تشخیص سریع حساسیت به اناموتول در سویه‌های ماکیوبکتریوم توربکلوزیس

PCR-RFLP

ایزوله شده از بیماران مسلول با روش مولکولار

معصومه طاهرزاده ۱، اعظم احمدی ۲، مانا شجاعی ۳، رضا نظری ۴، رضا مودب، محمد ارجنمی ۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۴/۰۴ 
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۶/۱۸

چکیده

پیش زمینه و هدف: اناموتول یکی از داروهای کلیدی جهت درمان بیماری سل بوده و بررسی مقاومت به آن به صورت فراوانی‌دار گزارش می‌شود. در مطالعه‌های سریع مقاومت سویه‌های ماکیوبکتریوم توربکلوزیس نسبت به (Restriction Fragment Length PCR-RFLP Polymorphism) ایناموتول مورد بررسی قرار گرفته است.

روش بررسی: در این مطالعه از ۱۲۷ سویه ماکیوبکتریوم توربکلوزیس در مرکز تحقیقات سل اراک، سویه‌های مورد انتخاب و مورد بررسی قرار گرفتند. جداسازی DNA از سویه‌ها به‌وسیله Chemex um을 ۱۰۰ انجام گردید. PCR رنگ ۳۷۰ (۵ زن) انجام گردید. در مطالعه مورد نظر، هشت آنتی‌بیوتیک PCR RFLP مورد استفاده قرار گرفت. انتخاب این آنتی‌بیوتیک به‌وسیله‌ی مسنج‌برداری ATG-PCR و درآوردن مقادیر فیکاسیون، سویه‌های مورد بررسی در دو گروه PCR-RFLP و PCR-RFLP ثانویه‌ای قرار گرفت. نتیجه گیری: نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که روش PCR می‌تواند به عوامل یک روش ساده و سریع برای تعیین حساسیت به اناموتول در سویه‌های ماکیوبکتریوم توربکلوزیس مورد استفاده قرار گیرد.

کلید واژه‌ها: اناموتول، ماکیوبکتریوم توربکلوزیس, PCR-RFLP

مجله پزشکی اروپی، دوره بیست و چهارم. شماره هشتم، ص. ۵۷۷-۵۷۶، آبان ۱۳۹۲

آدرس مکاتبات: مرکز تحقیقات سل و عفونی کودکان، گروه میکروب شناسی، اینمی‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، تلفن: ۹۸۸۶۱۸۱۲۵,

Email: mmatinam81@yahoo.com

مقدمه

با کشف میکروب سل در سال ۱۸۸۲ توسط رابرت کوک، بشر امیدوار شده که بیماری سل کنترل و در نهایت ریشه‌گیری

خواهد شد. اما امروزه با گذشت یک و ۱۵۰ سال از کشف اولین داروی ضد سل به‌گارگیری اندوز تغییرات شیمیایی پیش‌رفت و دسترسی به انواع داروهای ضد سل جدید، بیماری ریشه‌گیری شده است. 

دانشجوی کارشناسی ارشد، میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فاریاب، گروه میکروبیولوژی

دانشجوی کارشناسی ارشد، زیست شناسی و مولکولی، مرکز تحقیقات سل و عفونی کودکان، دانشگاه علوم پزشکی اراک

دانشجوی دکتری تخیضی، پزشکی میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی اراک

دانشجوی دکتری تخیضی، پزشکی میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی واحد فاریاب، گروه میکروبیولوژی

دانشگاه علوم پزشکی اراک

استادیاردکریک، تخیضی میکروبیولوژی

استادیاردکریک، تخیضی میکروبیولوژی

استادیاردکریک، تخیضی میکروبیولوژی

استادیاردکریک، تخیضی میکروبیولوژی

استادیاردکریک، تخیضی میکروبیولوژی

استادیاردکریک، تخیضی میکروبیولوژی

استادیاردکریک، تخیضی میکروبیولوژی

استادیاردکریک، تخیضی میکروبیولوژی

استادیاردکریک، تخیضی میکروبیولوژی

استادیاردکریک، تخیضی میکروبیولوژی

استادیاردکریک، تخیضی میکروبیولوژی

استادیاردکریک، تخیضی میکروبیولوژی

استادیاردکریک، تخیضی میکروبیولوژی

استادیاردکریک، تخیضی میکروبیولوژی

استادیاردکریک، تخیضی میکروبیولوژی

استادیاردکریک، تخیضی میکروبیولوژی

استادیاردکریک، تخیضی میکروبیولوژی

استادیاردکریک، تخیضی میکروبیولوژی

استادیاردکریک، تخیضی میکروبیولوژی

استادیاردکریک، تخیضی میکروبیولوژی

استادیاردکریک، تخیضی میکروبیولوژی

استادیاردکریک، تخیضی میکروبیولوژی

استادیاردکریک، تخیضی میکروبیولوژی

استادیاردکریک، تخیضی میکروبیولوژی

استادیاردکریک، تخیضی میکروبیولوژی

استادیاردکریک، تخیضی میکروبیولوژی

استادیاردکریک، تخیضی میکروبیولوژی

استادیاردکریک، تخیضی میکروبیولوژی

استادیاردکریک، تخیضی میکروبیولوژی

استادیاردکریک، تخیضی میکروبیولوژی

استادیاردکریک، تخیضی میکروبیولوژی

استادیاردکریک، تخیضی میکروبیولوژی

استادیاردکریک، تخیضی میکروبیولوژی

استادیاردکریک، تخیضی میکروبیولوژی

استادیاردکریک، تخیضی میکروبیولوژی

استادیاردکریک، تخیضی میکروبیولوژی

استادیاردکریک، تخیضی میکروبیولوژی

استادیاردکریک، تخیضی میکروبیولوژی

استادیاردکریک، تخیضی میکروبیولوژی

استادیاردکریک، تخیضی میکروبیولوژی

استادیاردکریک، تخیضی میکروبیولوژی

استادیاردکریک، تخیضی میکروبیولوژی

استادیاردکریک، تخیضی میکروبیولوژی

استادیاردکریک، تخیضی میکروبیولوژی

استادیاردکریک، تخیضی میکروبیولوژی

استادیاردکریک، تخیضی میکروبیولوژی

استادیاردکریک، تخیضی میکروبیولوژی

استادیاردکریک، تخیضی میکرو
For the detection of Mycobacterium tuberculosis (Mtb) DNA, a method using CHELEX extraction and PCR has been employed. CHELEX, a commercially available resin, is used to isolate DNA from bacterial cells. PCR (Polymerase Chain Reaction) is then used to amplify the target DNA sequence. DNA is extracted from clinical samples using CHELEX (100 CHELEX) and subjected to PCR. Touch Down PCR-RFLP method is employed for the analysis. Specific primers are used to amplify the DNA fragment of interest. The amplified DNA is then subjected to restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis. The resulting restriction fragments are visualized on an agarose gel to identify the presence or absence of Mtb DNA. This method allows for the detection of Mtb DNA with high sensitivity and specificity.
مشخص سری عضوت به اتمان‌تویل در سه‌های ماکروکاتریپوی...
رشابده رمی: انجام PCR زن embB را نشان می‌دهد. در نمونه مورد مطالعه و سوبه اکتروفورز زن PCR استاندارد H37Rv، باند 167bp را ارائه نمود. تصویر شماره 3انگوی

[عکس]

شکل شماره (3): زل آگار- الکتروفورز محصول زن PCR H37Rv به همراه سوبه استاندارد

بيبشنی، همان‌گونه که با ترمیفاز، سوبه‌های مقاوم ابتیال باندهای 39.24، 44، 47 و باندهای حساس ابتیال باندهای 39.26، 39.24، 44، 47 لها نمود. این روش برای 23 سوبه انجام ویا با توجه به سبک بودن باندها و احتمال رخداد خطای بر روی روشین، کنار گذاشته شده به شکل سنپ مربوط به آنزیم (NlaIII) توجه شود.

نتایج تری دنج (NlaIII) برای یک کمک آنزیمی به کمک RFLP در این روش محصول بریش آنزیمی به کمک

[عکس]

شکل شماره (4): زل یلی آگرل آمید نریصد-الگوهای زن RFLP پس از هضم آنزیمی توسط NlaIII
در این روش، نتایج بدست آمده بیانگر امکان پذیری تمامی خوب الگوی سیویه‌ای حساس و مقاوم با کمک این آنزیم در کار روند بودن بدین ترتیب که سیویه‌ای حساس باند (82bp) و سیویه‌ای مقاوم باند 167bp را تشکیل می‌دهند در این روش دو روند بودن بدین ترتیب به جای استفاده از روش آگر درآمده که زمان بر و پژوهش می‌باشد. می‌توان به سادگی از روش آگر برای بررسی نتایج استفاده‌نامود.

**شکل شماره (۵) : زن RFLP کوهه‌ای emB ۵' از هضمن آنزیمی HaeIII**

روس غیر موتان تشخیص داده شد لذا این روش برای تعیین سیویه حساس دارای حساسیت و ویژگی ۱۰۰درصد می‌باشد. بدین معنی که تست قادر است با صحت ۱۰۰درصد، سیویه حساس را تعیین نماید که این مسئله از دیدگاه بالینی بسیار ارزشمند است.

نتایج سکوئنس‌بندی برای ارزیابی صحت نتایج PCR-RFLP که با استفاده از پنل از طریق رخ مولکولی استفاده شد اطلاعات کامل PCR-RFLP نشانگرد دقت روش مورد استفاده از دیدگاه مولکولی بود.

SENTON ۱(۶) سایز مارکر (۵۰۰bp)
SENTON ۲(۴) سیویه‌ای حساس با دو باند (۸۵ و ۸2bp)
SENTON ۳(۲) سیویه‌ای مقاوم
SENTON ۴(۴) سیویه‌ای مقاوم

**مورت بررسی قرار گرفتند. از ۴۳ سیویه مقاوم، ۱۹ سیویه با این روش مورد بررسی قرار گرفتند. در سیویه مقاوم در کشور ۴۴ سیویه غیر موتان تشخیص داده شدند تمامی ۱۷ سیویه حساس، غیر موتان بودند این روش برای تعیین سیویه حساسیت و ویژگی ۱۰۰درصد مختصه غرید.

با یکم این روش مشخص کردن که تمامی ۱۷ سیویه حساس، غیر موتان بودند. ضمن اینکه سیویه H37Rv نیز با این
تشخیص سری سیستم‌ها به‌وسیله PCR-RFLP در سویه‌های مایکروبکتریوم

مقدمه:
همه‌شیمه‌های مایکروبکتریوم (Genotype MTBDRsl) در سال 2010، سویه‌کلینیکی مایکروبکتریوم Florence نوبرگلوژس را با روش DNA عبری MTBDRsl و تعیین توالی آزمون DNA در بررسی سری سیستم‌ها در شناسایی بیماران با ناحیه‌ای از موزه و بروز آزمون MTBDRsl کرد. حساسیت و ویژگی آزمون در سطح بین- آزمون در شناسایی می‌باشد که در مورد هر دو سویه حساس و 16 سویه حساس در ETB، 22 نشان داد که در ژن embB از 10 حساس بود. و سیل تعیین توالی DNA در مطالعه امانده از 12 سویه حساس به DNA MTBDRsl در سویه‌های ژن embB در مطالعه 19 از 24 سویه غیر منتشر خصوصی داده شده و نشان داد که در نشانه‌های مثبت مشخص شده که این روش برای تعیین سویه حساس دارد و حساسیت و ویژگی بهتر (36). بدون ترتیب، نتایج که با نتایج مولکولی (تعیین رخداد) مونتاژ دارای حساسیت بیشتری، در عین ویژگی (بیمار) اطلاع کامل ندارند، رخداد هم‌پوشانی در آزمون تغییر سویه‌های مقیاس محور مولکولی در تغییرات گذشته‌های مورد شده است (13، 8، 5)، در اقیان تغییرات آن با تغییرات مثبت این سیستم در مقایسه ما نیز تایید کننده تحقیقات مثبت امکان‌پذیر می‌باشد. در نهایت، آن‌ها با نتایج PCR-RFLP بر اساس نظر مستقل محکم، محصولات‌های متعادل در مورد استفاده از ازمون روش جدید در تشخیص بیماری موجود است. در Genotype روش جدید از ازمون روش جدید در تشخیص بیماری موجود است. در Genotype روش جدید از ازمون روش جدید در تشخیص بیماری موجود است. در Genotype روش جدید از ازمون روش جدید در تشخیص بیماری موجود است. در Genotype روش جدید از ازمون روش جدید در تشخیص بیماری موجود است. در Genotype روش جدید از ازمون RFLP ژن embB نیستند نتایج تعیین توالی نزدیک عدم رخداد مونتاژ در کل زن را نشان داده که موجب نتایج سایر محکم‌اندیش می‌باشد.
جدول شماره (1): بررسی نتایج سایر محققین در استفاده از روش‌های مولکولی، عدم انطباق فنوتیپی و زنتوتیپی و مغز بودن ویژگی Specificity در تمام روش‌های مولکولی و نیز وضعیت مونوسایس در سویه‌های حساس قبل مشاهده است.

<table>
<thead>
<tr>
<th>محقق</th>
<th>سال</th>
<th>عدد سویه‌های موقوف در کدون 546 در سویه‌های حساس</th>
<th>عدد سویه‌های موقوف در کدون 344 در سویه‌های حساس</th>
<th>توپکلوزیرس</th>
<th>میزان حساسیت درصد</th>
<th>میزان ویژگی درصد</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Kiet, 2010</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td>MTBDRsl Test</td>
<td>100%</td>
<td>53%</td>
</tr>
<tr>
<td>Patricia, 2011</td>
<td></td>
<td>14</td>
<td>160</td>
<td>DNA sequencing</td>
<td>96%</td>
<td>100%</td>
</tr>
<tr>
<td>Jeong, 2010</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td>Direct DNA Sequencing</td>
<td>96%</td>
<td>95%</td>
</tr>
<tr>
<td>Yasuo Shimizu, 2008</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td>DNA Microarray</td>
<td>96%</td>
<td>96%</td>
</tr>
<tr>
<td>Huang, 2011</td>
<td></td>
<td>72</td>
<td>243</td>
<td>GenoType MTBDRsl Test</td>
<td>96%</td>
<td>96%</td>
</tr>
<tr>
<td>Palomino, 1999</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td>MTBDRsl Test</td>
<td>100%</td>
<td>95%</td>
</tr>
<tr>
<td>Belay, 2012</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td>GenoType® MTBDRsl</td>
<td>96%</td>
<td>96%</td>
</tr>
<tr>
<td>Anamika, 2011</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td>Nitrate Reductase</td>
<td>96%</td>
<td>96%</td>
</tr>
<tr>
<td>Agatha, 2008</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td>Nitrate Reductase</td>
<td>96%</td>
<td>96%</td>
</tr>
<tr>
<td>Florence, 2010</td>
<td></td>
<td>27</td>
<td>52</td>
<td>MTBDRsl Test and DNA Sequencing</td>
<td>96%</td>
<td>96%</td>
</tr>
<tr>
<td>Hillemann, 2009</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td>MTBDRsl Test and DNA Sequencing</td>
<td>96%</td>
<td>96%</td>
</tr>
</tbody>
</table>

پایه به بررسی منابع علمی مندرج در جدول شماره (1) در مطالعه احمد، واسطهٔ 157 سویهٔ انتخاب شده از مجموعه بیش از 2000 ازولول بالینی مایکوبکتیروئیم توپکلوزیرس نشان داد که در تمام سویه‌های مقاوم به اتامیتوئول، مقاومت به ازولوآژین هم دیده می‌شود همچنین در سویه‌های دارای مقاومت بالا به اتامیتوئول، مقاومت با تمایل به ازولوآژین هم دیده می‌شود بر اساس نظر احمد، با وجود درصد بالای انطباق فنوتیپی و زنتوتیپی در مقاومت به اتامیتوئول، سرعت بروز مقاومت و مشخص کردن سویه‌های مقاوم (با احتمال وجود مقاومت چندگانه) سپاس می‌گیرد و کاملاً اجرای روش تشخیص سریع مولکولی را (با وجود حساسیت حدود 70 درصد) توجیه می‌نماید (14).

<br>بر اساس تحقیقات انجام شده (2007-2020) از ابزار مقاومت به اتامیتوئول با مقاومت چندگانه به دارو و نیز ازولوآژین در مایکوبکتیروئیم توپکلوزیرس انتلاش شده است (16).
References:


RAPID DETECTION OF SUSCEPTIBILITY TO ETHAMBUTOL IN CLINICAL MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS ISOLATED FROM TUBERCULOSIS PATIENTS BY PCR- RFLP

Masumeh Taherahmadi¹, Azam Ahmadi², Mana Shojapour³, Raziye Nazari⁴, Seyed Reza Moada⁵, Mohammad Arjomanzadegan⁶

Received: 2 Jul, 2013; Accepted: 9 Sep, 2013

Abstract

Background & Aims: Ethambutol is a key drug to treatment of tuberculosis; and resistance against it has been increasingly reported. In this study, Polymerase Chain Reaction -Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) method in rapid detection of tuberculosis mycobacterium strains against the ethambutol has been investigated.

Materials & Methods: This study was conducted on 60 strains that were selected from 127 strains in Tuberculosis and Pediatric Infections Research Center. DNA was extracted by Chelex 100 method. PCR test was performed using specific primers for embB gene. Digestions of PCR products with HaeIII and NlaII restriction enzymes, then the pattern of restriction fragments generated were analyzed. The section was sequenced in a few samples, and it was compared to the presented method as golden standard.

Results: Out of 60 studied stains, 43 were phenotypically resistant to ethambutol, and 17 were sensitive. PCR revealed that the band 167 showed the correct selection of primers and the appropriate plan of amplification. Out of 43 resistant strains, 19 stains were diagnosed to have mutation in ATG-Met codon 360 using RFLP method, and 24 were found to be non-mutant.

Conclusion: According to the findings, that PCR-RFLP can be a simple and rapid method to diagnose the ethambutol -sensitivity in tuberculosis mycobacterium strains.

Keywords: Ethambutol, Mycobacterium Tuberculosis, PCR- RFLP

Address: Arak University of Medical Sciences, Tuberculosis and Pediatric Infections Research Center, Faculty of Medicine Arak, Arak, Iran   Tel: +98 861 4173502
E.mail: mmatinam81@yahoo.com


¹ Master Student, Department of Microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran
² Master Student, Molecular and Medicine Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran
³ PhD Student, Molecular and Medicine Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran
⁴ Assistant Professor, Department of Microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran
⁵ Tuberculosis and Lung Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
⁶ Tuberculosis and Pediatric Infections Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran (Corresponding Author)