Archive of SID

فصلنامه

دانش میکروب شناسی

سال اول، شماره ۳، تابستان ۱۳۸۸

تشخیص مقاومت به ریفامپین در سویه های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس جدا شده از بیماران ایرانی به روش مالتیپلکس PCR

کیمیا تقوی[1*]، پریسا فرنیا[2]، مجتبی احمدی[3]، جمیله نوروزی[4]، مهدی کاظم پور[2]، محمد رضا مسجدی[2]،علی اکبر ولایتی[2]

۱. دانشگاه آزاد اسلامی- واحد تهران شمال ۲. دانشگاه علوم پزشکی وخدمات بهداشتی درمانی شهیدبهشتی –تهران ،مرکزتحقیقات مایکوباکتریولوژی، پژوهشکده سل و بیماری های ریوی ۳. دانشگاه آزاد اسلامی- واحد زنجان ۴. دانشگاه علوم پزشکی ایران

چکیده

تشخیص سریع مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به دارو، جهت کنترل موثر بیماری سل ضروری می باشد. شایعترین موتاسیون های مرتبط با مقاومت به داروی ریفامپین در مایکوباکتریوم، جا به جایی در کدون های ۵۱۶،۵۲۶ و۵۳۱ در ژن rpoB، هستند. هدف از این مطالعه، تشخیص این جهش ها درسویه های مایکوباکتریوم جدا شده از بیماران مشکوک به سل مقاوم به دارو بوده است. ۱۰۰ نمونه خلط از بیماران مراجعه کننده به مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی تهران جمع آوری گردید. در این مطالعه از۴ پرایمر و به روش مالتیپلکسPCR جهت تشخیص جا به جایی در کدونهای ۵۱۶،۵۲۶ و۵۳۱ در ژن rpoB استفاده گردید. تست حساسیت دارویی تناسبی، نشان داد که ۳۰ نمونه (۳۱/۳٪) حساس و ۶۶نمونه (۶۸/۸ ٪) مقاوم به دارو بودند و از نمونه های مقاوم به دارو، ۴۳ نمونه (۴۴/۸ ٪) مقاوم به ریفامپین بودند. تجزیه و تحلیل با روش مالتیپلکس PCR نشان داد که ۳۷ نمونه دارای مقاومت به ریفامپین بودند که، ۵سویه (۱۳/۵ ٪) دارای جهش در کدون ۵۱۶، ۱۹ سویه (۵۱/۸ ٪) دارای جهش در کدون ۵۲۶ و۱۳سویه (۳۵/۱٪) دارای جهش در کدون ۵۳۱ بودند. این بررسی نشان داد که در سویه های جدا شده از ایران بالاترین جهش مرتبط با مقاومت ریفامپین در کدون ۵۲۶ رخ می دهد. استفاده از روش مالتیپلکس PCR در مقایسه با روش تناسبی، نتایج را در مدت کوتاهی (سه الی چهار روز به جای دو ماه) ارائه می دهد. از طرفی این روش را می توان بر روی نمونه مستقیم بیمار انجام داد.

واژگان کلیدی: مقاومت چند دارویی، سل، مالتیپلکس PCR، ریفامپین.

مقدمه

در هر سال، ۶/۵ میلیون نفر به بیماری سل مبتلا و بیش از ۲/۴ میلیون نفر جان خود را در اثر این بیماری از دست می‌دهند (۱). بروز مرگ در اثر این بیماری، آن را تبدیل به یک معضل بهداشتی در بیشتر کشورهای جهان نموده است (۲). اهمیت موضوع، زمانی بیشتر احساس می‌شود که بروز موارد سل مقاوم به چند دارو مطرح باشد؛ به طوری که در حال حاضر از تمام کشورهای جهان گزارش شده است. درمان دارویی با دوره کوتاه، اساس درمان سل را تشکیل می دهد. در این مورد بیمار به صورت تهاجمی تحت درمان دو ماهه با چهار داروی ریفامپین (Rifampin)، ایزونیازید (Isonizide)، پیرازین آمید(Pyrazinamide-PZA) و اتامبوتول (Ethambutol)و یااستربتومایسین (Streptomycin) قرار می گیرد واز این طریق از عدم ظهورجهش یافته ها مقاوم به یک داروی منفرد اطمینان حاصل می شود. در طول مدت چهار ماه بعدی، تنها ریفامپین و ایزونیازید تجویز می گردد تا هر گونه باکتری باقیمانده نابود شود(۳و۴). و داروی ریفامپین و ایزونیازید بیشترین خاصیت ضد سلی را دارند و در خلال دو ماه اول درمان، بیش از ۹۹٪ باسیل های سل را نابود می کنند. بنابراین ظهور سویه های مقاوم به هر کدام از این دو دارو، شرایط

www.SID.ir

Archive of SID

دشواری را به همراه خواهد داشت زیرا تنها چند داروی معدود دیگر با عوارض جانبی زیاد و اثرات به مراتب کمتر باقی می ماند. بنابراین، ریفامپین یکی از اساسی ترین داروهای ضد سل محسوب می شود. این دارو، از طریق اتصال به زیر واحد بتا آنزیم RNA پلیمراز وابسته به DNA مانع شروع رونویسی می گردد. موتاسیون در ژنrpoB که کد کننده زیر واحد بتا آنزیم RNA پلیمراز می باشد، موجب تغییراتی در فرم فضایی آنزیم شده و این امر، اتصال دارو بهrpoB را مختل کرده و در نتیجه، منجر به مقاومت ایزوله های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می شود (۲). در طی سال های اخیر، انواع و اشکال موتاسیون منجر به مقاومت در برابر ریفامپین مشخص گردید. مقاومت چند دارویی به صورت مقاومت هم زمان به حداقل دو داروی ایزونیازید و ریفامپین تعریف شده است (۵). موتاسیون ها در ژنrpoB، اکثراً در ناحیه ۸۱ جفت بازی به نام ناحیه تعیین کننده مقاومت به ریفامپین اتفاق می افتد. از آن جایی که تا ۹۰٪ نمونه های مقاوم به ریفامپین دارای موتاسیون در کدون های ۵۲۶،۵۱۶ و۵۳۱ می باشند، این کدون ها جهت بررسی نمونه های مقاوم به ریفامپین انتخاب شدند. با توجه به شیوع بالای بیماری سل در ایران به ویژه در استان گلستان و ظهور سل مقاوم به دارو، احتمال گسترش این سویه‌ها به سایر نقاط ایران می رود (۵). برخلاف مطالعات فراوان در دیگر کشورهای جهان، مطالعات اندکی در ایران بر مقاومت دارویی مایکوباکتریوم ها صورت گرفته است. درسال های اخیر چندین روش نوین اعم از فنوتیپی و ژنوتیپی جهت شناسایی مقاومت دارویی معرفی شده اند. در بسیاری از روش های ژنوتیپیک، شناسایی مقاومت مربوط به جهش در ژن های ریفامپین به تنهایی مورد بررسی قرار می گیرد. به طور کلی، تمامی روش های فنوتیپی، از عدم رشد مایکوباکتریوم حساس در محیط کشت حاوی آنتی بیوتیک منشأ می گیرند و در نتیجه، روش های مذکور به صورت حداقل غلظت بازدارنده گزارش می شوند. آنتی بیوگرام باسیل کخ به اندازه آنتی بیوگرام سایر باکتری ها با ارزش نمی‌باشد، زیرا اولا زمان طولانی نیاز دارد و ثانیا حساسیت باسیل کخ در مکان های مختلف بدن یک بیمار با یکدیگر متفاوت است. مزیت روش های ژنوتیپی، در زمان کوتاه تر آزمایش، عدم نیاز به رشد ارگانیسم در محیط کشت، امکان استفاده از نمونه های کلینیکی به صورت مستقیم، میزان خطر زیستی کمتر می باشد و لیکن تمامی مکانیسم های منجر به مقاومت داروی شناخته شده نمی باشد. با استفاده از روش های ساده و سریع مانند مالتی پلکسPCR می توان سویه های مقاوم به دارو را جداسازی نمود. این امر می تواند کمک بزرگی به سیستم درمانی کشور در کم کردن بار و زیان مالی سیستم درمان باشد. با توجه به موقعیت جغرافیایی ایران و همسایه بودن با کشورهایی با شیوع بالای سل و به علت مهاجرپذیر بودن، مطالعه حاضر با هدف تعیین مقاومت دارویی سویه‌های ایزوله شده از بیماران مبتلا به سل نسبت به داروی ریفامپین با استفاده از روش مالتیپلکس PCR صورت پذیرفت، تا با شناخت میزان شیوع مقاومت، بهترین شیوه درمانی، انتخاب شده و از گسترش مقاومت جلوگیری گردد. مزیت روش های ژنوتیپی، در زمان کوتاه تر آزمایش، عدم نیاز به رشد ارگانیسم در محیط کشت، امکان استفاده از نمونه های کلینیکی به صورت مستقیم، میزان خطر زیستی کمتر می باشد و لیکن تمامی مکانیسم های منجر به مقاومت داروی شناخته شده نمی باشد.

مواد و روشها

انتخاب نمونه و تست تعیین حساسیت

۹۶ نمونه مایکوباکتریوم توبرکولوزیس از محیط کشت حاوی خلط بیماران مبتلا به سل مراجعه کننده به مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی (پژوهشکده سل و بیماری های ریوی) طی سال های ۸۶ تا۸۸، جمع آوری و شناسایی شد. سویه ها با روش های استاندارد رنگ آمیزی زیل نلسون، سرعت رشد، مورفولوژی کلنی، تولید رنگدانه، تست احیاء نیترات و تکثیر ژن توالی های تکراری مستقیم، مورد تایید قرار گرفتند. مایکوباکتریوم توبرکلوزیس سویه H37RV نیز به عنوان کنترل مورد استفاده قرار گرفت (۱) .

تست حساسیت دارویی ایزوله های باکتری با روش تناسبی، بر روی محیط لونشتاین جنسن (Lowenstein Jensen) تعیین گردید. به این منظور از غلظت یک میکروگرم در هر میلی لیتر ریفامپین استفاده شد. در این روش زمانی که رشد کلنی در محیط حاوی دارو، برابر و یا

www.SID.ir

Archive of SID

بیشتر از یک درصد تعداد کلنی در محیط فاقد دارو بود، باکتری مقاوم به ریفامپین در نظر گرفته شد (۲).

استخراج DNA

DNA، به روش CTAB (N - استیل N، و N - تری متیل آمونیوم بروماید) استخراج شد(۱). در این روش ابتدا باکتری های رشد یافته در محیط لونشتاین جنسن به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد کشته شدند. سپس سوسپانسیون ها، به منظور تشکیل رسوب سلولی در دور ۴۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. باکتری ها به مدت ۲۴ ساعت با لیزوزم (۱۰ میلی گرم در ۱۰۰۰ میلی لیتر) نگهداری شدند و به دنبال آن، عمل تخریب دیواره سلولی با استفاده از ۲/۵ میکرو لیتر از پروتئیناز K و۷۰ میکرولیتر ازسدیم دو دسیل سوفات (SDS)۱۰ %، به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد صورت گرفت. نگهداری به مدت ده دقیقه در ۶۵ درجه سانتیگراد با CTAB /NaCl (ستریمونیوم بروماید) انجام شد و عمل رسوب دهی با استفاده از مخلوط کلروفرم/ ایزو آمیل الکل(۱:۱) صورت گرفت. در نهایت، DNA ژنومی با استفاده از مخلوط فنل/کلروفرم (۱:۱) استخراج گردید و با استفاده از اتانول ۷۰٪ رسوب داده شد (۳).

تکثیر قطعه ژنومی نمونه های مایکوباکتروم با استفاده از روش مالتیپلکسPCR

۳ میکرولیتر (حدود ۱۰- ۱۵ نانوگرم) از DNA مایکوباکتریایی استخراج شده به واکنش PCR اضافه شد. با استفاده از پرایمرهایrpoB 516، rpoB 526 و rpoB 531 (ژن فناوران)، سه ناحیه ۱۸۵، ۱۷۰و۲۱۸ جفت بازی از ژن rpoB تکثیر گردید. توسط دستگاه ترموسایکلر (Astec) یک مرحله تخریب اولیه DNA در ۹۴ درجه به مدت ۲ دقیقه، سپس ۳۰ چرخه باشرایط: ۹۴ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۵ درجه به مدت ۳۰ ثانیه،۷۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه و در انتها ۷۲ درجه به مدت ۷ دقیقه انجام شد. در هر ۵۰ میکرولیتر از مخلوط واکنش PCR از ۱ میلی مول کلرور منیزیم، ۱۰۰ میکرو مولار از هر داکسی نوکلئوتید تری فسفات،۲۰۰ نانو مولار از هر پرایمر،۱۰ نانو گرم از DNA الگو، ۱واحد آنزیم از AT Taq Hot Star DNA Polymerase Enzyme (Vivantis) استفاده گردید. در انتها مقدار ۵ میکرولیتر از محصول PCR همراه با مارکر ۱۰۰جفت بازی بر روی ژل آگارز، الکتروفورز شد. پرایمر های استفاده شده جهت روش MAS-RCP در جدول ۱ آورده شد. تکثیرقطعه ژن در PCR با برنامه زیر انجام شد. مقدار ۵ میکرولیتر از محصول PCR حاصل همراه با مارکر ۵۰ بر روی ژل پلی آکریل آمید، الکتروفورز شد و باند حاصل مورد مطالعه قرار گرفت. جهت آنالیز آماری نرم افزار هایSPSS و POPGEN استفاده شد و آزمون های هم بستگی، K2، فیشر و Hardy-Weinbergبر روی داده ها اجرا گردید. پرایمر های استفاده شده جهت روش RCP-MAS در جدول ۱ آورده شد.

جدول ۱. توالی هریک از پرایمر های مورد استفاده در Multiplex PCR وسایزمحصولات PCR آنها در سویه استاندارد H37R

باند ایجاد شده در سویهH37RV	توالی پرایمر	پرایمر
۲۱۸ جفت باز	5'-CAG CTG AGC CAA TTC ATG GA-3'	rpoB516
پرایمر انتهایی	5'-TTG ACC CGC GCG TAC AC-3'	RIRm
۱۸۵ جفت باز	5'-CTG TCG GGG TTG ACC CA-3'	rpoB526
۱۷۰جفت باز	5'-CAC AAG CGC CGA CTG TC-3'	rpoB531

نتایج و بحث

مطالعه حاضر بر روی ۹۶ نمونه انجام شد. نمونه ها از خلط (کشت داده شده بر روی محیط کشت) بیماران مراجعه کننده، به مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی واقع در بیمارستان مسیح دانشوری تهران، طی سال های ۸۷-۸۸ تهیه شد. تمام نمونه ها جهت تعیین حساسیت دارویی آنتی بیوگرام شدند. تست حساسیت دارویی تناسبی، نشان داد که ۳۰ نمونه (۳۱/۳٪) حساس و

www.SID.ir

Archive of SID

۶۶نمونه (۶۸/۸ ٪) مقاوم به دارو ایزونیازید و ریفامپین بودند. ۴۳نمونه (۴۴/۸ ٪) از نمونه های مقاوم به دارو، مقاوم به ریفامپین بودند. نتایج روش MAS-PCR نشان داد که ۳۲ نمونه دارای مقاومت به ریفامپین بودند که از این نمونه ها، ۷ نمونه متعلق به گروه مقاوم به تک دارو و ۲۵ نمونه متعلق به گروه مقاوم به چند دارو بودند. ۵ سویه (۱۳/۵ ٪) د ارای جهش در کدون ۵۱۶، ۱۸ سویه (۵۰٪) دارای جهش در کدون ۵۲۶ و۱۳سویه (۳۵/۱٪) دارای جهش در کدون ۵۳۱ بودند. موتاسیون در سه کدون ۵۱۶ rpoB، ۵۲۶ rpoB و ۵۳۱ rpoB، موجب مقاومت به داروی ریفامپین می گردد، در نتیجه نمونه های فاقد باندهای ۱۷۰، ۲۱۸،۱۸۵ جفت بازی مقاوم به داروی ریفامپین بودند. به این معنی که عدم حضور هر یک از باندهای مربوط به کدون های۵۱۶ rpoB، ۵۲۶ rpoB و ۵۳۱ rpoB منجر به مقاومت به داروی ریفامپین شد. شکل محصول PCR تست مولکولی حساسیت دارویی ریفامپین بر روی ژل آگارز در ادامه آورده شده است.

حساسیت روش مالتیپلکس PCR به کار رفته در این مطالعه، جهت تشخیص مقاومت به داروی ریفامپین، ۷۲/۰۹٪ و اختصاصیت آن ۹۸/۱۱٪ به دست آمد. این مطالعه نشان داد که بیشترین جهش منجر شونده به مقاومت به داروی ریفامپین در بیماران مبتلا به سل ایرانی، در کدون ۵۲۶ rpoB رخ داد. در مطالعه ای که توسط فرنیا و همکاران در ایران صورت گرفت، آمار مبتلایان به سل مقاوم به چند دارو ۲/۸٪ و مبتلایان به سل مقاوم به تک دارو ۴۱/۶٪ در بیماران ایرانی، طی سال های ۱۳۷۹ الی ۱۳۸۱ گزارش گردید(۳۰).

در نمونه های مقاوم به دارو و فاقد جهش به دست آمده در مطالعه حاضر، موتاسیون ممکن است در خارج از ناحیه مورد بررسی این مطالعه صورت گرفته باشد. احتمال دیگر این است که در این نژاد های مقاوم، سایر موتاسیون های نادر ژن rpoB صورت گرفته باشد و یا مخلوطی از سویه های مقاوم و حساس وجود داشته باشند و یا مکانیسم های دیگر مقاومت، دلیل مقاومت به دارو باشد.

هم چنین اطلاعات حاصل، نشان دهنده میزان فراوانی جهش در کدون ۵۲۶ ایزوله های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به ریفامپین ایران است، که نتایج حاصل با الگوهای مختلف گزارش شده، در تحقیق کیمس وهمکاران که در کره انجام شد، همسو نمی باشد(۱۵).

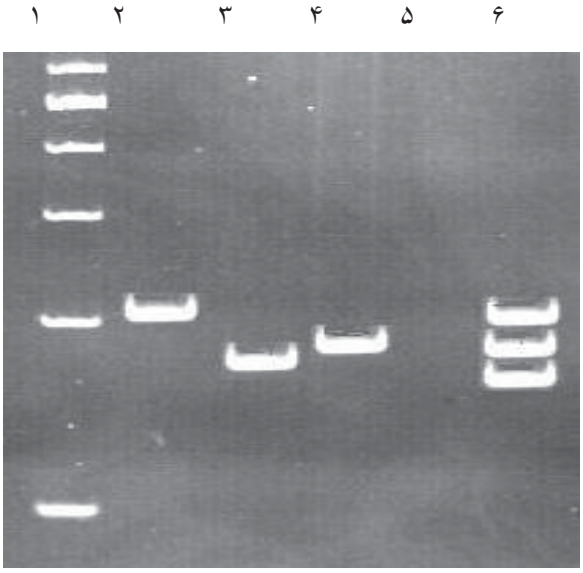
نمودار مقاومت دارویی سویه ها در این مطالعه حاکی از آن می باشدکه تعداد قابل توجهی از سویه ها، فراوانی کم جهش، در کدون ۵۱۶ ژن rpoB را نشان می دهند. در مطالعه مشابهی که بر روی مجموعه‌ای از نمونه‌های DNA، از گونه‌های شمال غربی روسیه ،طی سال های ۱۹۹۶ تا ۲۰۰۲ انجام گردید، موتاسیون درکدون ۵۳۱ rpoB بررسی شد و۲۴۷ مورد از ۲۸۷ (۸۶/۱٪) نمونه مورد مطالعه شده، دارای موتاسیون در ناحیه مورد مطالعه بودندو نتایج نشان داد که موتاسیون در کدون ۵۳۱rpoB بالاترین میزان موتاسیون در کدون های ژن rpoB را به خود اختصاص داده است، که با نتایج مطالعه حاضر مغایرت دارد.اختلاف میزان گزارشات در سطح جهان منوط به ناحیه نمونه برداری شده از آن، نحوه نمونه برداری و زمان نمونه برداری می‌باشدو این تفاوت ها ممکن است ناشی از تغییرات ژنی جغرافیایی در نژادهای مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به ریفامپین و انتقال این نژادها در بیماران در کشورهای مختلف باشد(۱۴).

میزان بالای موتاسیون در ژن بررسی شده در مطالعه حاضر، تایید کننده این مطلب است که غربالگری این ناحیه ژنی، برای تعیین مقاومت به ریفامپین در نمونه های کلینیکی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس جدا شده از ایران مناسب می باشد و این نتایج ما را در انتخاب مناطق مختلف یک ژن که جهت بررسی مقاومت دارویی مناسب تر می باشند، یاری می رسانند.

به طور کلی می توان نتیجه گرفت که روش مالتیپلکس PCR روشی، ساده، قابل اعتماد و سریع جهت بررسی حساسیت دارویی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می باشد. این بررسی نشان داد که استفاده از روش مالتیپلکس PCR در مقایسه با روش تناسبی، نتایج را در مدت کوتاهی (سه الی چهار روز به جای دو ماه) ارائه می دهد. از طرفی این روش را می توان بر روی نمونه مستقیم بیمار انجام داد و از آلودگی های جانبی جلوگیری نمود. به همین دلیل این روش سریع جهت شروع درمان بیماران توصیه می شود.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱. محصول PCR تست مولکولی حساسیت دارویی ریفامپین بر روی ژل آگارز. شماره ۱ مارکر ۱۰۰ است. شماره ۲ نمونه دارای جهش در کدون های ۵۲۶ rpoB و ۵۳۱ rpoB و در نتیجه فاقد باند های ۱۷۰ و۱۸۵ جفت بازی می باشد. شماره ۳ نمونه دارای جهش در کدون های۵۲۶ rpoB و ۵۱۶ rpoB و در نتیجه فاقد باند های ۲۱۸ و۱۸۵ جفت بازی می باشد. شماره ۴ نمونه دارای جهش در کدون های۵۱۶ rpoB و ۵۳۱ rpoB و در نتیجه فاقد باند های ۱۷۰ و۲۱۸ جفت بازی می باشد. شماره ۶ نمونه فاقد جهش در کدون های۵۱۶ rpoB ،۵۲۶ rpoB و ۵۳۱ rpoB و در نتیجه واجد هر سه باند ۱۷۰ ، و۲۱۸۱۸۵ جفت بازی می باشد.نمونه شماره ۵ واجد جهش در هر سه کدون بود و در نیجه هیچ یک از سه باند را نشان نداد

سپاسگزاری

بدین وسیله کمال قدردانی خود را از مسئولین و پرسنل محترم مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی (دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ،بیمارستان مسیح دانشوری، تهران) ابراز می نماییم

منابع:

۱. نوروزی ،ن. آبان ۱۳۸۷، باکتری های بیماریزا، تهران، انتشارات نور دانش.

۲. دوستدار، ف.، بهار ۱۳۸۶، شناسایی موتاسیون های ژن rpoB در سویه های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم و ریفامپین جدا شده از بیماران ایرانی، عفونی و گرمسیری ،ص ۱۳-۱۹.

۳. اصغرزاده ، م.، ۱۳۸۶، شناسایی سویه های مقاوم به اتامبوتول مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به روش MAS-PCR و مقایسه آن با روش proportion، میکروب شناسی ایران.

۴. خسروی، آ.، ۱۳۸۷ ، بررسی مقاومت به ایزونیازید و ریفامپین در سویه های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس جدا شده از بیماران مسئول توسط روش استاندارد MIC و تکنیک PCR، تنفس، ص ۱۸.

5. Agdamag D M D, Kageyama S, Solante R, Espantaleon A S, Sangco J C E, Suzuki Y, (2003). Characterization of clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis resistant to drugs and detection of RpoB mutation in multidrug-resistant tuberculosis in the Philippines, Int tuberc lung dis. 1104–1108.
6. Barry I, RE, Lee K, Mdluli AE, Sampson BG, Schroeder RA, Slayden Y, (1998). Mycolic acids: structure, biosynthesis and physiological functions. Prog. Lipid Res., 143–179.
7. Caws M, (2007). PCR – Restriction Fragment Length Polymorphism for Rapid, low-cost identification of Isoniazid – Resistant Mycobacterium tuberculosis, J. Am. Chem. Soc. **38**, 7425–7426.
8. Diaz GA, Wayne LG, (1974). Isolation and characterization of catalase produced

www.SID.ir

Archive of SID

Rev. Respir. Dis. **149**, 312–319.

9. Evans J, Stead M, Segal H, (2008). Rapid genotypic assays to identify drug-resistant Mycobacterium tuberculosis in South Africa, Journal of Antimicrobial Chemotherapy Advance Access, Vol.s.&,No.87.
10. Jing C, Anthony G, Tsalaki X, Jian M, Qian G, (2007). Deletion targeted Multiplex PCR (DTM_PCR) for identification of Beijing/W genotypes of Mycobacterium tuberculosis, tuberculosis. **87**, 446-449.
11. Mokrousov I, Narvskaya O, Limeschenko E, Otten T, Vyshnevskiy B, (2002). Detection of Ethambutol-Resistant Mycobacterium tuberculosis Strains by Multiplex Allele-Specific PCR Assay Targeting embB306 Mutations, Journal of clinical microbiology, **40** (5): 1617–1720 .
12. Richardian A, (2006). The genetics and biochemistry of isoniazid resistance by Mycobacterium tuberculosis. Am. in Mycobacterium tuberculosis, tuberculosis **87**, 451-460.
13. Segundo A, Mario H, Rosario D, (2000). Evaluation of Henes-PCR Assay for Mycobacterium Detection in Different Clinical Specimens From Patients With or Without Tuberculosis-Associated HIV Infection, Journal of Clinical Laboratory Analysis. **14**, 238–245.
14. Yam WC, (2006). Recent Advances in Rapid Laboratory Diagnosis of Tuberculosis, Human Macrophage activation programs induced by bacterial pathogens, PNAS. **99**, No.3.
15. Yang Z, Solante R, Espantaleon A S, Sangco J C E, (2005). Simultaneous detection of isoniazid, rifampin and ethambutol, Antimicrob Chemother. **55**, 860–5.

www.SID.ir