تحقیقی

مقاومت به ریفامپین و ایزونیازید در *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس های* جدا شده از مسلولین استان گلستان

سیده ناعمه جاوید
کارشناس ارشد میکروبیولوژی ، دانشگاه آزاد لاهیجان

عزت الله قائمی
دانشیار میکروبیولوژی ،دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات عفونی ، دانشگاه علوم پزشکی گلستان

نور امیرمظفری
دانشیار میکروبیولوژی دانشگاه علوم پزشکی ایران

سهیل رفیعی
پزشک عمومی، معاونت بهداشتی و مرکز تحقیقات عفونی دانشگاه علوم پزشکی گلستان

عبدالوهاب مرادی
دانشیار میکروبیولوژی دانشگاه علوم پزشکی گلستان

تینا دادگر
دکترای میکروبیولوژی دانشگاه آزاد شیراز

نویسنده مسئول: سیده ناعمه جاوید
تلفن: ۰۹۱۱۱۷۷۰۱۹۵
پست الکترونیک: naeme_javid@yahoo.com
آدرس: گلستان، دانشگاه علوم پزشکی گرگان

وصول مقاله: ۸۸/۴/۶
اصلاح نهایی: ۸۸/۷/۸
پذیرش مقاله: ۸۸/۷/۱۹

چکیده

زمینه و هدف: *بیماری سل با تقریباً ۹ میلیون مورد جدید در هر سال، هنوز یکی از خطرناکترین بیماریها در جهان است. پیدایش و انتشار سل مقاوم به داروهای اصلی ضد سل دارای اهمیت زیادی می باشد. این تحقیق با هدف تعیین میزان مقاومت دارویی ضد سل در بیماران مسلول کشت مثبت مراجعه کننده به بخش سل مرکز بهداشت استان گلستان انجام پذیرفت.*

روش بررسی: *در این مطالعه مقطعی از افراد مراجعه کننده به مرکز سل شهرستان گرگان، طی سال ۱۳۸۷، ۱۰۴ نمونه کشت مثبت به دست آمد . استخراج DNA از کلنی با استفاده از روش جوشاندن و تعیین گونه ،مقاومت به ریفامپین و ایزونیازید با روش PCR به ترتیب با استفاده از پرایمرهای اختصاصی IS6110، ژن rpoB و ژن های katG و inhA انجام یافت. روش proportional هم با عنوان روش Gold standard در ۴۵ نمونه و مطابق با روش پیشنهادی WHO اجرا شد.*

یافته ها: *از ۱۰۴ نمونه کشت مثبت با استفاده از پرایمر IS6110 مشخص گردید که ۸۷ مورد مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می باشد.مقاومت به ایزونیازید و ریفامپین در این گروه به ترتیب (۶/۹٪)۶ و (۴/۶٪)۴ برآورد گردید و (۲/۳٪)۲ مورد هم MDR بودند.*

مقایسه دو روش PCR و proportional اثبات کرد که اختصاصیت و حساسیت روش PCR در تعیین مقاومت به ایزونیازید و ریفامپین به ترتیب ،۹۵/۳٪ ، ۵۷/۱٪ و ۹۷/۴٪ ، ۳۳/۳٪ است.

نتیجه گیری *نتایج این تحقیق بیانگر آن است که هنوز موارد MDR در این استان فراوان نیست.وجود حدود ۱۶٪سویه های غیر توبرکلوز در این مطالعه نشان می دهد که برای مراکز بهداشتی که در تشخیص سل فعالیت می نمایند ضروری است تا تعیین سوش جدا شده با روشهای بیوشیمیایی و یا PCR انجام گردد تا سویه های غیر توبرکلوزیس شناسائی شده و موارد شکست درمان کاهش یابد*

واژه‌های کلیدی: *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس ، مقاومت دارویی ، PCR ، proportional ،استان گلستان*

مقدمه

بیماری سل با تقریباً ۹ میلیون مورد جدید در هر سال، هنوز یکی از خطرناکترین بیماریها در جهان است(۱). حدود یک سوم جمعیت جهان(۲ میلیارد نفر) به عامل این بیماری آلوده اند هستند، ۲۰ میلیون نفر در جهان به این بیماری مبتلا هستند و متأسفانه ۲ میلیون نفر هم در هر سال در اثر این بیماری فوت می کنند(۲).با گسترش پاندمی ایدز در جهان و ظهور و گسترش سویه های *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* مقاوم به دارو به ویژه سویه های MDR، با مقاومت همزمان میکروب سل نسبت به حداقل دو داروی ایزونیازید و ریفامپین، اثر درمانهای دارویی برای TB به شدت سرکوب شده است(۳).طبق آخرین گزارشهای WHO در سال ۲۰۰۸، بیشترین میزان بروز MDR در کشورهای چین ،هندوستان و روسیه فدرال وجود دارد که بیش از ۶٪ تخمین زده شده است.همچنین MDR در ایران در حدود ۵٪ می باشد(۴). با گسترش این سویه های مقاوم، اجرای آزمونها حساسیت دارویی نسبت به قبل از اهمیت بیشتری برخوردار شده است. شناخت اصول ژنتیک مقاومت دارویی به ایجاد روشهایی مؤثر برای تعیین سریع مقاومت دارویی سویه های *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* کمک خواهد کرد.ایزونیازید(INH) و ریفامپین (RIF)، از مهمترین داروهای ضد سل هستند. مقاومت به ایزونیازید در نتیجه جهش در ژنهای متعددی رخ می دهد که از مهمترین آنها می توان به ۲ ژن *katG* و *inhA* اشاره کرد و مقاومت به ریفامپین تقریباً همیشه در نتیجه جهشهای نقطه ای در ژن *rpoB* (ژن کد کننده زیر واحد β، RNA پلی مراز) ایجاد می شود. تست های حساسیت دارویی بر پایه کشت برای رسیدن به جواب در حدود ۴-۶ هفته زمان نیاز دارند، در صورتی که برای کاهش میزان مرگ و میر در بیماران آلوده شده با سویه های مقاوم MTB شناسایی سویه های مقاوم در زمانی کوتاهتر ضروری به نظر می رسد(۵).این مطالعه با هدف مقایسه روش PCR با روش Proportional در تعیین مقاومت به ایزونیازید و ریفامپین در استان گلستان که از نظر آمار بروز سل کشوری در مکان دوم بعد از استان سیستان و بلوچستان قرار دارد، اجرا شد.

روش بررسی

در این مطالعه مقطعی از افراد مراجعه کننده به مرکز سل شهرستان گرگان، طی سال ۱۳۸۷،کشت نمونه های بیولوژیک ارسالی از موارد جدید (New case)بعد از هضم و آلودگی زدایی نمونه ها به روش پتروف(۶) و با استفاده از سود ۴٪ بر روی محیط لونشتاین-جنسن انجام یافت و تا ظهور کلنیهای مشابه *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* در گرمخانه $37\ ^{o}c$ انکوبه گردید که در نهایت ۱۰۴ نمونه کشت مثبت به دست آمد. برای تمامی بیماران اطلاعات دموگرافیک فراهم شده، وضعیت بیماری از طریق پرسشنامه تکمیل شد و نتایج اسمیر نیز ثبت گردید. بررسی مقاومت با روش PCR در کل نمونه ها انجام یافت و توانستیم روش Proportional را در ۴۵ عدد از نمونه ها مطابق با روش استاندارد WHO انجام دهیم.

روش proportional:این روش بر روی محیط L-J و مطابق با روش استاندارد (۷) اجرا شد. برای هر دارو، تنها یک غلظت مشخص به کار رفت که در مورد ایزونیازید µg/ml ۰/۲(SIGMA-ALDRICH) و ریفامپین µg/ml ۴۰ (Riedel-de Haën) بود.

روش کار به این ترتیب بود که ۳-۴ کلنی یکدست (حدود ۵-۴ میلی گرم) از کشت تازه میکوباکتریومهای جداشده از بیماران را برداشته و در داخل لوله شیشه ای که حاوی ml ۵ آب مقطر استریل و ۳۰ عدد گلوله شیشه ای (پرل) می باشد، سوسپانسیون کرده و آن را به مدت ۲۰ تا ۳۰ ثانیه مخلوط می کنیم.به این ترتیب سوسپانسیون استانداردی حاوی mg/ml ۱ از باسیل سل خواهیم داشت و از این سوسپانسیون دو غلظت ۱/۱۰۰ و ۱/۱۰۰۰۰ را تهیه کرده که به ترتیب 10^{-4} mg و 10^{-6} mg از باسیل در هر محیط ایجاد می گردید.در نهایت ml ۰/۱ از این دو رقت را بر روی دو محیط فاقد دارو با عنوان کنترل و دو محیط حاوی دارو کشت دادیم و در روز بیست و چهارم و چهل و دوم از زمان انکوباسیون نتایج را خواندیم.اگر تعداد کلنیهای به دست آمده در محیط حاوی دارو بیشتر از ۱٪ کلنیهای ایجاد شده در محیط کنترل بود آن سویه با عنوان مقاوم و در غیر این صورت با عنوان حساس درنظر گرفته می شد.

روش PCR استخراج DNA: ۳-۲ کلنی از سطح محیط LJ برداشته و در ۱۰۰µl آب مقطر دو بار تقطیر سوسپانسیون می کنیم. سپس ۱۰۰µl کلروفرم به آن می افزاییم و خوب مخلوط می کنیم. مخلوط حاصل را در ۸۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه می نماییم.در مرحله بعد در ۱۲۰۰۰ دور به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ می کنیم ، سپس محلول رویی را جدا کرده و به عنوان DNA الگو مستقیماً در PCR استفاده می نمائیم(۸).

برای شناسایی گونه مایکوباکتریوم از پرایمر های اختصاصی IS6110 (جدول ۱) استفاده گردید. مخلوط واکنش در حجم نهایی ۵۰µl آماده شد که حاوی (0.75 mM $MgCl_2$ ، 0.5X PCR buffer و 200 µM از دزکسی ریبونوکلئیک اسید (dNTP)، 0.5 µmol از هر پرایمر، 0.5 Unit از آنزیم Taq DNA polymerase و 5µl از DNA الگو می باشد(جدول ۲). (PCR buffer،dNTP و Taq محصول شرکت Roche و پرایمر ها ساخت شرکت cinnagen بودند).شرایط واکنش به صورت ۹۵ ^{o}c به مدت ۳ دقیقه و ۴۰ سیکل که هر سیکل شامل ۹۴ ^{o}c به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۰ ^{o}c به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ ^{o}c به مدت ۳۰ ثانیه بود و تکثیر نهایی هم در ۷۲ ^{o}c به مدت ۷ دقیقه انجام شد.محصول واکنش PCR، با استفاده از الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۲٪ آنالیز شده و وزن باند مورد نظر ۱۲۳ bp بود (۹ و ۱۰).از سوش شناخته شده *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* به عنوان کنترل مثبت و از آب به عنوان کنترل منفی استفاده شد برای بررسی مقاومت به ایزونیازید از پرایمرهای اختصاصی برای ژنهای *inhA*, *katG* و همچنین برای بررسی مقاومت به ریفامپین از پرایمر اختصاصی ژن *rpoB* استفاده شد.این پرایمرها توالی بین نوکلئوتیدهای ۲۷۵۹ تا ۲۹۶۷ از ژن *katG* و نوکلئوتیدهای ۲۳۳۵ تا ۲۴۹۲ از ژن *rpoB* را تکثیر می کنند ، عدم ایجاد باند یا ایجاد باند غیر اختصاصی در محلی غیر از باند ذکر شده را با عنوان مقاومت در نظر گرفتیم (جدول۱). حجم نهایی واکنش در PCR ژنهای katG و rpoB، ۲۵ µl است که حاوی ترکیبات زیر بود: 1X PCR buffer و 1.5 mMol از 2 MgCl و 0.2 mMol از دزکسی ریبونوکلئیک اسید (dNTP)، 0.5 µmol از هر پرایمر، 1 unit از آنزیم Taq DNA polymerase و 5µl از DNA الگو و شرایط واکنش به صورت ۹۵ ^{o}c به مدت ۴۵ ثانیه ،که با ۳۵ سیکل شامل ۹۵ ^{o}c به مدت ۱۵ ثانیه ، ۵۵ ^{o}c (دمای اتصال پرایمر برای ژن *rpoB*) و ۶۰ ^{o}c (دمای اتصال پرایمر برای ژن *katG*) به مدت ۱۵ ثانیه و ۷۲ ^{o}c برای ۱۵ ثانیه بود و در نهایت ۷۲ ^{o}c به مدت ۲ دقیقه می باشد.آنالیز محصول PCR بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد و با ولتاژ v ۱۰۰ به مدت حداقل ۳۰ دقیقه الکتروفورز شد و باند DNA با استفاده از رنگ آمیزی با اتدیوم برماید و نور UV مشاهده شد.طول قطعه DNA تکثیر شده برای ژن *rpoB*، ۱۵۷ bp و در مورد ژن *katG*، ۲۰۹ bp بود(۸).

در مورد ژن *inhA* حجم نهایی واکنش ۵۰ µl بوده که شامل مقادیر زیر می باشد: 1X PCR buffer و1.5 mMol از Mgcl2 و 200 µM از هر دزکسی ریبونوکلئیک اسید (dNTP)، 0.5 µmol از هر پرایمر، 1.25 Unit از آنزیم Taq DNA polymerase و 5µl از DNA الگو (جدول ۲). (dNTP،PCR buffer و Taq محصول شرکت Roche و پرایمر ها ساخت شرکت تکاپو زیست بودند). شرایط واکنش بدین صورت است: ۹۵ ^{o}c به مدت ۵ دقیقه که با ۳۵ سیکل شامل ۹۴ ^{o}c به مدت ۱۵ ثانیه ،دمای اتصال پرایمر ۴۵ ^{o}c به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ ^{o}c به مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت ۷۲ ^{o}c به مدت ۷ دقیقه . وزن باند مورد نظر ۲۳۸ bp می باشد(۱۱).

یافته ها

در ۱۰۴ نمونه مورد بررسی(۴۹٪) ۵۱ نفر مرد و (۵۱٪)۵۳ نفر زن بودند. توزیع سنی و جنسی بیماران در جدول۳ نشان داده شده است.همچنین تمام افراد مورد مطالعه new case بودند. از نظر نوع نمونه(۷۱/۲٪)۷۵ مورد نمونه خلط،(۱۳/۵٪) ۱۴ مورد نمونه BAL (۸/۷٪)۹ مورد آبسه ،(۳/۸٪)۴ مورد شیره معده و (۱/۹٪) ۲ مورد ادرار بود.

جدول۱ :توالی پرایمرهای مورد استفاده برای شناسایی سویه های مقاوم به ریفامپین و ایزونیازید

ژن مورد نظر	توالی پرایمر	اندازه آمپلیکون
IS6110	5′CCTGCGAGCGTAGGCGTCGG 3′ 5′CTCGTCCAGCGCCGCTTCGG 3′	123bp
rpoB	5′- GTGCACGTCGCGGACCTCCA - 3′ 5′- TCGCCGCGATCAAGGAGT - 3′	157 bp
katG	5′- GAAACAGCGGCGCTGATCGT -3′ 5′-GTTGTCCCATTTCGTCGGGG -3′	209 bp
inhA	5′- CCTCGCTGCCCAGAAAGGGA-3′ 5′-ATCCCCCGGTTTCCTCCGG-3′	238 bp

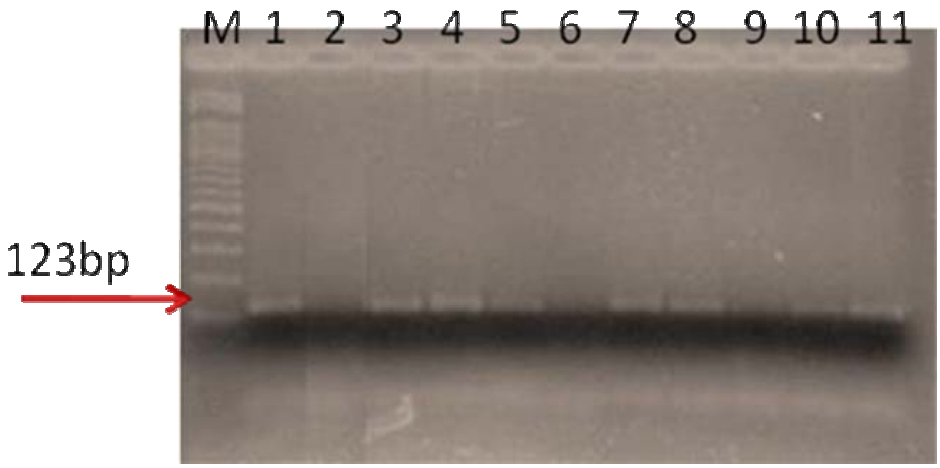
جدول ۲: پروتوکل ترکیبات مورد استفاده در PCR هر یک از ژن ها

نام ژن ترکیبات	IS6110	*rpoB*	*katG*	*inhA*
PCR Buffer (10X)	0.5X	1X	1X	1X
dNTP(10 mM)	200 µM	0.2 mMol	0.2 mMol	200 µM
Mgcl2(50mM)	0.75 mM	1.5 mMol	1.5 mMol	1.5 mMol
Taq DNA polymerase(5U)	0.5 Unit	1 unit	1 unit	1.25 unit
Primer	0.5 µmol	0.5 µmol	0.5 µmol	0.5 µmol
sample	5µl	5µl	5µl	5µl
Total volum	50 µl	25 µl	25 µl	50 µl
منبع	10	8	8	11

جدول۳:توزیع سنی و جنسی مسلولین کشت مثبت شهرستان گرگان در سال ۱۳۸۷

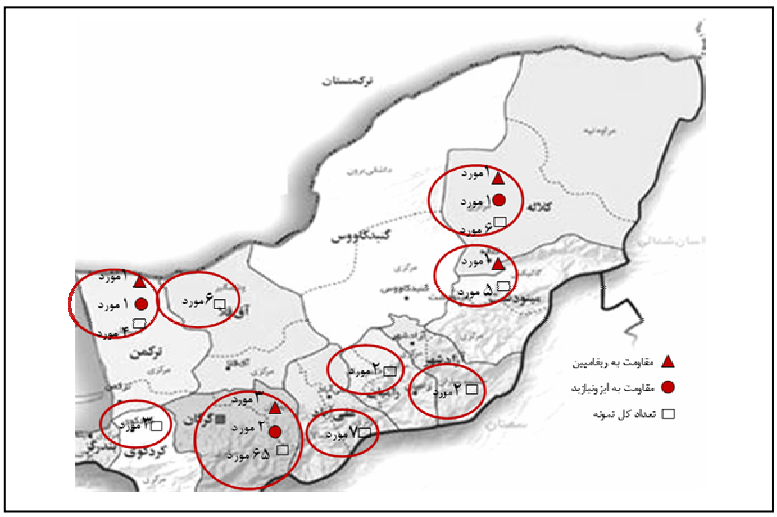
گروه های سنی	۰-۱٤	۱۵-۲٤	۲۵-۳٤	۳۵-٤٤	٤۵-۵٤	۵۵-٦٤	≥٦۵
جنسیت							
مرد	۱	٤	۵	٤	۸	۷	۲۲
زن	۲	٦	۹	٤	۲	۱٤	۱٦
مجموع	۳(۲/۹)*	۱۰(۹/٦)	۱٤(۱۳/۵)	۸(۷/۷)	۱۰(۹/٦)	۲۱(۲۰/۲)	۳۸(۳٦/۵)

*درصد گروه سنی



تصویر ۱: بخش تکثیر شده IS6110 به وزن ۱۲۳bp، M:100bp DNA ladder

۱:کنترل مثبت(سوش شناخته شده مایکوباکتریوم توبرکلوزیس که با انجام تست نیاسین توبرکلوزیس بودن آن ثابت گردیده است)۲: کنترل منفی، ۳، ۴، ۵، ۷، ۸، ۱۰ و ۱۱ نمونه های M. tuberculosis و ۹ و۶: نمونه های Non-tuberculosis.



تصویر۲ :توزیع جغرافیایی موارد کشت مثبت بدست آمده و تعداد موارد مقاوم در هر منطقه بر روی نقشه استان گلستان

یافته ها

در ۱۰۴ نمونه مورد بررسی(۴۹٪) ۵۱ نفر مرد و (۵۱٪)۵۳ نفر زن بودند. توزیع سنی و جنسی بیماران در جدول۳ نشان داده شده است.همچنین تمام افراد مورد مطالعه new case بودند. از نظر نوع نمونه(۷۱/۲٪)۷۵ مورد نمونه خلط،(۱۳/۵٪) ۱۴ مورد نمونهBAL (۸/۷٪)۹ مورد آبسه ،(۳/۸٪)۴ مورد شیره معده و (۱/۹٪) ۲ مورد ادرار بود. در این مطالعه تمام موارد کشت مثبت که از سطح استان گلستان برای بررسی مقاومت دارویی به مرکز بهداشت شهرستان گرگان ارجاع شده بود، مورد بررسی قرار گرفت.توزیع جغرافیایی موارد کشت مثبت در شهرستانهای استان که در این تحقیق استفاده شد،به این ترتیب بوده است:شهرستان گرگان۶۹ نمونه،علی آباد ۷ نمونه، کلاله ۶ نمونه، آق قلا ۶ نمونه،مینودشت ۵ نمونه،بندر ترکمن ۴ نمونه، کردکوی ۳ نمونه،رامیان و آزادشهر هر کدام ۲ نمونه که در تصویر (۲) نشان داده شده است. سنجش نمونه ها با پرایمر گونه IS6110 در روشPCR نشان داد که(۸۳/۷٪)۸۷ نمونه

مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و (۱۶/۳٪) ۱۷ مورد غیر توبرکلوزیس بودند. در روش PCR و با استفاده از ژن *katG*،در نمونه های توبرکلوزیس مقاومت به ایزونیازید در (۵/۷٪) ۵ مورد مشاهده شد و با استفاده از ژن *inhA* ، (۳/۴٪) ۳ نمونه مقاوم شناسایی شدکه در دو مورد مقاومت همزمان ژن *katG* و ژن *inhA* وجود داشت، بنابراین میزان کلی مقاومت به ایزونیازید (۶/۹٪) ۶ مورد می باشد.همچنین با استفاده از ژن *rpoB* ،(۴/۶٪) ۴ نمونه مقاوم به دست آمد.

روش proportional در ۴۵ سویه از نمونه های کشت مثبت انجام شد.در بین سویه های Tb، (۸/۹٪)۴ سویه به ایزونیازید و (۱۳/۳٪) ۶ سویه نسبت به ریفامپین مقاوم بودند و ۳ سویه هم نسبت به این دارو مقاومت نسبی داشتند.همچنین ۴ سویه MDR بودند.

مقایسه دو روش در بررسی مقاومت به ایزونیازید ثابت کرد که از ۷ مورد مقاومت به ایزونیازید در روش Proportional(Gold standard) ،۴ مورد با روش PCR هم مقاوم بودند اما ۳ مورد دیگر در روش PCR حساس شناخته شدند و از ۴۳ موردی که در روش proportional حساس بودند،۴۱ مورد با روش PCR هم با عنوان حساس شناسایی شدند. در بررسی مقاومت به ریفامپین از ۹ مورد مقاومت به ریفامپین در روش Proportional ،۳ مورد با روش PCR هم مقاوم بودند اما ۶ مورد دیگر در روش PCR با عنوان حساس شناخته شدند و از ۳۸ موردی که در روش proportional حساس بودند،۳۷ مورد با روش PCR هم با عنوان حساس شناسایی شدند و در یک مورد اختلاف داشتند. بنابراین اختصاصیت روش PCR در تعیین مقاومت به ایزونیازید،۹۵/۳٪ و حساسیت آن ۵۷/۱٪ تعیین گردید.ارزش پیشگویی مثبت در این روش،۶۶/۷٪ و ارزش پیشگویی منفی، ۸۷/۲٪ می باشد و در بررسی مقاومت به ریفامپین اختصاصیت روش PCR در تعیین مقاومت به ریفامپین،۹۷/۴٪ و حساسیت آن ۳۳/۳٪ تعیین گردید.ارزش پیشگویی مثبت و منفی این روش به ترتیب،۷۵٪ و ۸۶٪ می باشد.

بحث

در مطالعه ما با استفاده از روش PCR در نمونه های M. tuberculosis مقاومت به ایزونیازید در (۶/۹٪) ۶ نمونه و مقاومت به ریفامپین در (۳/۸٪) ۴ نمونه به دست آمد.در مطالعه ای که دکتر Torres در اسپانیا در سال ۲۰۰۲ انجام داد، از بین ۹۶۴ سویه M. tuberculosis، ۳۸ سویه (۹/۳٪) مقاوم به ریفامپین، ۷۹ سویه (۲/۸٪) مقاوم به ایزونیازید و ۲۲ سویه (۳/۲٪) هم MDR بودند (۱۲)، که با نتایج ما مطابقت داشت.

در ترکیه در سال ۲۰۰۵ از ۵۲ سویه *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* ، (۷/۷٪)۴ سویه مقاوم به ایزونیازید و ۳(۵/۸٪) سویه مقاوم به ریفامپین بودند(۱۱).در همین کشور در سال ۲۰۰۴، از مجموع ۶۲ سویه *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* ،(۸٪) ۵ سویه به ایزونیازید و (۴/۸٪) ۳ سویه به ریفامپین مقاوم بودند و (۴/۸٪) ۳ سویه هم MDR شناخته شدند(۱۳). ولی برخی مطالعات نیز مقاومت بالاتری را نشان دادند.

در مطالعه که در روسیه در سال ۲۰۰۲ انجام یافت، ۱۴۰ نمونه از پنج ناحیه مختلف روسیه جمع آوری شد و با استفاده از روش PCR مقاومت آنها به ایزونیازید و ریفامپین سنجیده شد،که نتایج بدست آمده برای مقاومت به ریفامپین ،ایزونیازید و MDR به ترتیب به صورت ۵۸/۲٪، ۵۱/۶٪ و ۴۴/۷٪ بود(۱۴).

در سال ۲۰۰۶ تحقیقاتی در نیویورک انجام شد و مقاومت به ایزونیازید و ریفامپین با توجه به ژنهای *katG* و *inhA* و *rpoB* سنجیده شد، در نتیجه مشخص گردید که در ۹۲ سویه مقاوم (در روش proportional) ۵۵٪ مقاومت از طریق جهش در ژن *katG* و حدود ۲۰٪ مقاومت از طریق جهش در ژن *InhA* ایجاد می شود و در ۲۵٪ سویه های مقاوم جهشی در هیچ کدام از این دو ژن دیده نشد.در مورد مقاومت به ریفامپین همگی (۱۰۰٪) موارد مقاومت از طریق جهش در ژن *rpoB* دیده شد(۱۵).در مطالعه ما نیز ۵ مورد مقاومت به ایزونیازید از طریق ژن *katG* و ۳ مورد مقاومت از طریق ژن *inhA* شناسایی شد که با احتساب موارد مشترک در مجموع در ۶ مورد مقاومت به ایزونیازید مشاهده شد.

در ترکیه در سال ۲۰۰۳ از مجموع ۱۶۰ سویه *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* مورد بررسی،با استفاده از روشهای Conventional، ۱۲۷ سویه مقاوم به ریفامپین شناسایی شدند و ۳۳ سویه حساس بودند.با استفاده از روش PCR، ۱۰۵ نمونه مقاوم و ۵۵ سویه حساس بودند.دو روش در ۱۰۱ نمونه تطابق داشتند و در ۲۶ نمونه نتایج دو روش مغایر یکدیگر بود و حساسیت روش ۷۹/۵٪ و اختصاصیت آن ۸۷/۵٪ تعیین شد(۱۶). که در قیاس با مطالعه ما که میزان حساسیت و اختصاصیت روش PCR در تعیین مقاومت به ریفامپین به ترتیب ۳۳/۳٪ و ۹۷/۴٪ بود، از حساسیت بالاتری برخوردار است، به همین دلیل ممکن است استفاده از پرایمرهای دیگر برای تعیین مقاومت دارویی در این منطقه ضروری باشد.

با وجود اینکه روش proportional برای تعیین مقاومت مطمئن ترین روش است، تمام روشهایی که بر پایه کشت می باشند برای به نتیجه رسیدن به ۴-۶ هفته زمان نیاز دارند و از طرفی برای کاهش میزان مرگ و میر در بیماران آلوده شده با سویه های مقاوم MTB ، شناسایی سویه های مقاوم در زمانی کوتاهتر ضروری به نظر می رسد.بنابراین می توان گفت روش PCR اگر با Sequencing همراه باشد یا با پرایمرهای متنوع تر که جهشهای بیشتری را شامل شود،می تواند جایگزین مناسبی برای روش فوق باشد

تشکر و قدردانی

در نهایت لازم می دانیم از معاونت فناوری و تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی گلستان بخاطر حمایت مالی طرح و معاونت محترم بهداشتی استان گلستان و مسؤلان بخش سل مرکز بهداشت شهرستان گرگان،جناب آقای مجید دهناد و سرکار خانم سیدباقری به دلیل همکاری در اجرای این طرح تحقیقاتی نهایت تشکر و قدر دانی را داشته باشیم.

References

1- Zager, E.M., Mcnerney, R.(*2008).Multidrug-resistant tuberculosis*, BMC Infectious Diseases, 2008. 8 , 1-5.

2- Organization, W.H., Global Tuberculosis Control Surveillence, Planning ,Financing,2008.

3- Guo, J.H., Xiang, W.L., Zhao, Q.R., Luo, T.,Huang, M., Zhange,J.*(2008).Molecular Characterization of Drug-Resistant Mycobacterium tuberculosis Isolates from Sichuan Province in China*, J. Infect. Dis.*2008*, 61, 264-268.

4- WHO *Anti-tuberculosis drug Resistance* in the world,4th Global Report .WHO / HTM / TB / 2008.394.

5- Ormerod, L.P. (*2005).Multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB): epidemiology, prevention and treatment,* Brish Medical Bulletin, *2005.*74, 74, 17-24.

6- Damle, A.S. , Kaundinya, D.V. *(1986) Comparison of three methods of decontamination of sputum for Mycobacterial culture. Indian Journal of Tuberculosis*, *1986;* 33 (3). 125-128.

7- Canetti , G., fox, W., Khomenko, A., Mahler, H.T., Menon, N.K., Mitchison, D.A.(1969). *Advances in Techniques of Testing Mycobacterial Drug Sensitivity, and the Use of Sensitivity Tests in Tubercuosis Control Programmes*, Bull World Health Organ. , 1969; 41, 21-43.

8-Khosravi A., Dezfulian A., Alavi SM. Detection *of Isoniazid and Rifampin resistant Mycobacterium tuberculosis isolated from tuberculosis patients using conventional* method and PCR.2006; 4(22),47-50.

9-Kesarwani, RC., Anjana, P., Ashutosh, M., Kumar, S.A. *.polymerase chain reaction (PCR) : Its comparison with conventional techniques for diagnosis of extra-pulmonary tubercular diseases*, Indian Journal of surgery .2004; 66, 84-88.

10-Kokagoz, T., Yilmaz, E., Ozkara, S., Kokagoz, S., Hayran, M., Sachedeva, M., etal.(1993). *Detection of Mycobacterium tuberculosis in sputum samples by polymerase chain reaction using a simplified procedure, Journal of Clinical Microbiology.* 1993 31,1435-1438.

11-Ozturk, C.E., Sanic, A., Kaya, D., Ceyhan, I.(2005).*Molecular Analysis of Izoniazid, Rifampin and Streptomycin Resistance in Mycobacterium tuberculosis Isolates from Patients with Tuberculosis in Düzce*, Turkey Infect. Dis.2005; 58, 309-312.

12-Torres, M. J., Criado, A., Gónzalez, N., Palomares, J. C., Aznar, J.(2002). *Rifampin and isoniazid resistance associated mutations in Mycobacterium tuberculosis clinical isolates in Seville, Spain*, *INT J TUBERC LUNG DIS.* 2002; 2, 160-163.

13-Pfyffer GE., Bonato DA., Ebrahimzadeh A., et al.(1999). *Multicenter laboratory validation of susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis against classical second-line and newer antimicrobial drugs by using the radiometric BACTEC 460 technique and the proportion method with solid media. J Clin Microbiol* , 37, 3179-86.

14- Drobniewski,F., Balabanova, Y., Ruddy, M., Weldon,L., Jeltkova,K., Brown,T., et al. (2002). *Rifampin- and Multidrug-Resistant Tuberculosis in Russian Civilians and Prison Inmates:* Dominance of the Beijing Strain Family*, Emerging Infectious Diseases*, 8, 1320-1326.

15-Somoskovi,A., Dormandy,J., Mitsani,D ., Rivenburg,J., Salfinger, M. (2006). *Use of smear-positive samples to assess the PCR-based genotype MTBDR assay for rapid,direct detection of the Mycobacterium tuberculosis complex as well as its resistant to Isoniazid and Rifampin.wadsworth center*. Journal of clinical mirobiology.44, 4459-4463.

16-Uraz,G., Şimşek, H.(2003). *Comparison of Rifampicin Drug Susceptibility Determined by Conventional Culture Method and Pcr-Heteroduplex Analysis in Mycobacterium Tuberculosis Strains*, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 10(3), 115-120