نیاز به کارکنانی با مهارت و امکانات آزمایشگاهی در آزمایشگاه‌های عادی دارد. از جمله این مطالعات می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

روش AS-PCR برای تعیین موتاسیون در ژن *gyrA* در سویه‌های مقاوم به داروی افلوکساسین مایکوباکتریوم توبرکلوزیس روشی سریع و در دسترس و همچنین با قدرت تشخیصی و دقت بالا است. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که AS-PCR می‌تواند به عنوان یک روش سریع و عادی در تشخیص مقاومت مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به افلوکساسین در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی استفاده شود. این روش برای تشخیص سریع و در دسترس سویه‌های مقاوم باکتری و درمان به موقع بیماران مبتلا و جلوگیری از افزایش هزینه بیماران انجام شد. استفاده از این روش می‌تواند به حذف سریع‌تر یک عامل انتشار بیماری به دنبال تشخیص به موقع یک بیمار مقاوم به دارو و درمان آن منجر شود که این مساله ازدیدگاه همه‌گیر شدن بیماری بسیار دارای اهمیت است. از آنجایی که روش ارائه شده در این تحقیق، هیچگونه وابستگی به کیت، دستگاه ویژه و یا مواد ویژه و اختصاصی برای آزمایشگاه عادی به دنبال ندارد و نیز هزینه برای روش، در حد یک PCR کاملا معمولی بوده و هیچگونه هزینه اضافی به آزمایشگاه تحمیل نمی‌کند همچنین، سرعت عمل روش قابل قبول است. بنابراین، امکان اجرای آن، به عنوان آزمایش عادی آزمایشگاهی، حتی در آزمایشگاه‌هایی که تعداد نمونه‌های مورد پذیرش بالایی به شکل روزانه دارند، وجود دارد و پیشنهاد می‌شود که این روش جایگزین روش‌های سخت و پر هزینه در آزمایشگاه‌های عادی و مراکز تحقیقاتی شود.

تشکر و قدردانی

این پژوهش بخشی از طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی اراک و همچنین، قسمتی از پایان‌نامه دانشجویی خانم وحیده وحیدی دانشجوی دوره کارشناسی ارشد است. بنابراین، بدین‌وسیله از معاونت پژوهشی این دانشگاه تشکر و قدردانی می‌شود.

References

(1) Mardani,m. multi-drug resistant TB: a global problem. *Research in Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences*. 2008; 31 (4): 299- 301.

(2) Pakzad I, Azizi Jalilian F. Drug resistance mechanism towards Isoniazide in Mycobacterium Tuberculosis considering molecular genetics. *Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences* 2001; 9 (31): 41-6.

(3) Lawn, SD, Zumla, AI. Tuberculosis. *Lancet* 2011; 378: (9785): 57–72.

(4) H. E. Takiff, "Tuberculosis 2007," in From Basic Science to Patient Care. Tuberculosis Textbook. Com, J. C. Palomino, S. C. Leão, and V. Ritacco, Eds. pp. 207- 262, 1st edition,.

(5) Pitaksajjakul P, Worakhunpiset S, Chaiprasert A, Boonyasopun J, Ramasoota P. *gyrA* and gyrB mutations in ofloxacin-resistant Mycobacterium tuberculosis clinical isolates in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2011; 42 (5): 1163-7.

(6) Chakravorty S, Aladegbami B, Thoms K, Lee JS, Lee EG, Rajan V, Cho EJ, et al. Rapid detection of fluoroquinolone-resistant and heteroresistant Mycobacterium tuberculosis by use of sloppy molecular beacons and dual melting-temperature codes in a real- time PCR assay. *J Clin Microbiol.* 2011; 49 (3): 932-40.

(7) Von Groll A, Martin A, Jureen P, Hoffner S, Vandamme P, Portaels F, et al. Fluoroquinolone resistance in Mycobacterium tuberculosis and mutations in *gyrA* and gyrB. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009; 53 (10): 4498-500.

(8) M. Rathore1, Girish Pai1, T. K. Jayalakshmi 2 and D. S. Joshi1 rapid detection of multidrug-resistant mycobacterium tuberculosis by real-time PCR based assay in indian population, 1mgm institute of health sciences, kamothe sec-18, navi mumbai 2jayalakshmi clinic, govandi, mumbai. *recent research in science and technology*. 2011, 3 (3): 58-62.

(9) Shi R, Zhang J, Li C, Kazumi Y, Sugawara I. Emergence of ofloxacin resistance in Mycobacterium tuberculosis clinical isolates from China as determined by *gyrA* mutation analysis using denaturing high-pressure liquid chromatography and DNA sequencing. *J Clin Microbiol*. 2006; 44 (12): 4566-8.

(10) Perdigão J, Macedo R, João I, Fernandes E, Brum L, Portugal I. Multidrug- resistant tuberculosis in Lisbon, Portugal: a molecular epidemiological perspective. Microb *Drug Resist*. 2008; 14 (2): 133-43.

(11) Cui Z, Wang J, Lu J, Huang X, Hu Z. Association of mutation patterns in *gyrA*/B genes and ofloxacin resistance levels in Mycobacterium tuberculosis isolates from East China in 2009. *BMC Infect Dis*. 2011 29; 11: 78.

(12) Aubry A, Veziris N, Cambau E, Truffot-Pernot C, Jarlier V, Fisher LM. Novel gyrase mutations in quinolone-resistant and - hypersusceptible clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis: functional analysis of mutant enzymes. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006; 50 (1): 104-12.

(13) Al- Mutairi NM, Ahmad S, Mokaddas E. First report of molecular detection of fluoroquinolone resistance- associated *gyrA* mutations in multidrug-resistant clinical Mycobacterium tuberculosis isolates in Kuwait. *BMC Res Notes*. 2011;14(4): 123.

(14) World Health Organization, Laboratory Services in Tuberculosis Control: Culture, chapter3, Geneva, 1998 (WHO/TB/98).

(15) Lari N, Rindi L, Sola C, Bonanni D, Rastogi N, Tortoli E, Garzelli C. Genetic diversity, determined on the basis of katG463 and *gyrA*95 polymorphisms, Spoligotyping, and IS6110 typing, of Mycobacterium tuberculosis complex isolates from Italy. *J Clin Microbiol*. 2005; 43 (4): 1617- 24.

(16) Soini H, Musser JM. Molecular diagnosis of mycobacteria. *Clin Chem*. 2001; 47 (5): 809- 14.

(17) Mitarati. S, M Kafwabulula. L. Tropical medicine and health Mycobacterium tuberculosis and *gyrA* variation in Zambia. *Trop Med Health*. 2005; 33 (2): 91-4.

(18) Takiff HE, Salazar L, Guerrero C, Philipp W, Huang WM, Kreiswirth B, et al. Mycobacterium tuberculosis *gyrA* and *gyrB* genes and detection of quinolone resistance mutations. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38 (4): 773-80.

[1] Wild type
[2] Sequencing
[3] Allelespecific-PCR (AS-PCR)
[4] Cheng
[5] Howard

Allele Specific-PCR method for rapid detection of gyrA gene mutaions in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*

Vahideh Vahidi
MSc Student of Microbiology,Department of microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran, vahide.vahidi@yahoo.com
Mohammad Reza Zolfaghari
Assistant Professor of Microbiology,Department of microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran, mreza.zolfaghary@gmail.com
Azam Ahmadi
Ph.D student of Molecular Genetics, TMU and Tuberculosis and Pediatric Infectious Disease Research Center , ArakUniversity of Medical Sciences, Arak, Iran,ahmadia22@yahoo.com
Mana Shojapour
Ph.D student of Molecular Medicine, Research Center of Molecular Medicine, University of Medical Sciences, Arak, Iran, mana_shojapuor@yahoo.com
Seyed Reza Moadab
Assistant Professor of TB and Pulmonary Diseases research center, Tabriz University of Medical Sciences, Iran, seyyedreza_moaddab@yahoo.com
Mohammad Arjomandzadegan *
Assistant Professor of Medical Bacteriology, University of Medical Sciences, Arak, Iran, arjomandzadegan@arakmu.ac.irn

Abstract

Introduction: Resistance to Fluroquinolones drugs are increasingly expanded. A molecular method was designed and compared for rapid detection of resistance to ofloxacin in clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis.

Materials and methods: From 136 M. tuberculosis clinical isolates, 41 strains were used for comparison of detection of mutations associated with resistance in *gyrA* gene by Allele Specific-PCR (AS PCR). Specific internal primers were designed for detecting any changes in 90, 91 and 94 codons. Sequencing method was accomplished for evaluation of the results as gold standard.

Results: AS-PCR method could detect mutations by formation or not formation of internal bounds and had good performance. Totally, from 37 strains phenotypically resistant to ofloxacine 32 strains were mutant and 5 strains were non mutant that have Sensitivity and specificity, 86/11% and 100%, respectively. Sequence results were concordant by results molecular methods.

Discussion and conclusion: Results of the study showed that AS-PCR method could be used as a routine test for fast detection of resistance to fluroquinolones in *M. tuberculosis*.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, Allele Specific-PCR, Ofloxacin

* Corresponding author; Tuberculosis and Pediatric Infectious Research Center, Arak University Of Medical Sciences, Iran, mmatinam81@yahoo.com, arjomandzadegan@arakmu.ac.irn
Received: January 8, 2013 / **Accepted:** October 7, 2013