Iranian Journal of Medical Microbiology | ISSN:2345-4342

A Review of Phenotypic and Genotypic Methods for Detection of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*

Shadi Parsa[1], Saman Soleimanpour [*2], Mohammad Derakhshan[2], Leila Babaei Nik[3], Raha Mir[3], Nafiseh Izadi[1]

1. *Microbiology and Virology Department, Faculty Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran*
2. *Antimicrobial Resistance Research Center, Bu-Ali Research Institute, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran*
3. *Tuberculosis Reference Laboratory- Northeast Iran, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran*

10.30699/ijmm.14.2.108

ABSTRACT

Tuberculosis is one of the most dangerous infectious diseases in the world and causes nearly two million deaths each year, especially in developing countries. Meanwhile, multidrug resistance tuberculosis (MDR-TB) is due to the resistance of *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) strains to two effective first-line drugs, isoniazid and rifampin, which is increasing worldwide. MDR-TB strains are mainly caused by inadequate treatment of TB patients. The emergence and spread of these strains is an obstacle to the control and management of tuberculosis as well as a threat to the World Health Organization's goal of eliminating the disease by 2050. Proper management of MDR-TB relies on early recognition of the disease. Recently, phenotypic and genotypic diagnostic methods have been developed to rapidly identify MDR strains in tuberculosis patients. Some of them are also economically suitable to use in developing countries. Proper treatment of patients with drug-resistant TB requires the rapid detection of resistant strains and appropriate drug administration. Regular monitoring of patients' side effects of medications as well as enhancing the quality of bacterial tests is essential to identify resistant strains. Therefore, in this review, we will describe the available phenotypic and genotypic tests for drug-resistant tuberculosis detection and discuss their advantages and limitations.

Keywords: Mycobacterium tuberculosis, Drug resistance, MDR-TB, Drug susceptibility test

Received: 2019/12/26; **Accepted**: 2020/03/05; **Published Online:** 2020/04/09

Corresponding Information: **Saman Soleimanpour,** Antimicrobial Resistance Research Center, Bu-Ali Research Institute, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran. Email: *soleimanpours@mums.ac.ir*

Copyright © 2020, This is an original open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribution of the material just in noncommercial usages with proper citation.

Use your device to scan and read the article online

Parsa S, Soleimanpour S, Derakhshan M, Babaei Nik L, Mir R, Izadi N. A Review of Phenotypic and Genotypic Methods for Detection of Drug Resistance in Mycobacterium tuberculosis. Iran J Med Microbiol. 2020; 14 (2) :1-1

Download citation: BibTeX | RIS | EndNote | Medlars | ProCite | Reference Manager | RefWorks

Send citation to: Mendeley Zotero RefWorks

Introduction

Tuberculosis has been one of the deadliest infectious diseases in the world and remains a public health threat **(1)**. In 2018, the World Health Organization reported more than 10 million (between 9 and 11.1 million) new cases of tuberculosis **(2)**. The emergence of multidrug-resistant Mycobacterium strains is increasing due to various factors such as AIDS epidemic, irregular use of anti-TB drugs, increased use of injectable drugs and migration from endemic areas **(3)**. Multidrug Resistance Tuberculosis (MDR-TB) is defined as resistance to two effective first-line drugs for the treatment of tuberculosis, isoniazid and rifampin **(4)**. MDR-TB strains with extensive drug resistance (XDR-TB) are described as resistance to all oral fluoroquinolones and at least one second-line injectable aminoglycoside (amikacin, caproomycin and kanamycin) **(5)**.

In 2018, the World Health Organization estimates that %3.4 of new cases and %18 of previously treated MDR-TB cases, as well as %8.5 of MDR-TB cases associated with XDR-TB **(2)**. In order to prevent the spread and spread of MDR-TB and XDR-TB strains and

the emergence of new strains, simple, rapid and accurate diagnostic methods are needed to identify drug resistance among patients with tuberculosis. Unlike many bacteria where antibiotic resistance occurs due to motile genetic elements such as plasmids, transposons and integrons, mycobacteria have a chromosomal drug resistance and are often caused by mutations associated with a limited region of the genome. This resistance can be transmitted to subsequent generations of bacteria and disrupt TB control and treatment programs **(6, 7)**. In the following, the mechanisms of action and resistance of isoniazid and rifampin drugs as well as the advantages and limitations of TB drug sensitivity diagnostic tools and methods are presented to evaluate and evaluate the advantages and disadvantages of each of these methods.

Conventional phenotypic methods on solid medium

The most commonly used egg-based culture media is the Levenstein-Johnson (LJ) medium.

Proportional method

In this method, growth rate of Mtb on the control medium without antibiotic is compared to the growth on the drug-containing medium to determine susceptibility or resistance. The number of colonies counted in the control tube indicates the number of live bacilli in the total number of microbes cultured and the number of colonies in the antibiotic-containing tube indicates the number of resistant bacilli in the same number of microbes. The ratio of the first number to the second number is called the critical ratio or percentage of resistance, indicating that the strain is resistant or sensitive. For different drugs the criterion of resistance (critical ratio) varies. For example, the percent resistance for both isoniazid and rifampin is 1% **(26, 27)**.

Absolute Concentration Method

In the absolute concentration method, a standard amount of bacteria is inoculated in a solid medium such as LJ containing different concentrations of the antibiotic. The lowest drug concentration that inhibits bacterial growth (less than 20 colonies in 4 hours) is defined as resistance criteria. **(28)**.

Resistance Ratio Method

This method is similar to the absolute concentration method and is the ratio of the drug MIC for the tested strain to the MIC for the standard H37RV strain performed under the same conditions **(29)**.

Conventional Phenotypic Methods in Liquid Medium

Using liquid media instead of solid media reduces the cultivation time from 8-12 weeks to 3-7 weeks. These environments can also be stored for longer periods at room temperature **(30)**.

BACTEC 460 TB SYSTEM Radiometric Method

The culture medium used in the radiometric method is 7H12 (12A) medium. Mtb metabolize palmitic acid containing radioactive carbon in this medium and release CO_2-labeled gas in the upper part of the culture medium **(31)**. This gas is collected and measured by a semi-automatic device called the BACTEC 460 TB SYSTEM. Determining the amount of radioactive carbon in CO_2, the growth rate of Mtb is accurately determined. This growth rate is called the GI index, which indicates a positive mycobacterial culture if it is 10 or more **(32)**.

Mycobacterial Growth Indicator Tube (MGIT) Method

This method uses modified Middlebrook 7H9 with a fluorescent extinguishing oxygen sensor mounted at the end of the tube. In addition to the compounds in the 7H9 environment, it contains a mixture of antimicrobial agents such as PANTA (polymyxin, amphotericin, nalidixic acid, trimethoprim and azlocillin) to prevent the growth of gram-positive and gram-negative bacteria. The consumption of oxygen in the fluorescence medium and the detection of this light in the presence of UV lamps is a reason for the growth of Mtb in the tube **(34)**.

Versa TREK Method

This method uses modified Middlebrook 7H9 with a mixture of antimicrobial agents such as PVNA (polymyxin, vancomycin, nalidixic acid, and azlocillin). This method is capable of simultaneously identifying mycobacterial growth and drug sensitivity to first-line drugs by measuring changes in oxygen consumption **(35-36)**.

Modern Phenotypic Methods

These methods include mycobacteriophage expressing luciferase, colorimetric methods, and nitrate reduction test.

Genotypic Methods for the detection of MDR-TB resistant strains

Molecular methods are capable of detecting genes that are effective in generating drug resistance and resistance-related mutations in Mtb target genes. Using these methods, the results are obtained within 1 to 2 days and can be directly applied to smear positive sputum isolates and other clinical specimens.

Amplification Refractory Mutation System (ARMS)

ARMS-PCR is a simple and rapid method for identifying point mutations, restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) or small deletions during DNA fragment sequencing (46). This method is

also called allele-specific PCR or PCR amplification of specific alleles (PASA).

DNA-Sequencing Method

DNA sequencing is the most widely used genotypic method for detecting drug resistance, especially first-line TB drugs in Mtb. Sequencing is the most accurate and reliable method for mutation detection and is used as the gold standard method **(49)**.

PCR-Single Stranded Conformation Polymorphism Analysis (SSCP)

PCR-SSCP is a simple and rapid method that can be used to determine the presence or absence of a mutation in a specific region of DNA based on the pattern of DNA migration in the gel. As a rapid screening tool, it has high accuracy in the detection of drug resistance, especially in MDR-TB cases **(51)**.

PCR-restriction Fragment Length Polymorphism

The PCR-RFLP method is a simple, rapid, and inexpensive method used to detect changes in one or more codons found in drug resistant and mutation sequences **(53)**.

Determination of Antibiotic Susceptibility by Real Time PCR

The Real Time PCR method is very similar to the conventional PCR method. Similar to PCR, a sequence is amplified using specific primers. But Real Time PCR differs from conventional PCR in quantitative amplification of sequences. In Real Time PCR, the amplification of the product is detected by using the fluorescent marker in the reaction. These fluorescent markers are designed to produce light by binding to DNA if they replicate. The Real Time PCR method is divided into two categories: (1) the use of nonspecific fluorescent markers using DNA-bound dyes such as SYBR® Green or Eva green (2) the use of dedicated fluorescent markers using probes Target genes.

High Resolution Melt-HRM Real Time PCR

This method first amplifies the resistance-related genes by Real Time PCR and then the PCR product is heated in the presence of specific DNA fluorescent dyes such as SYBR-Green and Eva-Green. Colours are specific for double stranded DNA. At the beginning of the rise in temperature, the signal is high because at low temperatures most DNAs are double stranded. As the temperature continues to rise, DNA begins to separate and single-strand and thus loses colour. **(62)** In the HRM method, differences between different genotypes are determined by differences in the melting curve. That is, even a single change in gene sequence (mutation) can affect Tm and cause the fragment's melting curve to change.

Determination of Antibiotic Susceptibility by Line Probe Assay (LiPA)

Line probe assay (DNA probe assay) is a method based on DNA Strip Test, which involves DNA extraction, amplification of a gene associated with resistance, and subsequent hybridization of PCR products labelled with oligonucleotide probes fixed on the strip. These oligonucleotides are highly sensitive and do not bind to complementary DNA if they contain even one different nucleotide.

INNO-LiPA Rif. TB (Innogenetics)

This method searches for rifampin resistance mutations in the *rpoB* gene. Since rifampicin resistance is an indicator for the detection of MDR-TB, positive results of this method detect about 90% of MDR-TB samples **(68)**.

Xpret MTB/RIF (cephied) Method

The Xpret MTB/RIF method is able to simultaneously detect Mtb complex and its resistance to rifampin antibiotics directly from sputum collected within two hours. It should be noted that a high proportion of rifampin-resistant strains are associated with concomitant resistance to isoniazid (approximately 95%) and individual resistance to rifampin accounts for only about 5% of the resistant strains. Therefore, rifampicin resistance can be used as a high-accuracy MDR-TB index.

Discussion

Among the phenotypic methods available, the proportional method of drug resistance testing has a high sensitivity and specificity compared to other methods. But the only problem with the relative method is the relatively long time required to report the results **(26, 27)**. Therefore, the use of molecular methods is very helpful in reaching a faster report. Among the molecular methods available, the GeneXpret MTB/RIF method is able to simultaneously identify the Mtb complex and its resistance to rifampin antibiotics directly from sputum collected within two hours. The accuracy, sensitivity, and specificity of this method are acceptable. The only drawback to using this method is the dependence on special cartridges that are necessarily imported from abroad **(76-74)**. Therefore, it is recommended to launch another suitable molecular method with appropriate accuracy such as drug resistance evaluation using TaqMan Real Time PCR.

Acknowledgment

Noun

Conflict of Interest

Authors declared no conflict of interests.

مقاله مروری

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۴ ـ شماره ۲ ـ فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۹

Journal homepage: www.ijmm.ir

مروری بر روش های فنوتیپی و ژنوتیپی تشخیص مقاومت‌های دارویی در *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس*

شادی پارسا[۱]، سامان سلیمان پور[۲*]، محمد درخشان[۲]، لیلا بابایی نیک[۳]، رها میر[۳]، نفیسه ایزدی[۱]

۱. گروه میکروب‌شناسی و ویروس‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
۲. مرکز مقاومت‌های میکروبی، پژوهشکده بوعلی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
۳. آزمایشگاه رفرانس سل شمال شرق کشور، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچهٔ مقاله

دریافت: ۱۳۹۸/۱۰/۰۵

پذیرش:۱۳۹۸/۱۲/۱۵

انتشار آنلاین: ۱۳۹۸/۱۲/۲۴

موضوع:

نویسندهٔ مسئول:

سامان سلیمان پور، مرکز مقاومت‌های میکروبی، پژوهشکده بوعلی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

ایمیل: soleimanpours@mums.ac.ir

چکیده

بیماری سل یکی از خطرناک‌ترین بیماری‌های عفونی در جهان بوده و سالانه منجر به مرگ نزدیک به دو میلیون نفر، به ویژه در کشورهای در حال توسعه می‌شود. در این میان، سل مقاوم به درمان [Multidrug resistance tuberculosis (MDR-TB)] به‌علت مقاومت سویه‌های *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* به دو داروی موثر خط اول درمان سل یعنی ایزونیازید و ریفامپین است که در سطح جهان رو به افزایش است. سویه‌های MDR-TB عمدتا در نتیجهٔ درمان نامناسب و ناکافی بیماران مبتلا به سل پدید آمده‌اند. ظهور و گسترش این سویه‌ها مانعی برای کنترل و مدیریت بیماری سل و همچنین تهدیدی برای هدف سازمان بهداشت جهانی مبنی بر حذف این بیماری تا سال ۲۰۵۰ است. مدیریت صحیح MDR-TB بر شناخت زودهنگام این بیماری متکی است. اخیرا روش‌های تشخیصی فنوتیپی و ژنوتیپی برای شناسایی سریع این سویه‌ها در بیماران مشکوک به سل ایجاد شده است که برخی از آنها از نظر اقتصادی برای استفاده در کشورهای در حال توسعه نیز مناسب هستند. درمان صحیح بیماران مبتلا به سل مقاوم به دارو در نتیجهٔ شناسایی و تشخیص سریع سویه‌های مقاوم به درمان و تجویز داروی مناسب است. نظارت منظم بر وضعیت بیماران نسبت به عوارض جانبی داروها و همچنین افزایش کیفیت روش‌های باکتریایی برای شناسایی سویه‌های مقاوم امری ضروری است. بنابراین در این مطالعه، مکانیسم‌های عملکرد و همچنین مزایا و محدودیت‌های ابزارها و روش‌های تشخیص حساسیت دارویی سل به‌منظور شناسایی سریع و دقیق مقاومت‌های دارویی *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* بررسی شد.

کلید واژه‌ها: *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس*، مقاومت دارویی، MDR-TB، روش حساسیت دارویی.

کپی‌رایت © مجله میکروب شناسی پزشکی ایران: دسترسی آزاد؛ کپی برداری، توزیع و نشر برای استفاده غیرتجاری با ذکر منبع آزاد است.

مقدمه

بیماری سل یکی از کشنده‌ترین بیماری‌های عفونی در جهان بوده و هنوز به‌عنوان یک مسئله بهداشتی تهدید کننده سلامت جامعه باقی مانده است (۱). سازمان بهداشت جهانی در سال ۲۰۱۸، بیش از ۱۰ میلیون (بین ۹ تا ۱۱/۱ میلیون) موارد جدید ابتلا به سل را گزارش کرده است (۲). ظهور سویه‌های مایکوباکتریوم مقاوم به چند دارو به دلیل عوامل مختلفی از قبیل اپیدمی ایدز، استفادهٔ نامنظم از داروهای ضد سل، افزایش استفاده از داروهای مخدر تزریقی و مهاجرت از مناطق اندمیک در حال افزایش است (۳). سل با مقاومت چند دارویی[1] (MDR-TB) به صورت مقاومت به دو داروی موثر خط اول درمان سل یعنی ایزونیازید و ریفامپین تعریف می‌شود (۴). سل با مقاومت دارویی گسترده[2] (XDR-TB) به سویه‌های MDR-TB به همراه مقاومت به تمامی فلئورکینولون‌های خوراکی و حداقل یکی از آمینوگلیوزیدهای تزریقی خط دوم درمان (آمیکاسین، کاپروئومایسین و کانامایسین) گفته می‌شود (۵).

سازمان بهداشت جهانی در سال ۲۰۱۸، ۳/۴ درصد موارد جدید و ۱۸ درصد موارد درمان‌شده قبلی مبتلا به MDR-TB و همچنین

[1] multidrug-resistant tuberculosis

[2] Extensively drug resistant tuberculosis

۸/۵ درصد موارد MDR-TB همراه با XDR-TB را تخمین زده است (۲). به‌منظور جلوگیری از گسترش و انتشار سویه‌های MDR-TB و XDR-TB و ظهور سویه‌های جدید استفاده از روش‌های تشخیصی ساده، سریع و دقیق برای شناسایی مقاومت دارویی در بین بیماران مبتلا به سل امری بسیار ضروری است. بر خلاف بسیاری از باکتری‌ها که مقاومت آنتی‌بیوتیکی به علت عناصر ژنتیکی متحرک نظیر پلاسمید، ترانسپوزون و اینتگرون‌ها رخ می‌دهد در مایکوباکتریوم‌ها مقاومت دارویی پایهٔ کروموزومی دارد و اغلب ناشی از موتاسیون‌هایی در ارتباط با ناحیهٔ محدودی از ژنوم است. این مقاومت می‌تواند به نسل‌های بعدی باکتری منتقل شود و برنامه‌های کنترل و درمان سل را دچار اختلال کند (۶, ۷). در ادامه مکانیسم‌های عملکرد و مقاومت داروهای ایزونیازید و ریفامپین و همچنین مزایا و محدودیت‌های ابزارها و روش‌های تشخیصی حساسیت دارویی سل به‌منظور معرفی و ارزیابی امتیازات و معایب هر کدام از این روش‌ها بررسی می‌شود.

ایزونیازید: مکانیسم عملکرد و مقاومت

ایزونیازید یا هیدرازید نیکوتینیک اسید (Hydrazide isonicotinic acid) یک عامل سنتزی یا صناعی ضدباکتریال و از موثرترین عوامل شیمیایی متوقف‌کننده رشد *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* است (۸). ایزونیازید به‌صورت پیش دارو بوده و فعال‌سازی آن به‌وسیلهٔ آنزیم کاتالاز پراکسیداز *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* که توسط ژن *katG* کد گذاری می‌شود، صورت می‌گیرد. پس از فعال شدن، دارو به وسیله انتشار فعال وارد باسیل سل شده و به دامنهٔ وسیعی از رادیکال‌های آلی و گونه‌های اکسیژن غیرفعال تبدیل می‌شود (۹). مکانیسمی که به‌طور وسیع‌تری پذیرفته شده است دلالت بر آن دارد که عملکرد ایزونیازید ناشی از تاثیر مهاری آن بر روی زنجیره سنتز اسید مایکولیک می‌باشد. به این صورت که پس از درمان با ایزونیازید در دیوارهٔ باکتری فقدان اسید چرب دیده می‌شود (۱۰).

مقاومت به ایزونیازید ناشی از جهش‌های نقطه‌ای است. موتاسیون در ژن *katG*، خصوصا در کدون ۳۱۵ که سبب تغییر در اسید آمینه می‌شود مسئول ۵۰ تا ۹۵ درصد موارد مقاومت به ایزونیازید است (۱۱, ۱۲). دیگر موتاسیون کمتر شایع در ناحیه پروموتوری *inhA* که کد کننده enoyl-ACP ردوکتاز می‌باشد مشاهده شده است. این آنزیم در طویل‌سازی اسیدهای چرب برای سنتز مایکولیک اسید مورد نیاز است. موتاسیون در این ناحیه مسئول بیش از ۳۴ درصد موارد کلینیکی مقاوم به ایزونیازید است و به‌طور عمده در ترکیب با موتاسیون در ژن *katG* مشاهده می‌شود (۱۳, ۱۴). سایر موتاسیون‌های مرتبط با مقاومت به ایزونیازید شامل موتاسیون در ناحیه تنظیمی *ahpc* و ژن‌های *ndh* و *kasA* می‌باشد (۱۵, ۱۶).

ریفامپین: مکانیسم عملکرد و مقاومت

ریفامپین یک آنتی‌بیوتیک با طیف اثر گسترده و باکتریسیدال است و از موثرترین داروهای ضد سل به شمار می‌آید. ریفامپین به‌صورت مشتق نیمه صناعی از ریفامایسین بوده که در خط اول درمان سل تجویز می‌شود (۱۷). سمی‌بودن کبدی (Hepatotoxicity) مهم‌ترین عارضهٔ این دارو است و از این رو افرادی که این دارو را دریافت می‌کنند پیوسته باید تحت آزمایش‌های مربوط به کارکرد کبد قرار بگیرند (۱۸). مکانیسم اصلی عملکرد ریفامپین مهار سنتز پروتئین می‌باشد. یک آنزیم مهم در شروع فرایند رونویسی در *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* RNA پلیمراز وابسته به DNA است. RNA پلیمراز از چهار زیر واحد آلفا، بتا، بتا پریم و سیگما تشکیل شده است که به ترتیب توسط ژن‌های *rpoA*، *rpoB*، *rpoC* و *rpoD* کد می‌شوند (۱۹). ریفامپین با اتصال به زیر واحد β از آنزیم RNA پلیمراز، سبب اختلال در طویل‌سازی زنجیره RNA در حال سنتز و متعاقب آن مهار رونویسی شده و منجر به مرگ باکتری می‌شود (۲۰). از آنجایی که ۹۰ درصد سویه‌های مقاوم به ریفامپین به ایزونیازید نیز مقاوم‌اند، مقاومت به ریفامپین به‌عنوان یک شاخص اصلی برای تشخیص MDR-TB به شمار می‌رود (۲۱).

بالغ بر ۹۵ درصد موتاسیون‌های مسئول مقاومت به ریفامپین در یک ناحیه ۸۱ جفت بازی به نام ناحیه تعیین‌کنندهٔ مقاومت به ریفامپین[3] (RRDR) رخ می‌دهد (۲۲). این ناحیه در واقع قسمتی از ژن *rpoB* است که زیر واحد β از RNA پلیمراز وابسته به DNA را کد می‌کند و از کدون شمارهٔ ۵۰۷ تا کدون شماره ۵۳۳ را شامل می‌شود. بیش از ۹۲ درصد موتاسیون‌های گزارش شده مربوط به کدون‌های ۵۱۶، ۵۲۶ و ۵۳۱ می‌باشد (۲۳, ۲۴). ۵ درصد دیگر شامل موتاسیون در سایر قسمت‌های ژن *rpoB* و خارج از ناحیه RRDR مثل V146F و T481A و S450L می‌باشد که شایع نیستند (۷).

روش‌های فنوتیپی تشخیص سویه‌های مقاوم به داروی سل (MDR-TB)

تشخیص مقاومت دارویی در گذشته توسط روش‌های فنوتیپی مرسوم (Conventional phenotypic method) صورت می‌گرفت که

[3] Rifampicin Resistance Determining Region

اکثر این روش‌ها پرزحمت و وقت گیر بودند. در سالهای اخیر روش‌های فنوتیپی جدید و ژنوتیپی برای تشخیص مقاومت‌های دارویی پیشنهاد شده‌اند. در روش‌های فنوتیپی تشخیص سویه‌های حساس و سویه‌های مقاوم بر اساس ارزیابی مهار رشد باکتری در حضور آنتی‌بیوتیک‌های مورد نظر صورت می‌گیرد (جدول ۱). این روش‌ها بر روی محیط‌های واجد آگار یا تخم‌مرغ و یا محیط‌های مایع انجام می‌گردد. در ادامه به مهم‌ترین روش‌های فنوتیپی موجود اشاره خواهد شد.

جدول ۱. مقایسهٔ روش‌های فنوتیپی تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی در ارزیابی مقاومت دارویی *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس*

روش‌ها	مدت زمان انجام	مزایا	معایب
روش‌های فنوتیپی مرسوم			
محیط جامد (محیط لون اشتاین–جانسون یا محیط میدل بروک 7H10/11)			
روش پروپورشنال	۸-۱۲ هفته از زمان جمع آوری نمونه	نسبتا دقیق	زمان‌بر پر زحمت
نسبت مقاومت			
غلظت مطلق			
محیط مایع			
BACTEC 460 TB System (رادیومتریک)	۳-۷ هفته از زمان جمع‌آوری نمونه	قابل دسترس به‌صورت کیت تجاری	به پروتکل ایمنی پرتوی نیاز دارد. زحمت زیاد در زمان تلقیح نمونه
BACTEC MGIT 960 TB System (غیررادیومتریک)		اتوماتیک	
VersaTREK		اتوماتیک	
روش‌های فنوتیپی سریع			
MODS	۲-۴ هفته از زمان جمع‌آوری نمونه	کم‌هزینه حساسیت ۹۲-۹۶ درصد اختصاصیت ۹۶ درصد به‌طور مستقیم بر روی خلط قابل انجام است	-پرزحمت (روش مکرر) -نیاز به میکروسکوپ معکوس -ایمنی-زیستی بالا -مشکل در افتراق MTB از NTM
روش رنگ سنجی	۱-۲ هفته پس از ایزوله نمونه MTB	حساسیت ۹۱-۱۰۰ درصد اختصاصیت ۹۸-۱۰۰درصد	-ایمنی-زیستی بالا
روش احیا نیترات	۱-۴ هفته از زمان جمع‌آوری نمونه	حساسیت ۹۴ درصد اختصاصیت ۱۰۰ درصد کم‌هزینه به‌طور مستقیم بر روی نمونه‌های اسمیر مثبت قابل اجراست	-واکنش مثبت کاذب با دیگر میکروارگانیسم‌های احیا کننده نیترات دارد. -محدودیت در دقت به‌علت فعالیت متابولیک MTB -قادر به شناسایی سویه‌های نیترات ردوکتاز منفی نیست.

روش‌های فنوتیپی مرسوم بر روی محیط جامد

رایج‌ترین محیط های کشت مورد استفاده بر پایه تخم مرغ محیط‌های کشت لون اشتاین–جانسون هستند. سایر محیط‌ها عبارتندز: محیط‌های کشت اوگاوا، استونبرینک، ATS ، IUAT و پتراگنانی. از جمله محیط‌های حاوی آگار پرکاربرد در آزمایشگاه‌های میکروب‌شناسی می‌توان به محیط‌های میدل بروک 7H10 و 7H11 اشاره کرد (۲۵).

سمپوزیوم‌های سازمان جهانی بهداشت و اتحادیه بین‌المللی علیه سل سه روش قابل قبول برای مقاومت دارویی سل را تعریف کردند که شامل: روش نسبی، روش غلظت مطلق و روش نسبت مقاومت است. این روش‌ها علی‌رغم اینکه هزینه کمی دارند و قابل اعتماد و قابل تکرار هستند اما وقت‌گیر پرزحمت بودن آنها، استفاده از این روش‌ها را با محدودیت روبرو کرده است.

۱. روش نسبی (Proportional)

روش نسبی معمول‌ترین روش مورد استفاده در سرتا سر جهان است. اساس این روش تهیهٔ رقت‌های متوالی از سوسپانسیون تهیه‌شده از باکتری و تلقیح آن به محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک است. در این روش میزان رشد سوش در محیط حاوی آنتی‌بیوتیک با محیط کشت شاهد بدون آنتی‌بیوتیک مقایسه می‌شود. تعداد کلنی‌های شمارش شده در لولهٔ کنترل (فاقد آنتی‌بیوتیک) نشان‌دهندهٔ تعداد باسیل زنده در تعداد کل میکروب کشت شده است و تعداد کلنی‌های موجود در لوله محتوی آنتی‌بیوتیک نشان‌دهندهٔ تعداد باسیل‌های مقاوم در همان تعداد میکروب است. نسبت عدد اول به عدد دوم را نسبت بحرانی یا درصد مقاومت گویند و نشان می‌دهد که سویه مقاوم یا حساس است. برای داروهای مختلف معیار مقاومت (نسبت بحرانی) متفاوت است. به‌طور مثال درصد مقاومت برای دو داروی ایزونیازید و ریفامپین ۱ درصد است. یعنی اگر درصد مقاومت ۱ یا بیشتر از ۱ باشد سویهٔ مقاوم و اگر از این مقدار کمتر باشد سویه حساس است. از مزایای این روش محاسبهٔ هم‌زمان غلظت بحرانی دارو و نسبت مقاومت دارویی است و از معایب اساسی این روش می‌توان به زمان‌بر بودن آن (۶-۴هفته) اشاره کرد (۲۶). اخیرا مسیر جدیدی برای انجام روش نسبی بررسی حساسیت آنتی‌بیوتیکی ابداع شده است که به‌طور مستقیم بر نمونهٔ خلط قابل انجام است. در یک مطالعه Amini و همکاران نشان دادند که روش نسبی مستقیم (Direct proportional method) در محیط جامد، در مرحله اولیه نسبت به روش نسبی معمول فنوتیپی، نتایج قابل اعتمادی را ارائه می‌دهد. همچنین روش مستقیم سریع‌تر، دقیق‌تر و ساده‌تر است. به‌علاوه، در این روش انتقال باکتری‌های بیماری‌زا کاهش می‌یابد و در نتیجه خطرات زیستی مربوط به روش نسبی معمولی کاهش می‌یابد (۲۷).

روش غلظت مطلق

در روش غلظت مطلق، میزان استانداردی از باکتری در محیط جامد مثل لون اشتاین-جانسون که حاوی غلظت‌های مختلف از آنتی‌بیوتیک مورد نظر است تلقیح شده و سپس انکوباسیون انجام می‌شود. کمترین میزان غلظت دارویی که موجب مهار رشد باکتری می‌شود (کمتر از ۲۰ کلنی در ۴ ساعت) به‌عنوان معیار مقاومت تعریف می‌شود. غلظت دارو و خصوصا میزان تلقیح باید به دقت با مقادیر مرجع برای کشت سویه وحشی استاندارد شود. اختلاف در میزان تلقیح بیشترین عامل خطا در این روش است و در نتیجه نسبت به دو روش دیگر از اعتبار کمتری برخوردار است (۲۸).

روش نسبت مقاومت

این روش مشابه روش غلظت مطلق می‌باشد و عبارت است از نسبت MIC دارو برای سویهٔ مورد آزمایش به MIC دارو برای سویه استاندارد H37RV که در شرایط یکسان انجام می‌شود. چنانچه نسبت مقاومت برابر یا کمتر از ۲ باشد سویهٔ مورد آزمایش حساس و اگر برابر یا بیشتر از ۸ باشد سویه مورد آزمایش مقاوم تلقی می‌شود. سویه‌های دارای مقاومت بینابینی نادر هستند. انجام رضایت‌بخش این روش بستگی به استانداردسازی اندازهٔ تلقیح نمونه دارد. این روش عمدتا در ارتباط با گونه‌های *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* نسبت به دیگر گونه‌های مایکوباکتریوم به کار می‌رود (۲۹).

۲. روش‌های فنوتیپی مرسوم در محیط مایع

استفاده از محیط‌های مایع به جای محیط‌های جامد سبب کاهش مدت زمان کشت از ۸-۱۲ هفته به ۳-۷ هفته می‌شود. همچنین این محیط‌ها را می‌توان مدت زمان طولانی‌تری در دمای اتاق نگهداری کرد. لازم به ذکر است که بعضی از مایکوباکتریوم‌های سریع‌الرشد فقط بر روی محیط‌های مایع رشد می‌کنند. از جمله روش های فنوتیپی مرسوم که بر روی محیط های مایع انجام می‌شود، می‌توان به روش رادیومتری BACTEC ،لوله اندیکاتور رشد مایکوباکتریال و Versa TREK system اشاره کرد (۳۰).

روش رادیومتریک BACTEC 460 TB SYSTEM

محیط کشت مورد استفاده در روش رادیومتری محیط 7H12 (12A) نام دارد. مایکوباکتریوم‌ها اسید پالمیتیک حاوی کربن رادیواکتیو موجود در این محیط را متابولیزه کرده و گاز CO_2 نشان‌دار در قسمت بالای شیشهٔ محیط کشت آزاد می‌شود (۳۱). این گاز توسط دستگاه نیمه اتوماتیکی به نام BACTEC 460 TB SYSTEM از روی محیط جمع‌آوری و اندازه‌گیری می‌شود. با تعیین مقدار کربن گازکربنیک رادیواکتیو، میزان رشد مایکوباکتریوم به‌طور دقیق مشخص می‌شود. این میزان رشد را شاخص GI می‌گویند که اگر ۱۰ یا بیشتر باشد نشانهٔ مثبت بودن کشت مایکوباکتریوم است (۳۲). از مهمترین مزایای این روش حساسیت بالا و تشخیص سریع باکتری و مقاومت دارویی (۷ تا ۱۴ روز) می باشد. علاوه بر این در این روش توانایی افتراق *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* از مایکوباکتریوم‌های محیطی وجود دارد. اما این روش به‌دلیل استفاده از مواد رادیواکتیو و همچنین احتمال ایجاد آلودگی امروزه توسط روش‌های بهتری جایگزین شده است (۳۲).

روش لولهٔ اندیکاتور رشد مایکوباکتریال MGIT

همانطور که در بالا اشاره شد، امروزه سیستم‌های اتوماتیک Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) (لولهٔ اندیکاتور رشد مایکوباکتریال) جایگزین سیستم‌های نیمه‌اتوماتیک BACTEC 460 TB SYSTEM شده است (۳۳). در این روش از لوله‌های واجد محیط تغییر یافته میدل بروک 7H9 به همراه یک سنسور اکسیژن خاموش‌کننده فلوئورسنتی که در انتهای لوله تعبیه شده است استفاده می‌شود. این محیط علاوه بر ترکیبات محیط 7H9 دارای مخلوطی از مواد ضدمیکروبی مانند PANTA (پلی‌میکسین، آمفوتریسین، نالیدیکسیک اسید، تری‌متوپریم و آزلوسیلین) به‌منظور جلوگیری از رشد باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی است. مصرف اکسیژن در محیط تولید فلوئورسنس کرده و تشخیص این نور در حضور لامپ UV دلیل بر رشد مایکوباکتریوم در لوله است (۳۴). از مهم‌ترین مزایای این سیستم هزینهٔ ارزان انجام آن و همچنین عدم استفاده از مواد رادیواکتیو است (۳۴).

روش Versa TREK

یکی دیگر از روش‌های اتوماتیک بر پایهٔ محیط مایع سیستم Versa TREK است. در این روش از لوله‌های واجد محیط تغییر یافته میدل بروک 7H9 به همراه مخلوطی از مواد ضدمیکروبی مانند PVNA (پلی‌میکسین، ونکومایسین، نالیدیکسیک اسید و آزلوسیلین) استفاده می‌شود. این روش از طریق اندازه‌گیری تغییرات فشار اکسیژن مصرفی توانایی شناسایی هم‌زمان رشد مایکوباکتریوم و حساسیت دارویی آن نسبت به داروهای خط اول درمان را داراست (۳۵, ۳۶). از مهم‌ترین امتیازات این روش می‌توان به ساده بودن و استفاده از آنتی ژن Mpt64 در تشخیص کمپلکس *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* و افتراق آن از مایکوباکتریوم‌های محیطی اشاره کرد (۳۵, ۳۶). اخیرا روش‌های فنوتیپی جدیدی پیشنهاد شده است که می‌توان در آنها هم از باکتری و هم مستقیما از نمونه‌های خلط استفاده کرد که در ادامه به توضیح مختصری از آنها پرداخته خواهد شد.

۳. روش‌های فنوتیپی نوین

روش مایکوباکتریوفاژ بیانگر لوسی فراز

این روش بر اساس فاژ و برای شناسایی سریع مایکوباکتریوم‌ها و حساسیت دارویی آن به‌کار می‌رود (۳۷). در این روش از فاژ گزارشگر (مثلا phAE142) که بیان‌کنندهٔ ژن لوسی فراز کرم شب‌تاب است استفاده می‌شود. تولید نور در مدت چند دقیقه پس از آلودگی به فاژ قابل تشخیص است. در سویه‌های *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* که به داروهای مورد استفاده در محیط کشت (ایزونیازید و ریفامپین) حساس هستند نور تولید شده بلافاصله خاموش می‌شود، درحالی‌که سوش‌های مقاوم به دارو به تولید نور ادامه می‌دهند. به این ترتیب حساسیت دارویی از مقاومت دارویی قابل تشخیص است (۳۸).

روش رنگ سنجی Colorimetric methods

روش دیگر برای تشخیص سویه‌های Mtb مقاوم به درمان روش‌های رنگ سنجی است. اساس این روش‌ها اضافه کردن شناساگرهای احیاکننده در حین رشد *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* به محیط کشت باکتری و در نتیجه تغییر رنگ محیط است (۳۹). از جمله اندیکاتورهای رنگی (رنگ‌های اکسیداسیون و احیا) می‌توان به نمک‌های تترازولیوم کلراید و رزازورین اشاره کرد. نمک تترازولیوم کلراید در فرم اکسیدهٔ خود زرد رنگ است ولی در طی رشد باکتری *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* احیا شده و پس از تشکیل فورمازان به رنگ آبی– بنفش تبدیل می‌شود (۴۰). این روش برای تشخیص مستقیم مقاومت به ریفامپین در نمونه‌های خلط اسمیر مثبت مورد ارزیابی قرار گرفته و نتایج عالی را به دنبال داشته است (۴۱). تشکیل آئروسل‌های خطرناک زیستی استفاده از آن را با محدودیت روبرو کرده است (۴۲).

روش احیا نیترات

اساس این روش احیای نیترات به نیتریت توسط *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* است و نتایج آن معمولا در طی ۱۰ روز قابل بررسی است (۴۳). روش احیای نیترات روشی ساده، دقیق و کم‌هزینه برای تشخیص سویه‌های MDR-TB است و در مورد نمونه‌های خلط اسمیر مثبت به‌خوبی اجرا شده است. سویه‌های مقاوم که نیترات را احیا می‌کند به رنگ قرمز-صورتی در محیط آشکار می‌شود، در حالی که سویه‌های حساس توسط آنتی‌بیوتیک مهار شده و توانایی خود را در احیا نیترات از دست می‌دهند (۴۴). این روش در چندین مطالعه برای داروهای خط اول و افلوکساسین با نتایج خوبی ارزیابی شده است (۴۵). محدودیت روش نیترات ردوکتاز، وجود موارد مثبت کاذب به‌علت رشد سایر میکروارگانیسم‌ها به همراه MTB است.

روش های ژنوتیپی تشخیص سویه‌های مقاوم به داروی سل (MDR-TB)

روش‌های مولکولی توانایی تشخیص ژن‌های موثر در ایجاد مقاومت دارویی و موتاسیون‌های مرتبط با مقاومت را در ژن‌های هدف

مایکوباکتریوم توبرکلوزیس دارند. با استفاده از این روش‌ها نتایج ظرف مدت ۱ الی ۲ روز به‌دست آمده و به‌طور مستقیم روی ایزوله‌های خلط اسمیر مثبت و سایر نمونه‌های کلینیکی قابل انجام است (جدول ۲).

از جمله این روش‌ها می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

جدول ۲. مقایسهٔ روش‌های ژنوتیپی تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی در ارزیابی مقاومت دارویی *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس*

روش‌ها	زمان انجام	مزایا	معایب
Amplification refractory mutation system (ARMS)	۲-۴ ساعت	سرعت و دقت بالا مقرون به صرفه	احتمال شناسایی جهش‌های خاموش
Line probe assay • **INNO-LipA® Rif.TB** • **Genotype®MTBDR plus**	۶-۴۸ ساعت	سرعت و دقت بالا	ناتوانی در افتراق جهش‌های خاموش از جهش‌هایی که عامل مقاومتند.
RT-PCR	۲ ساعت	سرعت بالا دقت در جستجوی جهش‌های مربوط به مقاومت توان عملیاتی بالا توانایی تشخیص جهش‌های جدید حذف انتقال آلودگی	هزینهٔ بالا ناتوانی در شناسایی جهش‌های خارج از منطقه ژنی هدف دقت محدود در شناسایی جهش‌های مربوط به مقاومت به ایزونیازید
Pyrosequencing	۲-۴۸ ساعت	ارائه توالی دقیق DNA توان عملیاتی بالا	محدودیت دقت در توالی‌یابی قطعه‌های طویل DNA دقت پایین در شناسایی جهش‌های مربوط به مقاومت به ایزونیازید
DNA-Sequencing		روش استاندارد طلایی برای شناسایی موتاسیون‌های مربوط به مقاومت	هزینه بالا زمان بر نیاز به پرسنل متخصص
Xpret MTB/RIF (cephied)	۲ ساعت	حساسیت و اختصاصیت بالا	ایمنی-زیستی بالا (به علت کار با نمونه خلط مشکوک) دسترسی به منبع مطمئن تامین برق نیاز به تهویه مطبوع هزینه نسبتا بالای دستگاه
High Resulation Melt	۲ ساعت	سرعت و دقت بالا مقرون به‌صرفه	احتمال شناسایی جهش‌های خاموش

۱. روش Amplification refractory mutation system (ARMS)

ARMS-PCR یک روش ساده و سریع برای شناسایی موتاسیون‌های نقطه‌ای، پلی‌مورفیسم‌های طول قطعه محدوده شده (RFLP) و یا حذف شدن کوچک در طول توالی قطعه DNA است (۴۶). این روش همچنین allele-specific PCR و یا PCR amplification of specific alleles (PASA) نیز خوانده می‌شود. این روش در واقع کاربردی از PCR است که در آن DNA توسط پرایمرهای ویژه آلل تکثیر می‌شود. معمولاً، ARMS-PCR واکنشی مولتیپلکس است که در آن از سه یا چند پرایمر برای تکثیر هم‌زمان ناحیه مشابه استفاده می‌شود (۴۷). در این روش، یکی از پرایمرهای مخصوص آلل جهش یافته است و در هنگام تکثیر با پرایمر مشترک کار می‌کند. پرایمر دیگر با همان پرایمر مشترک، قطعه‌ای بزرگ‌تر از قطعه حاصل از پرایمر آلل جهش یافته را تکثیر می‌کند که کنترل داخلی واکنش است. فقدان یا حضور قطعه کوتاه‌تر نشان دهندهٔ وجود یا عدم وجود آلل جهش یافته است. در واقع ARMS-PCR می‌تواند به‌طور هم‌زمان آلل تیپ وحشی و آلل‌های جهش یافته را تکثیر کند به‌علاوه اجازهٔ تکثیر به کنترل داخلی DNA را نیز می‌دهد. اساس این روش بر پایه تفاوت نوکلئوتید انتهای ′۳ پرایمرها برای آلل‌های مختلف بنا شده است و مربوط به محل اختلاف بین دو آلل است که سبب افتراق در تکثیر محصول می‌شود. لازم به ذکر است که در این روش از آنزیم Taq پلیمراز فاقد خاصیت اگزونوکلئازی ′۳ به ′۵ باید استفاده شود. طراحی صحیح پرایمرها (معمولا طول ۳۰ bp انتخاب می‌شود) و دمای ذوب بالای آنها سبب جلوگیری از نتایج

نادرست می‌گردد. افزایش تعداد سیکل‌های غیر ضروری منجر به نتایج مثبت کاذب می‌شود .مهم‌ترین مزیت روش ARMS این است که مرحلهٔ تکثیر و مراحل تشخیصی با هم ترکیب می‌شوند ، به این ترتیب که وجود محصول تکثیرشده نشان‌دهندهٔ وجود آلل خاص است و بالعکس. برای تشخیص معمول، این ویژگی ARMS بدین معنی است که روشی بسیار کارآمد است. با این حال، ترکیب مراحل تکثیر و تشخیص منجر به سیستمی شده است که ممکن است به اندازهٔ برخی از روش‌های دیگر نظیر PCR-RFLP که در آن این دو مرحله مهم از هم جدا هستند، قوی نباشد. این روش با موفقیت برای تشخیص جهش‌های مرتبط با مقاومت به ریفامپین در *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* به کار می‌رود (۴۸).

۲. روش بررسی توالی ژنی (DNA-Sequencing)

تعیین توالی DNA گسترده‌ترین روش ژنوتیپی برای تشخیص مقاومت دارویی به ویژه داروهای خط اول درمان سل در *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* است. توالی یابی دقیق‌ترین و مطمئن‌ترین روش برای شناسایی موتاسیون است و از آن به‌عنوان روش استاندارد طلایی استفاده می‌شود (۴۹). این روش زمانی که اکثر سوش‌های مقاوم حاوی موتاسیون‌هایی در ناحیهٔ محدودی از ژن هدف باشد کاربردی‌تر است. برای مثال بیش از ۹۰ درصد موارد مقاوم به ریفامپین حاوی موتاسیون در ناحیه ژن *rpoB* هستند لذا این روش صادق و قابل اجرا است. از معایب روش تعیین توالی می‌توان به هزینه زیاد، وقت‌گیر بودن و نیاز به پرسنل متخصص جهت انجام آن اشاره کرد، به همین منظور در کشورهای در حال توسعه به‌طور معمول در دسترس نیست و نمی‌توان از آن به‌عنوان روشی برای غربالگری موتاسیون‌ها استفاده کرد (۵۰).

۳. روش PCR-Single Stranded Conformation Polymorphism Analysis (SSCP)

روش PCR-SSCP روشی ساده و سریع است که می‌تواند برای تعیین وجود یا عدم وجود جهش در ناحیه خاص DNA بر اساس الگوی مهاجرت DNA در ژل مورد استفاده قرار گیرد. این روش به‌عنوان ابزار غربالگری سریع، از دقت بالایی در تشخیص مقاومت دارویی به‌ویژه در موارد MDR-TB برخوردار است (۵۱). در این روش مولکولی، تغییرات کوچک توالی نوکلئوتیدی ممکن است منجر به تغییر در ساختار ثانویه و همچنین حرکت مولکول DNA شود که بر روی ژل پلی‌آکریل‌آمید غیر دناتوره قابل تشخیص است. در PCR-SSCP، منطقه هدف ژن توسط PCR تکثیر می‌شود و محصول آن به دو مولکول تک رشته‌ای تبدیل شده و در معرض الکتروفورز ژل پلی‌آکریل‌آمید غیر دناتوره قرار می‌گیرد. در شرایط غیر دناتوراسیون، مولکول DNA تک رشته‌ای دارای ساختار ثانویه‌ای است که می‌تواند با توالی نوکلئوتیدی، شرایط بافر و دما تعیین شود. با این حال، آنالیز نتایج PCR-SSCP نشان داده که از لحاظ فنی مشکل است و حساسیت آن به اندازه کافی نیست. همچنین تشخیص جهش‌های خاموشی که ارتباطی با مقاومت ندارند منجر به ارائه نتایج مثبت کاذب می‌شود. در این روش به علت دستکاری گسترده محصول PCR در مرحله پس از PCR و در حین الکتروفورز، محصول دچار آلودگی شده و برای سایر آنتی‌بیوتیک‌ها کارایی ندارد. امروزه از این روش برای شناسایی جهش‌های باکتری *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* مرتبط با مقاومت به داروهای خط اول درمان سل نظیر ایزونیازید و ریفامپین استفاده می‌شود (۵۲).

۴. روش PCR-restriction fragment length polymorphism

روش PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) شامل دو مرحله مجزا است که از ادغام روش PCR و به دنبال آن برش در ناحیه هدف توسط آنزیم‌های محدودالاثر تشکیل شده است. روش PCR-RFLP روشی ساده، سریع و ارزان به‌منظور تشخیص تغییرات یک یا چند کدونی که درسوش‌های مقاوم به دارو و موتاسیون یافته‌اند، استفاده می‌شود (۵۳). روش PCR-RFLP بیشتر برای جستجوی موتاسیون در ژن‌های Katg 315 و306 emb که به ترتیب برای تشخیص سریع مقاومت به ایزونیازید و اتامبوتول هستند، به کار می‌رود (۵۴, ۵۵).

۵. روش تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی با Real Time PCR

روش Real Time PCR بسیار شبیه به روش PCR معمولی است. در این روش نیز همانند PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، یک توالی تکثیر می‌شود. اما تفاوت Real Time PCR با PCRمعمولی در سنجش کمی توالی تکثیر شده است. در روش Real Time PCR با به کار گرفتن نشانگر فلورسنت در واکنش، میزان تکثیر محصول ردیابی می‌شود. این نشانگرهای فلورسنت به گونه‌ای طراحی می‌شوند که در صورت تکثیر DNA، با اتصال آنها به DNA نور تولید کنند. روش Real Time PCR به دو دسته تقسیم بندی می‌شود: (۱) استفاده از نشانگرهای فلورسنت غیراختصاصی با استفاده از رنگ‌های باند شده به DNA مانند SYBR® Green و یا Eva green (۲) استفاده از نشانگرهای فلورسنت اختصاصی با استفاده از شناساگرهای (پروب) ژن هدف. در این روش از تعدادی

شناساگر الیگونوکلئوتیدی (probe) استفاده می‌شود. شناساگرهای مورد استفاده در این روش شامل: Molecular Beacons، TaqMan® Probes، FRET Hybridization Probes و Scorpion® Primers هستند که از میان آنها سه روش TaqMan® Probes بیشترین کاربرد را در بررسی مقاومت‌های دارویی دارد (۵۶). روشReal Time PCR برای تشخیص سریع مقاومت دارویی در نمونه‌های خلط اسمیر مثبت از طریق شناسایی موتاسیون‌ها در ژن‌های *rpoB*، *KatG* و ناحیه پروموتوری *inhA* کاربرد دارد (۵۷، ۵۸). RT-PCR دارای حساسیت و اختصاصیت بالایی در شناسایی کمپلکس *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* بوده و به‌طور رایج برای تشخیص بیماری سل استفاده می‌شود (۵۹). مزیت عمدهٔ این روش افزایش سرعت انجام روش (۱/۵ تا ۲ ساعت بعد از استخراج DNA) و کاهش احتمال انتقال آلودگی می‌باشد. از طرفی نیازمندی به تجهیزات و معرف‌های گران (خصوصا هزینه بالای پرایمر و پروب) و هم‌چنین پرسنل با مهارت استفاده از آن را در آزمایشگاه‌های معمول میکروبیولوژی با محدودیت روبرو کرده است (۶۰).

۶. تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی با روش High Resolution Melt-HRM

این روش به‌منظور شناسایی موتاسیون، پلی‌مورفیسم و اپی‌ژنتیک در نمونه‌های DNA کاربرد دارد (۶۱). ابتدا ژن مرتبط با مقاومت به روش Real Time PCR تکثیر می‌شود سپس محصول PCR در حضور رنگ فلئورسنت اختصاصی DNA نظیر SYBR Green، Eva Green و LC Green به نسبت حدود ۰/۳°C بر ثانیه حرارت داده می‌شوند. رنگ‌ها برای DNA دو رشته‌ای اختصاصی هستند. رنگ Eva Green نسبت به سایر رنگ‌هایی مانند SYBR Green دارای حساسیت بیشتری است. در شروع افزایش دما سیگنال بالا است زیرا در دمای پایین اکثر DNA ها دو رشته‌ای هستند. با ادامهٔ افزایش دما DNA شروع به جدا شدن و تک رشته‌ای شدن می‌کند و در نتیجه رنگ‌ها را از دست می‌دهد. (۶۲) در روش HRM تفاوت بین ژنوتیپ‌های مختلف از طریق تفاوت در منحنی ذوب مشخص می‌گردد. به این صورت که حتی یک تغییر در توالی ژن‌ها (جهش) می‌تواند در Tm (دمایی که مقدار مساوی از DNA دورشته‌ای و تک‌رشته‌ای وجود دارد) تاثیر بگذارد و سبب تغییر منحنی ذوب آن قطعه شود. دمای Tm اغلب به‌صورت پیک نمایش داده می‌شود. نمونه‌های رفرانس باید پیک یکسان در Tm مورد انتظار داشته باشند در حالی که نمونه‌های دارای توالی متفاوت دو یا بیشتر پیک دارند (۶۳, ۶۴). از مزایای این روش مقرون به صرفه بودن آن نسبت به سایر روش‌های تعیین ژنوتیپ نظیر توالی‌یابی و TaqMan SNP typing است و نیازمند پروب‌های فلئورسنت گران و مواد اختصاصی نیست، در نتیجه برای پروژه‌های تعیین ژنوتیپ در مقیاس بالا مناسب است. همچنین این روش با سرعت بالا می‌تواند تعداد زیادی نمونه را در مدت زمان کوتاه تعیین ژنوتیپ کند. روش HRMA روشی ساده است و در هر آزمایشگاهی که مجهز به دستگاه Real Time PCR در ترکیب با HRM است قابل اجرا است (۶۳, ۶۴).

از محدودیت‌های این روش احتمال شناسایی جهش‌های خاموش یا سایر جهش‌هایی که با مقاومت دارویی در ارتباط نیستند، می‌باشد. روش HRMA دارای حساسیت بالایی برای شناسایی مقاومت دارویی در *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* است. برای مثال در مطالعه Pietzka و همکاران (۶۵) حساسیت روش HRM برای شناسایی مقاومت به ریفامپین ۹۰ درصد و در مطالعه Ong و همکاران (۶۶) حساسیت این روش برای ریفامپین و ایزونیازید به ترتیب ۸۹ درصد و ۹۸ درصد گزارش شده است (۶۶).

۷. تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی با روش Line probe assay (LiPA)

سنجش پروب خطی (Line probe assay) روشی مبتنی بر DNA Strip Test است که شامل استخراج DNA، تکثیر ناحیه ی ژنی مرتبط با مقاومت و پس از آن هیبریداسیون فرآورده‌های PCR نشان‌دار شده با پروب‌های الیگونوکلئوتیدی ثابت شده بر روی نوار است. این الیگونوکلئوتیدها حساسیت بالایی دارند و در صورت وجود حتی یک نوکلئوتید متفاوت به DNA مکمل متصل نمی‌شوند. در این روش در صورتی که قطعه DNA به مکمل خود متصل شود؛ بعد از پایان رنگ‌آمیزی به صورت خطوط خاص بر روی نوار مشاهده می‌گردد. روش LiPA این امکان را ایجاد می‌کند تا به‌طور هم‌زمان بتوان وجود چندین موتاسیون را تنها با استفاده از یک واکنش شناسایی کرد (۶۷). دو روش تجاری برای تشخیص سویه‌های MDR-TB براساس این روش وجود دارد:

روش INNO-LiPA Rif. TB (Innogenetics)

این روش موتاسیون‌های مربوط به مقاومت به ریفامپین را در ناحیهٔ تعیین‌کننده مقاومت در ژن *rpoB* جستجو می‌کند. از آنجایی که مقاومت به ریفامپین شاخصی برای تشخیص MDR-TB است، نتایج مثبت این روش در حدود ۹۰ درصد نمونه‌های MDR-TB را تشخیص می‌دهد (۶۸).

روش GenoType MTBDR plus (Hain life sciences)

این روش علاوه بر تشخیص موتاسیون در ژن *rpoB*، به‌طور هم‌زمان موتاسیون در ژن *katG* 315 و ناحیه تنظیمی *inhA* که مربوط به مقاومت به ایزونیازید است را شناسایی می‌کند (۶۸). حساسیت و ویژگی این روش نسبت به روش BACTEC 460 به ترتیب ۹۴-۱۰۰ درصد و ۹۹-۱۰۰ درصد تخمین زده شده است (۶۹). با این حال، این روش نمی‌تواند به‌طور کامل جایگزین روش‌هایی همچون کشت شود. هزینهٔ زیاد، نیازمندی به پرسنل متخصص و آزمایشگاه‌هایی با سطح ایمنی بالا از معایب این روش به شمار می‌آید (۶۹).

۸. روش پایروسکوئنسینگ (Pyrosequencing)

روشی سریع و اتوماتیک تعیین توالی DNA است که اخیرا برای تشخیص موتاسیون‌های مرتبط با مقاومت دارویی در *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* استفاده می‌شود (۷۰). این روش در واقع روش توالی‌یابی در حین سنتز است و شامل سنتز یک رشته مکمل DNA به قطعه‌ای از DNA مورد نظر توسط DNA پلیمراز می‌باشد. هنگامی که آنزیم DNA پلیمراز نوکلئوتید مکمل را به یک جفت باز روی الگوی رشته خوانده شده جای می‌دهد، ATP تولیدشده که انرژی لازم برای ایجاد نور توسط واکنش لوسیفراز را فراهم می‌کند (۷۱). همانند روش توالی‌یابی مرسوم، این روش نیز توالی دقیق DNA را تعیین می‌کند. مزایای این روش نسبت به توالی‌یابی معمولی کاهش هزینه، سرعت و سادگی در پردازش و سهولت در تفسیر نتایج است. اشکال اصلی در pyrosequencing عدم دقت آن در خوانش‌های طولانی و پیوسته (برای مثال بیشتر از ۵۰ نوکلئوتید) است (۷۱). حساسیت و ویژگی این روش برای جستجوی مقاومت به ریفامپین به ترتیب ۹۲ درصد و ۱۰۰ درصد است ولی از آنجایی که بسیاری از جهش مربوط به مقاومت به ایزونیازید ناشناخته‌اند این مقادیر کمتر است (حساسیت ۶۴-۸۱ درصد و اختصاصیت ۱۰۰ درصد) (۷۲).

۹. روش Xpret MTB/RIF (cephied)

روش Xpret MTB/RIF با تشخیص سریع و هم‌زمان بیماری سل و مقاومت به ریفامپین، تحولی در کنترل سل ایجاد کرده است. باید توجه داشت که نسبت بالایی از سویه‌های مقاوم به ریفامپین با مقاومت هم‌زمان به ایزونیازید (حدودا ۹۵ درصد) همراه است و مقاومت انفرادی به ریفامپین تنها حدود ۵ درصد سویه‌های مقاوم را به خود اختصاص داده است. به همین خاطر مقاومت به ریفامپین را می‌توان به‌عنوان شاخص MDR-TB با صحت بالا استفاده کرد. روش Xpret MTB/RIF قادر است هم‌زمان کمپلکس *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* (MTBC) و مقاومت آن به آنتی‌بیوتیک ریفامپین را به‌طور مستقیم از خلط جمع‌آوری شده در عرض دو ساعت شناسایی کند. در مقایسه، روش‌های کشت استاندارد به ۲ تا ۶ هفته زمان برای رشد Mtb و همچنین به‌طور معمول ۳ هفته بیشتر برای انجام روش‌های حساسیت دارویی نیاز دارند (۷۳). در روش Xpret MTB/RIF از کارتریج‌های یک‌بار مصرف به همراه سیستم GeneXpret استفاده می‌شود. کارتریج GeneXpret از پیش با تمام مواد ضروری جهت پردازش نمونه، استخراج و تکثیر DNA و شناسایی لیزری ژن هدف *rpoB* تکثیر شده، بارگذاری شده است (۷۴). نمونهٔ خلط بیمار مشکوک به سل با معرف موجود در این روش به‌منظور همگن‌سازی و آلودگی‌زدایی مخلوط گردیده و داخل کارتریج مخصوص ریخته می‌شود و سپس در دستگاه GeneXpert قرار می‌گیرد. از این مرحله به بعد کلیه مراحل به‌صورت کاملا خودکار پردازش می‌شود. مزیت عمده این روش این است که می‌توان آن را به‌طور دقیق با حداقل زمان انجام داد. حساسیت (حدود ۹۸٪) و اختصاصیت (حدود ۹۳٪) این روش برای شناسایی بیماری سل قابل قبول است. روش Xpret MTB/RIF ابزار جدید ارزشمند با حساسیت و ویژگی بالا برای شناسایی زود هنگام بیماری سل و تعیین مقاومت به ریفامپین است (۷۵). به علاوه تشخیص سریع مقاومت به ریفامپین این امکان را به بیمار می‌دهد که خیلی زودتر از آنکه در انتظار نتایج سایر روش‌های حساسیت دارویی باشد، رژیم درمانی مناسب را آغاز کند و سبب اجتناب از درمان‌های غیر ضروری و صرفه‌جویی در هزینه‌ها می‌شود (۷۶).

بحث

شیوع بالای سل مقاوم به درمان (MDR-TB) به‌عنوان بیماری عفونی خطرناک و کشنده، در نتیجه عدم وجود برنامه‌های کنترل ملی سل، ضعف در تشخیص و همچنین تجویز داروهای نامناسب و ناکافی به‌ویژه در کشورهای در حال توسعه است. پیشرفت‌های اخیر در بهینه‌سازی رژیم‌های درمانی و به‌کارگیری روش‌های تشخیص سریع سل تا حد زیادی سبب بهبود اوضاع MDR-TB در سراسر جهان شده است (۶, ۷). روش‌های ژنوتیپی برای تشخیص حساسیت دارویی به دانش ما از مکانیسم‌های مولکولی که منجر به مقاومت دارویی می‌شود، بستگی دارد. دانش فعلی ما در مورد مکانیسم‌های مولکولی مرتبط با مقاومت دارو به‌ویژه برای داروهای خط دوم درمان سل ناقص است. تحقیقات هر چه بیشتر برای تعیین این مکانیسم‌ها سبب بهبود روش‌های مولکولی و افزایش قابلیت اطمینان در استفاده از آنها را دارد (۶۰-۴۷). روش‌های تشخیص

مقاومت به داروهای خط اول و دوم درمان سل نه تنها باید از دقت بالایی برخوردار باشند بلکه باید این مورد را نیز در نظر داشت که روش‌های مورد استفاده خصوصا در کشورهای در حال توسعه کم هزینه و در دسترس عموم آزمایشگاه‌های میکروبیولوژی باشد. روش‌های تشخیص مولکولی به همراه روش‌های فنوتیپی برای تایید سویه‌های مشکوک به MDR-TB مناسب و قابل اجرا هستند و نتیجه‌ای ارزشمند را در ترکیب با روش‌های فنوتیپی ارائه می‌دهند. اخیرا روش‌های سریع و مقرون به صرفه برای کشت و تعیین حساسیت دارویی توسعه داده شده‌اند که برای اجرا در کشورهای با درآمد اندک و مناطق اندمیک کارآمد هستند. ارائه دستورالعمل و الگوریتم تشخیصی به پزشکان و آزمایشگاه برای مدیریت و تشخیص MDR-TB لازم است. نسل جدید داروهای ضد سل که در مراحل مختلف تولید و توسعه هستند می‌توانند امیدواری برای بهبود وضعیت گزینه‌های درمانی در برابر سل و سل مقاوم به درمان باشند. از میان روش‌های فنوتیپی که امروزه در دسترس هستند روش نسبی بررسی مقاومت دارویی در مقایسه با سایر روش‌ها از حساسیت و اختصاصیت بالایی برخوردار است خصوصا اگر کاربری که آن را انجام می‌دهد از تبحر لازم برخوردار باشد. اما تنها مشکل روش نسبی مدت زمان نسبتا طولانی مورد نیاز برای گزارش نتیجه است (۲۶ ، ۲۷). بنابراین استفاده از روش‌های مولکولی در رسیدن سریع‌تر به نتیجهٔ اولیهٔ گزارش مقاومت بسیار کمک‌کننده است. در میان روش‌های مولکولی قابل استفاده، روش GeneXpret MTB/RIF که قادر است هم‌زمان کمپلکس *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* و مقاومت آن به آنتی‌بیوتیک ریفامپین را به‌طور مستقیم از خلط جمع‌آوری شده در عرض دو ساعت شناسایی کند از دقت، حساسیت و اختصاصیت قابل قبولی برخوردار است. تنها ایراد استفاده از این روش وابستگی به کارتریج‌های مخصوصی است که لزوما از خارج از کشور وارد می‌شود (۷۴-۷۶). بنابراین توصیه می‌شود که حتما یک روش مولکولی مناسب دیگر که از دقت مناسبی برخوردار باشد مانند ارزیابی مقاومت دارویی به روش TaqMan Real time PCR در آزمایشگاه مربوطه راه‌اندازی شود.

سپاسگزاری

از تمامی همکارانی که در انجام این پژوهش ما را یاری رساندند، سپاسگزاریم.

تعارض در منافع

در انجام مطالعهٔ حاضر، نویسندگان هیچ‌گونه تضاد منافعی نداشته‌اند.

Referance

1. Seung KJ, Keshavjee S, Rich ML. Multidrug-resistant tuberculosis and extensively drug-resistant tuberculosis. Cold Spring Harbor perspectives in medicine. 2015;5(9):a017863. [DOI:10.1101/cshperspect.a017863] [PMID] [PMCID]
2. (WHO) WHO. Global tuberculosis report 2019. WHO. 2019.
3. Pfyffer GE, Vincent V. Mycobacterium tuberculosis Complex, Mycobacterium leprae, and Other Slow-Growing Mycobacteria. Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections2010. [DOI:10.1002/9780470688618.taw0046]
4. Seung KJ, Keshavjee S, Rich ML. Multidrug-Resistant Tuberculosis and Extensively Drug-Resistant Tuberculosis. Cold Spring Harbor perspectives in medicine. 2015;5(9):a017863-a. [DOI:10.1101/cshperspect.a017863] [PMID] [PMCID]
5. Gandhi NR, Nunn P, Dheda K, Schaaf HS, Zignol M, van Soolingen D, et al. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a threat to global control of tuberculosis. Lancet (London, England). 2010;375(9728):1830-43. [DOI:10.1016/S0140-6736(10)60410-2]
6. Zainuddin ZF, Dale JW. Does Mycobacterium tuberculosis have plasmids? Tubercle. 1990;71(1):43-9. [DOI:10.1016/0041-3879(90)90060-L]
7. Nagai Y, Iwade Y, Hayakawa E, Nakano M, Sakai T, Mitarai S, et al. High resolution melting curve assay for rapid detection of drug-resistant Mycobacterium tuberculosis. Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy. 2013;19(6):1116-25. [DOI:10.1007/s10156-013-0636-3] [PMID]
8. Vilcheze C, Jacobs WR, Jr. The mechanism of isoniazid killing: clarity through the scope of genetics. Annual review of microbiology. 2007;61:35-50. [DOI:10.1146/annurev.micro.61.111606.122346] [PMID]
9. Caminero JA, Sotgiu G, Zumla A, Migliori GB. Best drug treatment for multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis. The Lancet Infectious diseases. 2010;10(9):621-9. [DOI:10.1016/S1473-3099(10)70139-0]
10. Zhang Y, Heym B, Allen B, Young D, Cole S. The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of Mycobacterium tuberculosis. Nature. 1992;358(6387):591-3. [DOI:10.1038/358591a0] [PMID]

11. Seifert M, Catanzaro D, Catanzaro A, Rodwell TC. Genetic mutations associated with isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis: a systematic review. PloS one. 2015;10(3):e0119628-e. [DOI:10.1371/journal.pone.0119628] [PMID] [PMCID]
12. Ando H, Kondo Y, Suetake T, Toyota E, Kato S, Mori T, et al. Identification of katG mutations associated with high-level isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2010;54(5):1793-9. [DOI:10.1128/AAC.01691-09] [PMID] [PMCID]
13. Hazbon MH, Brimacombe M, Bobadilla del Valle M, Cavatore M, Guerrero MI, Varma-Basil M, et al. Population genetics study of isoniazid resistance mutations and evolution of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2006;50(8):2640-9. [DOI:10.1128/AAC.00112-06] [PMID] [PMCID]
14. Timmins GS, Deretic V. Mechanisms of action of isoniazid. Molecular microbiology. 2006;62(5):1220-7. [DOI:10.1111/j.1365-2958.2006.05467.x] [PMID]
15. Cardoso RF, Cardoso MA, Leite CQ, Sato DN, Mamizuka EM, Hirata RD, et al. Characterization of ndh gene of isoniazid resistant and susceptible Mycobacterium tuberculosis isolates from Brazil. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 2007;102(1):59-61. [DOI:10.1590/S0074-02762007000100009] [PMID]
16. Rindi L, Bianchi L, Tortoli E, Lari N, Bonanni D, Garzelli C. Mutations responsible for Mycobacterium tuberculosis isoniazid resistance in Italy. The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International :union: against Tuberculosis and Lung Disease. 2005;9(1):94-7.
17. Snell J, Arora K. Mechanism of action of antimicrobial and antitumor agents: Springer Science & Business Media; 2012.
18. Campbell EA, Korzheva N, Mustaev A, Murakami K, Nair S, Goldfarb A, et al. Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerase. Cell. 2001;104(6):901-12. [DOI:10.1016/S0092-8674(01)00286-0]
19. 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. [DOI:10.1016/0140-6736(93)90417-F]
20. Brandis G, Wrande M, Liljas L, Hughes D. Fitness-compensatory mutations in rifampicin-resistant RNA polymerase. Molecular microbiology. 2012;85(1):142-51. [DOI:10.1111/j.1365-2958.2012.08099.x] [PMID]
21. Laurenzo D, Mousa SA. Mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis and current status of rapid molecular diagnostic testing. Acta tropica. 2011;119(1):5-10. [DOI:10.1016/j.actatropica.2011.04.008] [PMID]
22. Ohno H, Koga H, Kuroita T, Tomono K, Ogawa K, Yanagihara K, et al. Rapid prediction of rifampin susceptibility of Mycobacterium tuberculosis. American journal of respiratory and critical care medicine. 1997;155(6):2057-63. [DOI:10.1164/ajrccm.155.6.9196115] [PMID]
23. Johnson R, Streicher EM, Louw GE, Warren RM, van Helden PD, Victor TC. Drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. Current issues in molecular biology. 2006;8(2):97-111.
24. 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.
25. CNTC. Drug-resistant tuberculosis: a survival guide for clinicians. 2nd edition. 2008. p. 1-266.
26. Beckers B, Lang H, Schimke D, Lammers A. Evaluation of a bioluminescence assay for rapid antimicrobial susceptibility testing of mycobacteria. European journal of clinical microbiology. 1985;4(6):556-61. [DOI:10.1007/BF02013394] [PMID]
27. Amini S, Hoffner S, Allahyar Torkaman MR, Hamzehloo G, Nasiri MJ, Salehi M, Sami Kashkooli G, Shahraki MS, Mohsenpoor M, Soleimanpour S, Mir R. Direct drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis using the proportional method: A multicenter study. J Glob Antimicrob Resist. 2019;17:242-244. [DOI:10.1016/j.jgar.2018.12.022] [PMID]
28. Gupta A, Anupurba S. Direct drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis against primary anti-TB drugs in northern India. Journal of infection in developing countries. 2010;4:695-703. [DOI:10.3855/jidc.1079] [PMID]
29. Canetti G, Froman S, Grosset Ja, Hauduroy P, Langerova M, Mahler H, et al. Mycobacteria: laboratory methods for testing drug sensitivity and resistance. Bulletin of the World Health Organization. 1963;29(5):565.
30. Rusch-Gerdes S, Domehl C, Nardi G, Gismondo MR, Welscher HM, Pfyffer GE. Multicenter evaluation of the mycobacteria growth indicator tube for testing susceptibility of Mycobacterium tuberculosis to first-line drugs. J Clin Microbiol. 1999;37(1):45-8. [DOI:10.1128/JCM.37.1.45-48.1999] [PMID] [PMCID]
31. Roberts G, Goodman N, Heifets L, Larsh H, Lindner T, McClatchy J, et al. Evaluation of the BACTEC radiometric method for recovery of mycobacteria and drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis from acid-fast smear-positive specimens. Journal of clinical microbiology. 1983;18(3):689-96. [DOI:10.1128/JCM.18.3.689-696.1983] [PMID] [PMCID]
32. Anargyros P, Astill DS, Lim IS. Comparison of improved BACTEC and Lowenstein-Jensen media for culture of mycobacteria from clinical specimens. Journal of clinical microbiology. 1990;28(6):1288-91. [DOI:10.1128/JCM.28.6.1288-1291.1990] [PMID] [PMCID]
33. Ahmad S, Mokaddas E. Recent advances in the diagnosis and treatment of multidrug-resistant tuberculosis. Respiratory medicine. 2009;103(12):1777-90. [DOI:10.1016/j.rmed.2009.07.010] [PMID]

34. Tortoli E, Cichero P, Piersimoni C, Simonetti MT, Gesu G, Nista D. Use of BACTEC MGIT 960 for recovery of mycobacteria from clinical specimens: multicenter study. Journal of clinical microbiology. 1999;37(11):3578-82. [DOI:10.1128/JCM.37.11.3578-3582.1999] [PMID] [PMCID]
35. Gravet A, Souillard N, Habermacher J, Moser A, Lohmann C, Schmitt F, et al. Culture and susceptibility testing of mycobacteria with VersaTREK. Pathologie-biologie. 2011;59:32-8. [DOI:10.1016/j.patbio.2010.08.003] [PMID]
36. Gravet A, Souillard N, Habermacher J, Moser A, Lohmann C, Schmitt F, et al. [Culture and susceptibility testing of mycobacteria with VersaTREK]. Pathol Biol (Paris). 2011;59(1):32-8. [DOI:10.1016/j.patbio.2010.08.003] [PMID]
37. Wilson SM, Al-Suwaidi Z, McNerney R, Porter J, Drobniewski F. Evaluation of a new rapid bacteriophage-based method for the drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis. Nature medicine. 1997;3(4):465-8. [DOI:10.1038/nm0497-465] [PMID]
38. Banaiee N, Bobadilla-Del-Valle M, Bardarov S, Jr., Riska PF, Small PM, Ponce-De-Leon A, et al. Luciferase reporter mycobacteriophages for detection, identification, and antibiotic susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis in Mexico. J Clin Microbiol. 2001;39(11):3883-8. [DOI:10.1128/JCM.39.11.3883-3888.2001] [PMID] [PMCID]
39. Kalokhe AS, Lee JC, Ray SM, Anderson AM, Nguyen MLT, Wang YF, et al. Multidrug-resistant tuberculosis drug susceptibility and molecular diagnostic testing. The American journal of the medical sciences. 2013;345(2):143-8. [DOI:10.1097/MAJ.0b013e31825d32c6] [PMID] [PMCID]
40. Boum Y, 2nd, Orikiriza P, Rojas-Ponce G, Riera-Montes M, Atwine D, Nansumba M, et al. Use of colorimetric culture methods for detection of Mycobacterium tuberculosis complex isolates from sputum samples in resource-limited settings. Journal of clinical microbiology. 2013;51(7):2273-9. [DOI:10.1128/JCM.00749-13] [PMID] [PMCID]
41. Raut U, Narang P, Mendiratta DK, Narang R, Deotale V. Evaluation of rapid MTT tube method for detection of drug susceptibility of Mycobacterium tuberculosis to rifampicin and isoniazid. Indian journal of medical microbiology. 2008;26(3):222-7. [DOI:10.4103/0255-0857.39586] [PMID]
42. Kohli A, Bashir G, Fatima A, Jan A, Wani N-u-d, Ahmad J. Rapid drug-susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates to first-line antitubercular drugs by nitrate reductase assay: A comparison with proportion method. International Journal of Mycobacteriology. 2016;5(4):469-74. [DOI:10.1016/j.ijmyco.2016.06.006] [PMID]
43. Angeby KA, Klintz L, Hoffner SE. Rapid and inexpensive drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis with a nitrate reductase assay. J Clin Microbiol. 2002;40(2):553-5. [DOI:10.1128/JCM.40.2.553-555.2002] [PMID] [PMCID]
44. Montoro E, Lemus D, Echemendia M, Martin A, Portaels F, Palomino JC. Comparative evaluation of the nitrate reduction assay, the MTT test, and the resazurin microtitre assay for drug susceptibility testing of clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis. The Journal of antimicrobial chemotherapy. 2005;55(4):500-5. [DOI:10.1093/jac/dki023] [PMID]
45. Martin A, Montoro E, Lemus D, Simboli N, Morcillo N, Velasco M, et al. Multicenter evaluation of the nitrate reductase assay for drug resistance detection of Mycobacterium tuberculosis. Journal of microbiological methods. 2005;63(2):145-50. [DOI:10.1016/j.mimet.2005.03.004] [PMID]
46. Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, et al. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). Nucleic acids research. 1989;17(7):2503-16. [DOI:10.1093/nar/17.7.2503] [PMID] [PMCID]
47. Ugozzoli L, Wallace RB. Allele-specific polymerase chain reaction. Methods.1991;2(1):42-8. [DOI:10.1016/S1046-2023(05)80124-0]
48. Little S. Amplification-refractory mutation system (ARMS) analysis of point mutations. Current protocols in human genetics. 2001;Chapter 9:Unit 9.8.
49. Sisay T, Berhane N, Verma D. Molecular Biology Drug Resistance Mechanisms and Molecular Diagnosis Methods for Tuberculosis. Molecular Biology: Open Access. 2019;8:230.
50. Ho PL, Yam WC, Leung CC, Yew WW, Mok TY, Chan KS, et al. Molecular tests for rapid detection of rifampicin and isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis. Hong Kong medical journal = Xianggang yi xue za zhi. 2015;21 Suppl 4:4-7.
51. Xu H-B, Jiang R-H, Sha W, Li L, Xiao H-P. PCR-Single-Strand Conformational Polymorphism Method for Rapid Detection of Rifampin-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*: Systematic Review and Meta-Analysis. Journal of Clinical Microbiology. 2010;48(10):3635-40. [DOI:10.1128/JCM.00960-10] [PMID] [PMCID]
52. Kim BJ, Kim SY, Park BH, Lyu MA, Park IK, Bai GH, et al. Mutations in the rpoB gene of Mycobacterium tuberculosis that interfere with PCR-single-strand conformation polymorphism analysis for rifampin susceptibility testing. Journal of clinical microbiology. 1997;35(2):492-4. [DOI:10.1128/JCM.35.2.492-494.1997] [PMID] [PMCID]
53. Shima K, Wu Y, Sugimoto N, Asakura M, Nishimura K, Yamasaki S. Comparison of a PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) Assay to Pulsed-Field Gel Electrophoresis To Determine the Effect of Repeated Subculture and Prolonged Storage on RFLP Patterns of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157:H7. Journal of Clinical Microbiology. 2006;44(11):3963-8. [DOI:10.1128/JCM.00717-06] [PMID] [PMCID]

54. Victor TC, van Helden PD, Warren R. Prediction of drug resistance in M. tuberculosis: molecular mechanisms, tools, and applications. IUBMB life. 2002;53(4-5):231-7. [DOI:10.1080/15216540212642] [PMID]
55. Ahmad S, Mokaddas E, Jaber AA. Rapid detection of ethambutol-resistant Mycobacterium tuberculosis strains by PCR-RFLP targeting embB codons 306 and 497 and iniA codon 501 mutations. Molecular and cellular probes. 2004;18(5):299-306. [DOI:10.1016/j.mcp.2004.04.001] [PMID]
56. Shamputa IC, Rigouts, Portaels F. Molecular genetic methods for diagnosis and antibiotic resistance detection of mycobacteria from clinical specimens. APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica. 2004;112(11-12):728-52. [DOI:10.1111/j.1600-0463.2004.apm11211-1203.x] [PMID]
57. Ruiz M, Torres MJ, Llanos AC, Arroyo A, Palomares JC, Aznar J. Direct detection of rifampin- and isoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosis in auramine-rhodamine-positive sputum specimens by real-time PCR. Journal of clinical microbiology. 2004;42(4):1585-9. [DOI:10.1128/JCM.42.4.1585-1589.2004] [PMID] [PMCID]
58. Riahi F, Derakhshan M, Mosavat A, Soleimanpour S, Rezaee SA. Evaluation of Point Mutation Detection in Mycobacterium tuberculosis with Isoniazid Resistance Using Real-Time PCR and TaqMan Probe Assay. Applied Biochemistry and Biotechnology. 2015; 175 (5): 2447-2455. [DOI:10.1007/s12010-014-1442-9] [PMID]
59. Watanabe Pinhata JM, Cergole-Novella MC, Moreira dos Santos Carmo A, Ruivo Ferro e Silva R, Ferrazoli L, Tavares Sacchi C, et al. Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis complex by real-time PCR in sputum samples and its use in the routine diagnosis in a reference laboratory. Journal of medical microbiology. 2015;64(9):1040-5. [DOI:10.1099/jmm.0.000121] [PMID]
60. Parashar D, Chauhan DS, Sharma VD, Katoch VM. Applications of real-time PCR technology to mycobacterial research. The Indian journal of medical research. 2006;124(4):385-98.
61. Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. Analytical biochemistry. 1997;245(2):154-60. [DOI:10.1006/abio.1996.9916] [PMID]
62. Wittwer CT, Reed GH, Gundry CN, Vandersteen JG, Pryor RJ. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. Clinical chemistry. 2003;49(6 Pt 1):853-60. [DOI:10.1373/49.6.853] [PMID]
63. Landolt P, Stephan R, Scherrer S. Development of a new High Resolution Melting (HRM) assay for identification and differentiation of Mycobacterium tuberculosis complex samples. Scientific Reports. 2019;9(1):1850. [DOI:10.1038/s41598-018-38243-6] [PMID] [PMCID]
64. Alonso M, Navarro Y, Barletta F, Lirola MM, Gotuzzo E, Bouza E, et al. A novel method for the rapid and prospective identification of Beijing Mycobacterium tuberculosis strains by high-resolution melting analysis. Clinical Microbiology and Infection. 2011;17(3):349-57. [DOI:10.1111/j.1469-0691.2010.03234.x] [PMID]
65. Pietzka AT, Indra A, Stöger A, Zeinzinger J, Konrad M, Hasenberger P, et al. Rapid identification of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates by rpoB gene scanning using high-resolution melting curve PCR analysis. Journal of antimicrobial chemotherapy. 2009;63(6):1121-7. [DOI:10.1093/jac/dkp124] [PMID]
66. Ong DCT, Yam W-C, Siu GKH, Lee ASG. Rapid detection of rifampicin- and isoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosis by high-resolution melting analysis. Journal of clinical microbiology. 2010;48(4):1047-54. [DOI:10.1128/JCM.02036-09] [PMID] [PMCID]
67. Traore H, van Deun A, Shamputa IC, Rigouts L, Portaels F. Direct detection of Mycobacterium tuberculosis complex DNA and rifampin resistance in clinical specimens from tuberculosis patients by line probe assay. Journal of clinical microbiology. 2006;44(12):4384-8. [DOI:10.1128/JCM.01332-06] [PMID] [PMCID]
68. Hillemann D, Rusch-Gerdes S, Richter E. Evaluation of the GenoType MTBDRplus assay for rifampin and isoniazid susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis strains and clinical specimens. J Clin Microbiol. 2007;45(8):2635-40. [DOI:10.1128/JCM.00521-07] [PMID] [PMCID]
69. Giannoni F, Iona E, Sementilli F, Brunori L, Pardini M, Migliori GB, et al. Evaluation of a new line probe assay for rapid identification of gyrA mutations in Mycobacterium tuberculosis. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2005;49(7):2928-33. [DOI:10.1128/AAC.49.7.2928-2933.2005] [PMID] [PMCID]
70. Marttila HJ, Makinen J, Marjamaki M, Soini H. Prospective evaluation of pyrosequencing for the rapid detection of isoniazid and rifampin resistance in clinical Mycobacterium tuberculosis isolates. European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology. 2009;28(1):33-8. [DOI:10.1007/s10096-008-0584-5] [PMID]
71. Jureen P, Engstrand L, Eriksson S, Alderborn A, Krabbe M, Hoffner SE. Rapid detection of rifampin resistance in Mycobacterium tuberculosis by Pyrosequencing technology. J Clin Microbiol. 2006;44(6):1925-9. [DOI:10.1128/JCM.02210-05] [PMID] [PMCID]
72. Zhao JR, Bai YJ, Wang Y, Zhang QH, Luo M, Yan XJ. Development of a pyrosequencing approach for rapid screening of rifampin, isoniazid and ethambutol-resistant Mycobacterium tuberculosis. The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International :union: against Tuberculosis and Lung Disease. 2005;9(3):328-32.
73. Friedrich SO, von Groote-Bidlingmaier F, Diacon AH. Xpert MTB/RIF Assay for Diagnosis of Pleural Tuberculosis. Journal of Clinical Microbiology. 2011;49(12):4341-2. [DOI:10.1128/JCM.05454-11] [PMID] [PMCID]

74. Ioannidis P, Papaventsis D, Karabela S, Nikolaou S, Panagi M, Raftopoulou E, et al. Cepheid GeneXpert MTB/RIF Assay for Mycobacterium tuberculosis Detection and Rifampin Resistance Identification in Patients with Substantial Clinical Indications of Tuberculosis and Smear-Negative Microscopy Results. Journal of Clinical Microbiology. 2011;49(8):3068-70. [DOI:10.1128/JCM.00718-11] [PMID] [PMCID]
75. Boehme CC, Nicol MP, Nabeta P, Michael JS, Gotuzzo E, Tahirli R, et al. Feasibility, diagnostic accuracy, and effectiveness of decentralised use of the Xpert MTB/RIF test for diagnosis of tuberculosis and multidrug resistance: a multicentre implementation study. Lancet (London, England). 2011;377(9776):1495-505. [DOI:10.1016/S0140-6736(11)60438-8]
76. Noor KM, Shephard L, Bastian I. Molecular diagnostics for tuberculosis. Pathology. 2015;47(3):250-6. [DOI:10.1097/PAT.0000000000000232] [PMID]