DOI: 10.22092/VJ.2017.109886
شماره ۱۱۶ پاییز ۱۳۹۶
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده های بیولوژیک

تعیین هویت مولکولی *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* کمپلکس در بیماران استان فارس به وسیله تکنیک های RD Typing و PCR-RFLP

• **نوش آفرین ترابی**
گروه میکروبیولوژي، دانشگاه آزاد اسلامي واحد قم، قم، ایران
• **نادر مصوری (نویسنده مسئول)**
آزمایشگاه رفرانس مایکوباکتریوم بیماریزای دام،
موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی،
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
• **راضیه نظری**
گروه میکروبیولوژي، دانشگاه آزاد اسلامي واحد قم، قم، ایران
تاریخ دریافت:۱۳۹۵-۰۵-۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵-۰۹-۰۱
Email: n.mosavari@rvsri.ac.ir

چکیده

بیماري سل، بیماری زئونوزي است که به عنوان يكي از مهم‌ترين بيماري‌هاي تهديد كننده انسان و دومين عامل عفوني در انسان مي‌باشد. تمایز گونه‌های مختلف کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به روش‌های معمول زمان برو از طرفی، تشخیص دقیق جهت درمان به موقع بیماران، نقش حیاتی را ایفا می‌نماید. لذا هدف از این مطالعه، شناسایی جنس مایکوباکتریوم و تعیین هویت مولکولی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس در بیماران استان فارس به وسیله تکنیک‌های RD typing و PCR-RFLP بود. ژنوم ۵۰ جدایه با استفاده از روش جوشاندن استخراج گردید. برای تعیین جنس این جدایه‌ها از تکنیک PCR بر اساس قطعه 16S rRNA استفاده گردید. تکنیک PCR IS۶۱۱۰ و تکنیکRD typing نیز به ترتیب برای شناسایی و تعیین هویت باکتری مورد استفاده قرار گرفت. در نهایت، با استفاده از تکنیک‌های RD typing و PCR-RFLP بر روی ژن oxyR جهت تعیین هویت مایکوباکتریوم/تعیین گونه مایکوباکتریوم انجام شد. تمامی جدایه‌ها با استفاده از تکنیک PCR برایrRNA ۱۶S باند ۵۴۳ جفت باز را نمایش دادند و با استفاده ازPCR برایIS۶۱۱۰، باند ۲۴۵ جفت باز را نمایش دادند که مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس را اثبات کردند. در تعیین هویت RD typing،RD۱، RD۴، RD۹ و RD۱۲ به ترتیب باندهای ۱۷۲،۲۳۵،۱۴۶و ۳۶۵ شناسایی شدندکه مشخص شد تمامی جدایه‌های مورد مطالعه گونه توبرکلوزیس می‌باشند. با استفاده از تکنیک PCR-RFLP روی ژن کاذب oxyR هویت مولکولی RD typing تایید شد. نتایج در این مطالعه نیز نشان‌دهنده قدرت تکنیک RD typing درتمایز بین مایکوباکتریوم‌ها می‌باشد و مشخص گردید تمام جدایه‌های ارسالی از شیراز، *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* هستند و *مایکوباکتریوم بویس* مشاهده نشد. عدم وجود گونه بویس در جدایه‌های ارسالی از شهر شیراز، نشان‌دهنده بهداشت مناسب شیر پاستوریزه در این شهر می‌باشد.

کلمات کلیدي: کمپلکس *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس*، S۶۱۱۰، PCR16S rRNA ، RD typing

Veterinary Researches & Biological Products No 116 pp: 16-25

Molecular Identification of ***Mycobacterium tuberculosis*** Complex by RD-Typing and PCR-RFLP Method

By: Tourabi, N., Department of Microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran. Mosavari, N., Bovine tuberculosis reference laboratory, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extention Organization (AREEO), Karaj, IRAN. and Nazari, R., Department of Microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.

Received: 2016-08-17 Accepted: 2016-11-21

Email: n.mosavari@rvsri.ac.ir

Tuberculosis is still considered as one of the most important zoonotic diseases and the cause of infectious death and human casualties. The main purpose of this study was to set up and diagnose *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates in patients of FARS, Shiraz using the Regions of Difference (RD) typing and RFLP techniques. The genomes of 50 isolates were extracted by boiling method. To determine the genus of the isolates, PCR technique based on 16 s rRNA was used. IS6110 PCR and RD typing were used for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex. Finally, the PCR-RFLP method was used as a comparing method for comparative evaluation of RD typing to identify mycobacteria. Amplification of 543 bp bands in 16s rRNA PCR showed that all studied isolates belonged to the genus Mycobacterium. In IS6110 gene PCR, it was shown that all isolates were *Mycobacterium tuberculosis* complex due to the amplification of 245 bp bands. In RD typing the identification was based on RD1, RD4, RD9 and RD12. The comparative method of PCR-RFLP on pseudo gene oxyR showed that all isolates were *Mycobacterium tuberculosis*. Using RD-typing, it was found that all isolates achieved from Shiraz were *Mycobacterium tuberculosis*. The absence of *Mycobacterium bovis* isolates represents good hygiene and consumption of pasteurized milk in this city. The results of this study also reflect the ability of RD typing technique in differentiation of mycobacteria.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis* complex, RD-typing, PCR 16s rRNA, IS6110

مقدمه

سل یکی از مهم‌ترین بیماری‌های عفونی در سراسر جهان است که در اثر آلودگی با باکتری‌های گروه *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* ایجاد می شود. سل بیماری زئونوزي است که به عنوان يكي از مهم‌ترين بيماري‌هاي تهديد كننده محسوب مي‌شود. همچنين به عنوان دومين ميزان تلفات در اثر عامل عفوني (پس از اسهال عفونی) است که بدون دخالت سایر عوامل بیماری‌زای فرصت‌طلب موجب تلفات در انسان مي‌شود (۱۸). حدود دو میلیارد نفر یعنی تقریباً یک سوم جمعیت جهان به این باکتری آلوده‌اند. هر ساله نزدیک به نه میلیون نفر به سل مبتلا می‌شوند و در حدود دو میلیون نفر در نتیجه ابتلاء به این بیماری می‌میرند (۱۱).

علی‌رغم درمان با دارو، میزان مرگ و میر بالا است، بنابراین ابتلا به سل به عنوان یک مشکل بهداشتی مهم در جهان می‌باشد. تمایز اعضای مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس برای سیستم نظام مراقبت مخصوصاً در افراد آلوده به ایدز مهم می‌باشد. اطلاعات محدودی از بروز و شیوع بیماری سل انسانی به دلیل محدودیت‌های آزمایش‌های میکروب‌شناسی به دست آمده است. یکی از دلایل فقدان نظام مراقبت قوی برای این باکتری عدم وجود آزمایش‌های سریع و ساده جهت تشخیص نوع باکتری در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی معمول می‌باشد (۱۹).

امروزه با پیشرفت تکنیک‌های مولکولی و به کارگیری علوم نوین در تشخیص و تعیین هویت سریع مایکوباکتریوم‌ها و با توجه به اهمیت این بیماری، تشخیص سریع و درمان مناسب و پیشگیری این بیماری به عنوان یک مورد مهم در جهان و در کشورهای در حال توسعه محسوب می‌شود (۶). از اصلی‌ترین نکات برای کنترل این بیماری تکنیک تشخیص آن می‌باشد که باید قدرت ردیابی منشاء بیماری و قدرت تفکیک گونه‌های *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* کمپلکس را داشته باشد. محدودیت‌های موجود در روش‌های معمول آزمایشگاهی برای تفکیک گونه‌ها سبب پیدایش تکنیک‌های مولکولی شده است که به عنوان یک ابزار بسیار مناسب و دقیق در آزمایشگاه‌ها به کار می‌رود. به طور کلی روش‌های تشخیصی مولکولی برای مایکوباکتریوم به دو صورت در آزمایشگاه‌ها قابل تقسیم می‌باشد: ۱- روش‌های شناسایی و تعیین هویت مایکوباکتریوم‌ها در حد جنس و گونه، ۲- انگشت نگاری ژنتیکی، استفاده از PCR-IS6110 که به عنوان شاخص در کمپلکس *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* می‌باشد (۱۶). يكي از روش‌هاي مولكولي كه بر اساس واكنش زنجيره‌اي پليمراز بنا شده تكنيک اسپوليگوتايپينگ و تكنيک‌هاي regions of difference RD-

typing و variable-number tandem repeat (VNTR) می‌باشند که بیشتر براي جداسازي سويه‌هاي *M. tuberculosis* complex به کار مي‌رود. از زمان کشف پلی مورفیسم single nucleotide polymorphisms (DNA) تا به حال روش‌های تایپینگ مولکولی جدایه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به عنوان ابزار ارزشمندی برای شناسایی بیماری استفاده شده‌اند (۸). قطعات RD ابزار دیگری هستند که برای تمایز جدایه‌های *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* کمپلکس استفاده می‌شوند. این قطعات تحت تاثیر تغییراتی مانند حذف و یا درج قرار می‌گیرند. بنابراین مقایسه پروفایلRD در تمایز اعضای *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* کمپلکس مفید می‌باشد (۱، ۲). ترتیب توالي‌هاي فاصله‌انداز تقریبا یکسان است، اما حذف و اضافه شدن توالي فاصله‌انداز و RD ممکن است باعث تفاوت‌ها شود. این نواحی شامل ژن‌هایی هستند که فاکتورهای حدت را کد می‌کنند (۱۴). گروه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس به وسیله شباهت ۹۹/۹ درصد در سطح نوکلئوتید و توالی یکسان 16s rRNA مشخص می‌شوند (۷). تکامل اعضای مختلف مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس به ترکیب پلی مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی SNPs اکتسابی گسسته و به همان نسبت به تغییراتی مانند حذف، الحاق، معکوس و مضاعف‌شدن که در مجموع به عنوان ناحیه لوکوس‌های متفاوت شناخته شده است، مربوط می‌شود (۲). RD ها نواحی هستند که در *مایکوباکتریوم توبرکولوزیس* کمپلکس وجود دارند ولی در مایکوباکتریوم بویس و چند مایکوباکتریوم غیر توبرکلوزیس مشاهده نمی‌شوند این نواحی شامل DNA ژنومی بزرگتر از ۸۰ کیلوجفت باز هستند. پیش بینی شده حدود ۸۹ قالب خوانش دارد که

جدول ۱- توالی پرایمرها و اندازه مجصولات PCR

Locus	PCR prime sequence (5'-3')	(Size (bp
۱۶s rRNA	ACGGTGGGTACTAGGTGTGGGTTTC	۵۴۳
	TCTGCGATTACTAGCGACTCCGACTTCA	
IS۶۱۱۰	CCTGCGAGCGTAGGCGTCGG	۲۴۵
	CTCGTCCAGCGCCGC	
RD۱	AAGCGGTTGCCGCCGACCGACC	۱۴۶,۱۹۶
	CTGGCTATATTCCTGGGCCCGG	
	GAGGCGATCTGGCGGTTTGGGG	
RD۴	ATGTGCGAGCTGAGCGATG	۱۷۲,۲۶۸
	TGTACTATGCTGACCCATGCG	
	AAAGGAGCACCATCGTCCAC	
RD۹	CAAGTTGCCGTTTCGAGCC	۲۳۵,۱۰۸
	CAATGTTTGTTGCGCTG	
	GCTACCCTCGACCAAGTGTT	
RD۱۲	GGGAGCCCAGCATTTACCTC	۳۶۹,۳۰۶
	GTGTTGCGGGAATTACTCGG	
	AGCAGGAGCGGTTGGATATTC	
oxyR	GGTGATATATCACACCAT	۵۴۸
	CTATGCGATCAGGCGTACTTG	

به همان تعداد پروتئین کد می‌کند (۵). ناحیه RD شامل ژن‌هایی است که فاکتورهای بالقوه حدت را کد می‌کنند مانند: پروفاژ (RD۳،RD۱۱)، فسفولیپاز c (RD۵)، اینوازین (RD۷)، یک بیوسیستم پلی ساکاریدی خارجی (RD۴). RD۱ تنها ناحیه‌ای است که در سویه‌های واکسن BCG وجود ندارد و فقط در سویه‌های بیماری‌زای *مایکوباکتریوم توبرکولوزیس* کمپلکس (MTC) دیده می‌شود. RDها به ایجاد یک رابطه تکاملی در MTC کمک می‌کنند (۱۱). مطالعات نشان داده است که ناحیه RD در درجه اول RD۹ و RD۱ و بعد RD۱, RDV, RD۱۰, RD۸, RD۱۳, RD۱۲, RD۴, RD۲, ابزار جالبی برای توسعه ابزار تشخیصی قدرتمند جهت تشخیص سریع و بدون ابهام اعضای *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* کمپلکس می‌باشند (۱۲). با توجه به اهمیت تعیین هویت مولکولی جدایه‌های *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* کمپلکس‌جدا شده از موارد تحت درمان و کنترل بیماری ارسال شده به آزمایشگاه رفرانس سل موسسه رازی در شیراز، هدف از انجام این مطالعه تعیین تعداد و درصد گونه‌های مختلف مایکوباکتریوم در جدایه‌ها با استفاده از RD typing و PCR RFLP به عنوان یک روش بسیار حساس و دقیق نسبت به روش‌های معمول بیوشیمیایی بود.

مواد و روش‌ها

تعیین هویت تشخیص جدایه‌های مایکوباکتریوم به دست آمده از استان فارس در طرح کشوری وزرات بهداشت، درمان و آموزش پزشکی با استفاده از تکنیک‌های مختلف مولکولی برای تعیین هویت کمپلکس *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* از اهداف این مطالعه بود. برای تعیین هویت نمونه‌های رسیده به مؤسسه سرم‌سازی رازی از تکنیک‌های مبتنی بر PCR برای تکثیر ژن IS۶۱۱۰، 16S rRNA و تکنیک RD typing و همچنین تکنیک PCR-RFLP بر روی شبه ژن oxyR استفاده شد. تکثیر 16S rRNA، برای تعیین جنس مایکوباکتریوم و IS۶۱۱۰ برای تشخیص کمپلکس *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* انجام شد. نمونه‌های خلط ارسال شده در محیط لونشتاین جانسون (Merck) کشت شدند و کلنی‌های تکی به تیوب حاوی بافر TE اضافه شد. به منظور کشتن باکتری‌ها، میکروتیوب‌های حاوی باکتری و ۲۰۰ میکرولیتر بافرTE، به مدت ۲۰ دقیقه داخل بن ماری ۸۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شده و سپس به مدت ۳۰ دقیقه با محلول TB Lysis (شرکت سیناکلون) در ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند..

تکثیر قطعه ۱۶S rRNA

از تکثیر 16S rRNA، به منظور تعیین جنس مایکوباکتریوم استفاده شد. تکثیر قطعه ژن 16S rRNA با استفاده از جفت پرایمر نشان داده شده در جدول ۱ انجام گردید. حجم نهایی واکنش ۲۵ میکرولیتر و اجزای واکنش شامل ۱۸ میکرولیتر مستر میکس (شرکت سیناکلون)، ۲ میکرولیتر از مخلوط زوج پرایمرها و پنج میکرولیتر از DNA الگو بود. بقیه حجم واکنش تا یک میکرولیتر آنزیم Taq DNA polymerase (شرکت سیناکلون) بود. تکثیر در چرخه دمایی، در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه برای واسرشت اولیه شروع شد و با دمای واسرشت ۹۴ به مدت یک دقیقه، دمای اتصال پرایمر۶۰ درجه سانتی‌گراد یک دقیقه و دمای طویل شدن ۷۲ درجه سانتی‌گراد یک دقیقه ادامه پیداکرد. این سیکل ۳۵ بار تکرار شد و با دمای نهایی طویل شدن ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه پایان یافت. محصول نهایی این واکنش قطعه‌ای به اندازه ۵۴۳ جفت باز بود.

IS 6110 PCR

حضور ژن IS۶۱۱۰ در جدایه به دست آمده نشانگر کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بود. تکثیر قطعه ژن IS۶۱۱۰ با استفاده از جفت پرایمر نشان داده شده در جدول ۱ انجام گردید که قطعه حاصل از تکثیر آن باندی به اندازه ۲۴۵ جفت باز بود. حجم نهایی واکنش ۲۵ میکرولیتر و اجزای واکنش شامل ۱۸ میکرولیتر مخلوط واکنش (شرکت سیناکلون)، دو میکرولیتر از مخلوط زوج پرایمرها و پنج میکرولیتر از DNA الگو بود. بقیه حجم واکنش تا یک میکرولیتر آنزیم Taq DNA polymerase (شرکت سیناکلون) بود. تکثیر در چرخه دمایی با دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت سه دقیقه برای واسرشت اولیه شروع شد و با دمای واسرشت ۹۴ به مدت یک دقیقه، دمای اتصال پرایمر ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و دمای طویل شدن ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه ادامه پیدا کرد. این سیکل ۳۵ بار تکرار شد و با دمای نهایی طویل شدن ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت چهار دقیقه پایان یافت.

RD typing

برای تعیین هویت مایکوباکتریوم‌های جداشده، تکثیرقطعه ژن‌هایRD۱، RD۴، RD۹ و RD۱۲ با استفاده از جفت پرایمرهای نشان داده شده در

جدول ۲- تعیین گونه مایکوباکتریوم به روش RD typing

	RD۱۲	RD۹	RD۴	RD۱
مایکوباکتریوم توبرکلوزیس	۳۶۹	۲۳۵	bp ۱۷۲	bp ۱۴۶
مایکوباکتریوم بویس	۳۰۶	۱۰۸	bp ۲۶۸	bp ۱۴۶

جدول۲ انجام گردید. در این جدول طول قطعه هر ژن به تفکیک مشخص شده است. حجم نهایی واکنش ۲۵ میکرولیتر و اجزای واکنش شامل ۱۸ میکرولیتر مستر میکس (شرکت سیناکلون)، دو میکرولیتر از مخلوط زوج پرایمرها و پنج میکرولیتر از DNA الگو بود. بقیه حجم واکنش تا یک میکرولیتر آنزیم Taq DNA polymerase (شرکت سیناکلون) بود. تکثیردر چرخه دمایی، با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه برای واسرشت اولیه شروع شد و با دمای واسرشت ۹۴ به مدت یک دقیقه، دمای اتصال پرایمر ۶۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و دمای طویل شدن ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه ادامه پیدا کرد. این سیکل ۴۵ بار تکرار شد و با دمای نهایی طویل شدن ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه پایان یافت.

PCR-RFLP روی شبه ژنoxyR

به منظور تایید جدایه‌های تعیین هویت شده از تکنیک PCR-RFLP بر روی شبه ژن oxyR استفاده شد. تکثیرقطعه ژن oxyR با استفاده از جفت پرایمرهای نشان داده شده در جدول۲ انجام گردید. حجم نهایی واکنش ۲۵ میکرولیتر و اجزای واکنش شامل ۱۸ میکرولیتر مستر میکس (شرکت سیناکلون)، دو میکرولیتر از مخلوط زوج پرایمرها و پنج میکرولیتر از DNA الگو بود. بقیه حجم واکنش تا یک میکرولیتر آنزیم Taq DNA polymerase (شرکت سیناکلون) بود. تکثیر در چرخه دمایی، دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه برای واسرشت اولیه شروع شد و با دمای واسرشت ۹۴ به مدت ۲۱ ثانیه، دمای اتصال پرایمر۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۱ ثانیه و دمای طویل شدن ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۲ ثانیه ادامه پیدا کرد. این سیکل ۳۰ بار تکرار شد و با دمای نهایی طویل شدن ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه پایان یافت.

براي هر نمونه مورد آزمایش یک میکروتیوب استریل یک میلي‌ليتري انتخاب و شماره نمونه مورد نظر بر روي میکروتیوب درج گردید براي انجام هر واکنش RFLP مواد مورد نیاز به شرح زیر با یکدیگر مخلوط شدند. ۱۵ میکرولیتر از محصول PCR بدست آمده از تکثیر ژن کاذب oxyR به میکروتیوپ منتقل و میزان ۲/۵ میکرو لیتر آنزیم Alu I (۱۰ واحد در میلی‌لیتر) (شرکت Fermentas DNA) اضافه و سپس با آب مقطر استریل حجم نهایي به ۲۰ میکرولیتر رسانیده شد و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید.

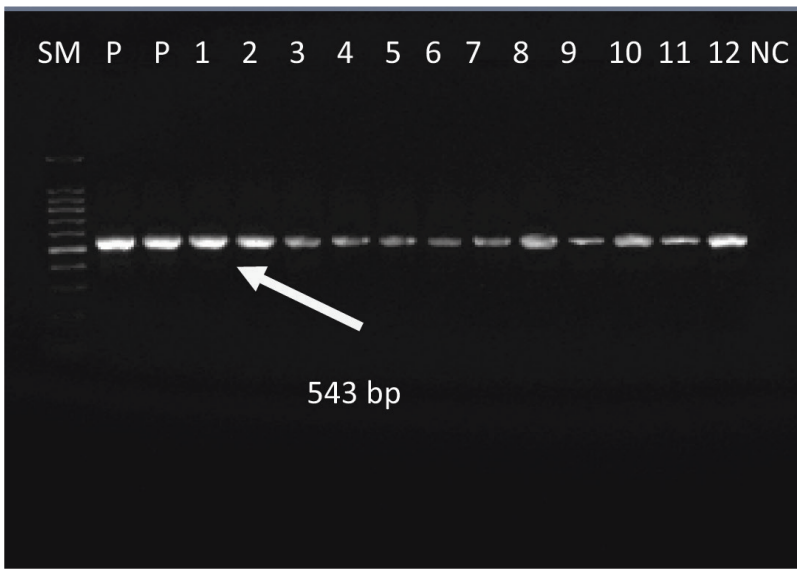
نتایج

تکثیر قطعه ژن 16s rRNA

بررسی پلی مورفیسم اختصاصی نوکلئوتیدی اختصاصی جنس در ژن ۱۶S rRNA، ابزار مناسبی برای تشخیص جنس مایکوباکتریوم می‌باشد. لذا برای تایید جنس جدایه‌های مایکوباکتریوم، از تکنیک PCR برای تکثیر ژن مذکور استفاده شد. در صورت مشاهده باند ۵۴۳ جفت باز (شکل ۱) جدایه به دست آمده متعلق به جنس مایکوباکتریوم بود. در این مطالعه، حدود ۵۰ نمونه بیمار وجود داشت.

تکثیر قطعه ژن IS۶۱۱۰ در *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* کمپلکس

قطعه ژنی IS6110 باندی به اندازه ۲۴۵ جفت باز است که برای نمایش



شکل ۱- ستون SM سایز مارکر صد جفت بازی، ستون های P *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* و *مایکوباکتریوم بویس*، بقیه ستون ها از شماره ۱ تا ۱۲ باندهای ۵۴۳ جفت باز ژن 16s rRNA و ستون NC کنترل منفی

کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بود. مشخص شد که ۵۰ نمونه مورد مطالعه متعلق به گروه مایکوباکتریوم توبرکولوزیس کمپلکس بودند (شکل ۲).

تشخیص مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به روش RD typing

برای بررسی جنس و گونه ۵۰ نمونه مورد مطالعه، وجود قطعات ژنی RD۱، RD۴، RD۹ و RD۱۲ مورد بررسی قرار گرفت. در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس چهار قطعه ژنی وجود دارد. تشخیص جدایه باکتری بر اساس حضور یا عدم حضور باندها طبق جدول زیر صورت گردید (جدول ۲). در این مرحله نیز، نشان داده شد که تمام نمونه‌های مورد مطالعه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس هستند و الودگی به مایکوباکتریوم بویس وجود نداشت (شکل ۳).

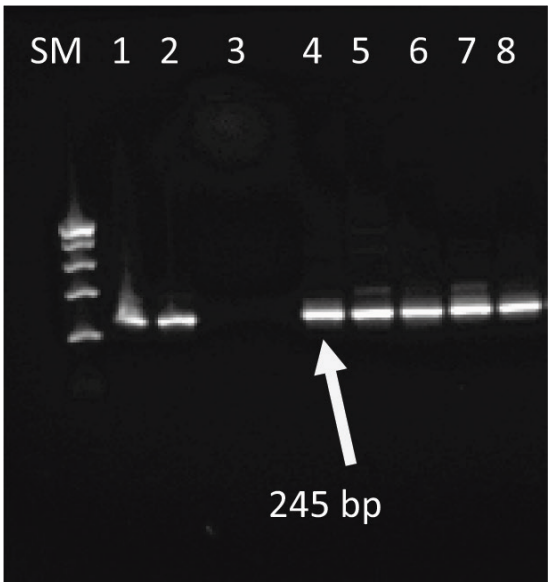
PCR-RFLP

ژن هدف در این قسمت مطالعه ژن oxyR بود. محصولات PCR روی ژل الکتروفورز جداسازی شدند. در تمام نمونه‌ها، باند ۵۴۸ جفت باز مشاهده شد. پس از تکثیر قطعه مورد نظر، محصول PCR توسط آنزیم محدودکننده AluI برش داده شد. در مایکوباکتریوم بویس سویه AN۵ که به عنوان شاهد مثبت بود، پس از برش سه باند در سایزهای ۲۳۶، ۱۴۸، ۷۴ جفت باز دیده شد. اما در جدایه‌ها تنها یک باند ۲۳۰ جفت باز مشاهده گردید که نشان‌دهنده این بود که تمامی جدایه‌ها مایکوباکتریوم بویس نبوده و مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می‌باشند (شکل ۴).

بحث

مطالعه حاضر، با توجه به اهمیت تعیین هویت سویه‌های مایکوباکتریوم در درمان و کنترل بیماری و لزوم سرعت در تشخیص، به عنوان بخشی از طرح کشوری وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی بر روی نمونه‌های ارسالی از استان فارس صورت گرفت. نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر نشان داد تمام جدایه‌های ارسالی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس هستند و مایکوباکتریوم بویس در جدایه‌های ارسالی استان فارس، وجود ندارد، لذا می‌توان نتیجه گیری کرد که سطح بهداشت در این استان بالا بوده و مردم این استان از شیر پاستوریزه بهره می‌برند. تشخیص بیماری سل برای پیشگیری و درمان اهمیت بالایی دارد. در مقابل روش‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی تعیین هویت مایکوباکتریوم‌ها، به عنوان روش‌های زمان‌بر و خطرناک از لحاظ آلودگی کارکنان آزمایشگاه، RD typing روشی با دقت بالا، سریع و کم خطر می‌باشد. این روش قادر است در طول یک روز کاری اعضای مایکوباکتریوم توبرکولوزیس کمپلکس را تمیز دهد. در این مطالعه نشان داده شد تکنیک RD typing با توجه به افزایش سرعت جداسازی میکروارگانیسم و تعیین هویت مایکوباکتریوم، می‌تواند نجات‌بخش بیماران با ضریب خطر بالا باشد.

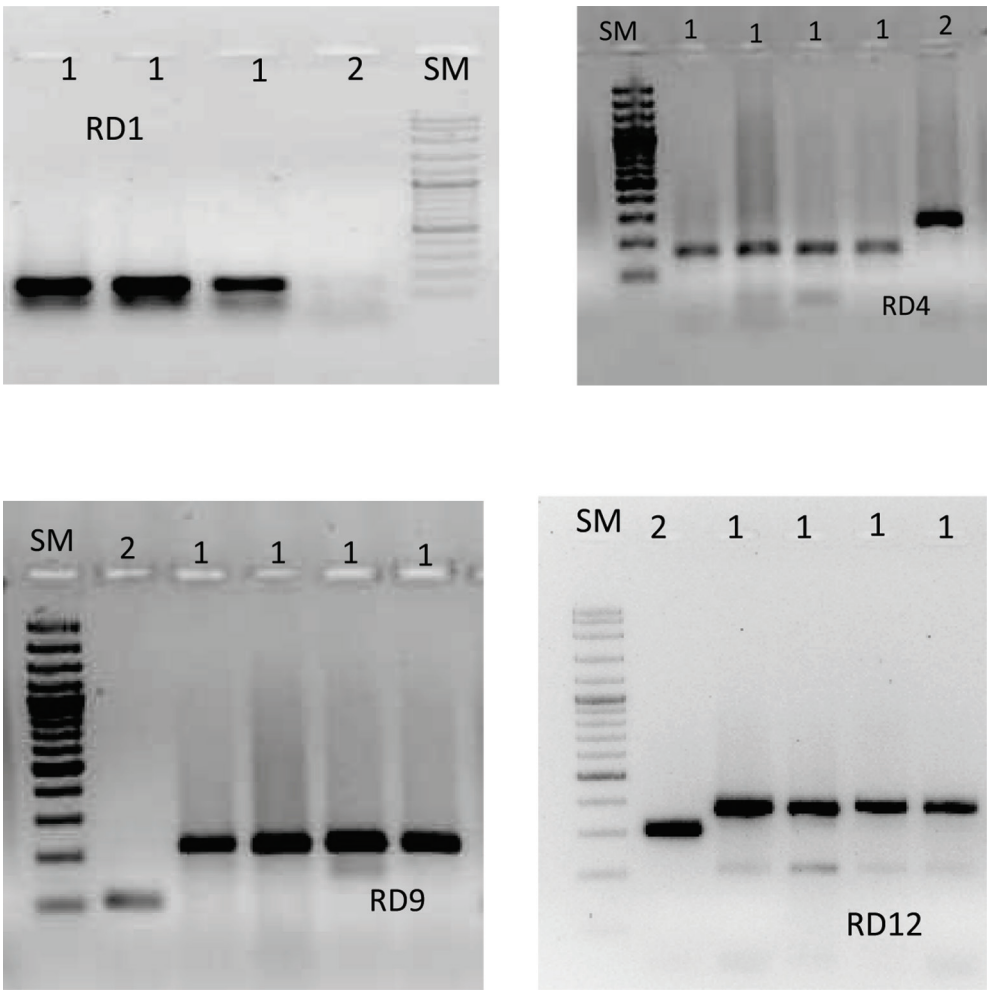
در برنامه ریشه کني سل شناسايي منابع عفونت، مسيرهاي انتقال و پيدا نمودن مخازن بسيار حائز اهميت مي‌باشد و از تمايز بين مايكوباكتريوم بويس از ساير مايكوباكتريوم‌هاي توبركلوزيس كمپلكس و همچنين تمايز سويه‌هاي مختلف مايكوباكتريوم بويس از اهميت ويژه‌اي برخوردار است. جود یا عدم وجود مایکوباکتریوم بویس در جامعه انسانی هر



شکل ۲- ستون SM سایز مارکر صد جفت بازی، ستون ۱ *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس*، ستون ۲ *مایکوباکتریوم بویس*، ستون ۳ کنترل منفی و ستون های ۴ تا ۸ باند ۲۴۵ جفت باز قطعه ژن IS6110

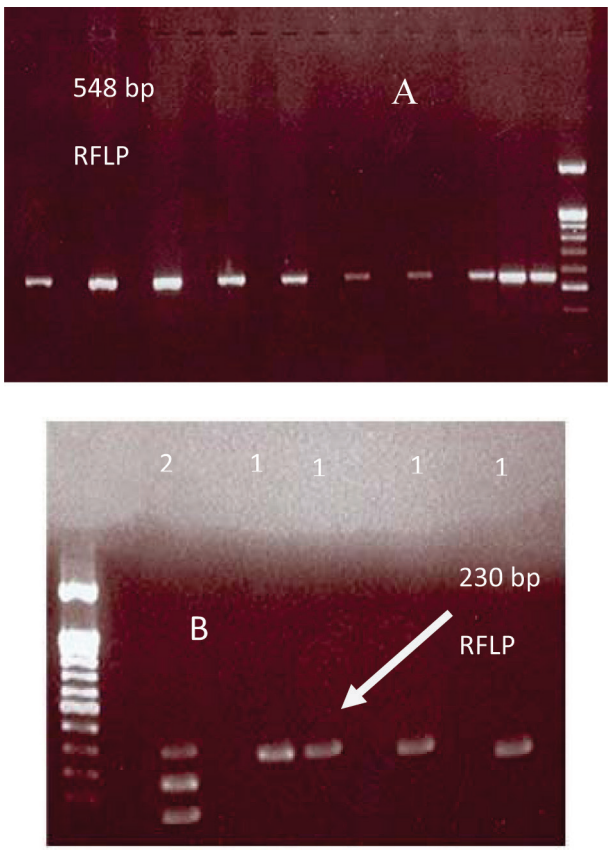
منطقه می‌تواند نشانگر بهداشت و سلامت دام آن منطقه باشد، بنابراین وجود یک روش تعیین هویت سریع، از جدایه‌های مسلولین امری ضروری می‌باشد.

در مطالعه مصوری و همکاران در سال ۲۰۰۸ نشان داده شد که روش PCR-RFLP روی ژن oxyR، افتراق سریع و دقیق میان اعضای *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* کمپلکس را ممکن می‌سازد. در این روش بعد از تکثیر ژن هدف، آنزیم برش دهنده AluI ناحیه مربوط به توالي AGCT را شناسايي و در سکانس‌هاي برش مي‌دهد که در مورد جدايه‌هاي گاوي و نمونه استاندارد *مایکوباکتریوم بویس* با توجه بر وجود چهار ناحیه AGCT در نهایت پنج قطعه به طول‌هاي ۲۳۶، ۱۴۸، ۷۹، ۵۵ و ۳۰ جفت باز به دست مي‌آيد. البته با توجه به شرايط الکتروفورزی به کار برده شده در این تحقیق، تنها سه باند ۲۳۶، ۱۴۸ و ۷۹ جفت باز در مورد *مایکوباکتریوم بویس* دیده شد. در مورد سویه‌های *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* جدا شده از بیماران به دلیل وجود گوانین در ناحیه نوکلئوتید ۲۸۵ ژن OxyR و عدم شناسايي و برش آن توسط آنزیم AGCT، چهار قطعه DNA به طول‌هاي ۲۳۶، ۲۲۷، ۵۵ و ۳۰ جفت باز ايجاد مي‌شود که با توجه به شرايط الکتروفورز به کار رفته در بررسي، تنها یک باند حدود ۲۳۰ جفت باز مشاهده شد که مربوط به هر دو قطعه ۲۳۶ و ۲۲۷ جفت باز DNA است. بنابراین، براساس مطالعات فوق و نتایج حاصل از این مطالعات، تکنیک PCR-RFLP بر روی ژن oxyR به عنوان روش مقایسه‌ای جهت ارزیابی روش RD typing در مطالعه حاضر انتخاب شد. با توجه به مطالب عنوان شده، جدایه‌های مورد بررسی در مطالعه حاضر به وسیله



شکل ۳- باندهای RD1، RD4، RD9 و RD12 در تکنیک RD typing. 1) *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* به عنوان شاهد ۲) *مایکوباکتریوم بویس* به عنوان شاهد

دو روش مذکور مایکوباکتریوم توبرکلوزیس تشخیص داده شدند (۱۰).
چات چوانگ و همکارانش در سال ۲۰۱۴، بر روی وجود یا عدم وجود ژن‌های IS۶۱۱۰, hub B, IS۱۰۸۱, oxyR و rpoB در جدایه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس که با روش کشت تائید شده بودند، مطالعه کردند. این مطالعه در مجموع بر روی ژنوم ۷۹ جدایه به دست آمده از دو بیمارستان انجام شد. تعیین هویت جدایه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس، با استفاده از تکثیر ژن‌های نامبرده به روش PCR در تشخیص سریع جدایه‌های مایکوباکتریومی به دست آمده از بیماران ریوی، در حد مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس کارآمد بوده و در مقایسه با تکنیک‌های میکروب شناسی سریع‌تر می‌باشد (۱۵).
در مطالعه حاضر، در ابتدا با استفاده از روش تکثیر ۱۶s rRNA از مایکوباکتریوم بودن جنس جدایه‌ها اطمینان حاصل گردید. با استفاده از نتایج تکثیر IS۶۱۱۰ نشان داده شد که جدایه‌های مورد مطالعه به گروه مایکوباکتریوم توبرکولوزیس کمپلکس تعلق دارند. بنابراین، نتایج حاصل از این مطالعه و نتایج مطالعه چات چوانگ در سال ۲۰۱۴، نشان دهنده این موضوع است که تکثیر قطعه ژنی IS۶۱۱۰ می‌تواند در مطالعاتی که فقط نیاز به تشخیص در حد مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس دارد، به عنوان نشانگر تشخیصی مورد استفاده قرار گیرد (۱۵).
تنوع ژنتیکی اختصاصی جدایه‌ها در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس یک عامل مهم و تاثیرگذار روی شدت بیماری، انتقال پذیری، پاسخ میزبان و ظهور مقاومت دارویی می‌باشد. چندین روش برای طبقه‌بندی جدایه‌های MTBC به خانواده‌ها و دودمان‌های متفاوت پیشنهاد شده است. در سال ۲۰۱۴ فرانسسک کول و همکارانش پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی SNP را به عنوان شاخص قوی و پایدار تنوع ژنتیکی برای بررسی فیلوژنی مطالعه کردند. آن‌ها نشان دادند فیلوژنی مبتنی بر تکنیک SNP با سیستم طبقه‌بندی بر پایه نواحی متفاوت RD سازگار می‌باشد.
وارن دریافت ژنوم مایکوباکتریوم بویس در حدود ۶۶ کیلوجفت باز از ژنوم مایکوباکتریوم توبرکلوزیس H۳۷Rv کوتاه‌تراست. ناحیه ژنی RD۴ در این باکتری حذف شده است که به عنوان شاخصی در تمایز این باکتری از دیگر اعضای مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس استفاده



شکل ۴-A) باند محصول PCR شبه ژن oxyR در *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس*، B) باند حاصل از محصول برش آنزیمی محصول PCR شبه ژن oxyR در ۱) *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* و ۲) *مایکوباکتریوم بویس*

می‌شود (۱۷).

وارن و همکاران نیز، در سال ۲۰۰۶ تکنیک Multiplex PCR را طراحی کردند که با استفاده از چهار دسته پرایمر سه‌تایی حضور یا عدم حضور لوکوس‌های RD۱، RD۴، RD۹ و RD۱۲ را مشخص می‌کند و نشان دادند که به راحتی اعضای مایکوباکتریوم توبرکلوزیس را می‌توان تعیین هویت کرد. در مطالعه حاضر نیز از پرایمرهای مطالعه وارن استفاده شد با این تفاوت که ایشان به صورت Multiplex PCR کار کردند و در این مطالعه واکنش‌های تکثیر به صورت مجزا از یکدیگر انجام شد. نتایج مطالعه حاضر، تایید کننده اختصاصیت پرایمرهای طراحی شده توسط وارن و همکارانش و توانایی این تکنیک در تعیین هویت جدایه‌های مایکوباکتریوم می‌باشد. همچنین اختصاصیت ناحیه RD۱ برای *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* نشان داده شد (۱۷).

در مطالعه حاضر، با استفاده از تکنیک RD typing، نشان داده شد که ۵۰ نمونه مورد مطالعه *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* هستند که با نتیجه تشخیص حاصل از روش های مولکولی به طور کامل همخوانی داشت. در کنار آنها از کنترل منفی، کنترل *مایکوباکتریوم بویس* استفاده شد. با توجه به عدم وجود باند در کنترل منفی، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که نمونه‌های مثبتی که *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* تشخیص داده شده، واقعی بوده و مثبت کاذب یا آلودگی در محیط وجود نداشته است. در عین این که استفاده از مایکوباکتریوم بویس در کنار نمونه‌ها قابلیت تمایز این جدایه از *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* را نشان داد.

موستوي و همکاران در سال ۲۰۰۲ چندین ناحیه (RD۱-۱۶) یافتند که در ژنوم *مایکوباکتریوم بویس* (ب ث ژ) در مقایسه با *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* H37Rv حذف شده بود، که یکی از این نواحی حذف شده (RD۱) است. تخفیف حدت اولیه *مایکوباکتریوم بویس* و در نتیجه اشتقاق *مایکوباکتریوم بویس* (ب ث ژ) را به این ناحیه حذف شده در بین تمامی سوش‌های مایکوباکتریوم بویس (ب ث ژ) نسبت دادند. با توجه به حذفی که در ژنوم *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس*، صورت گرفته، تفاوت توالی ایجاد کرده که وجود یا عدم وجود آن، تمایز دو گونه *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* و *مایکوباکتریوم بویس* را ممکن می‌سازد. نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر و مطالعات مطرح شده فوق نیز نشان داد که تفاوت توالی حاصل از حذف بعضی از نواحی RD، قطعات ژنی مناسبی جهت تعیین هویت اعضای *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* کمپلکس می‌باشد (۹). در مطالعه ارم آبادی و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان داده شد به کار گیری سیستم احراز هویت تلفیقی RV typing و RD typing که انجام آن در آزمایشگاه‌های مایکوباکتریولوژی مجهز به دستگاه ترموسایکلر امکان‌پذیر می‌باشد، می‌تواند با هزینه نسبتا کم در تشخیص دقیق و سریع عامل مایکوباکتریایی و به دنبال آن در انتخاب داروی مناسب کمک کند. مزیت تکنیک به کار رفته در مطالعه حاضر، ساده بودن آن است و نیازی به تلفیق با تکنیک دیگر ندارد (۴). در سال ۲۰۱۴ واسکونلوس و همکاران جمعیت مایکوباکتریایی جدایه‌های به دست آمده از بیماران را در ریودوژانیرو به وسیله روش‌های اسپولیگوتایپینگ و MIRU-VNTR typing بررسی کردند. آن‌ها متوجه تفاوت‌هایی در تعیین هویت جدایه‌ها به وسیله اسپولیگوتایپینگ وMIRU-VNTR typing شدند. همچنین نشان دادند استفاده از دو تکنیک فوق به صورت ترکیبی روش مناسبی در تعیین وضعیت جمعیت مایکوباکتریایی جدایه‌های به دست آمده می‌باشد (۴). بر اساس مطالعات انجام شده قبلی و مقایسه نتایج حاصل از تعیین هویت مایکوباکتریوم‌ها، دو روش PCR-RFLP و RD typing تاییدکننده نتایج یکدیگر بودند. این تحقیق اولین بررسي انجام شده در ایران جهت تشخیص سریع و کم هزینه مایکوباکتریوم بویس از سایر *مایکوباکتریوم‌هاي توبرکلوزیس* کمپلکس بود که توسط روش مولکولي RD typing انجام گرفت. استفاده وسیع از این تکنیک مي‌تواند در تشخیص به موقع بیماري به خصوص در بیماران داراي نقص سیستم ایمني به اجرا در بیاید. همچنین می‌تواند با شناسایي سریع منابع عفونت، مسیرهاي انتقال و پیدا نمودن مخازن در امر ریشه‌کني بیماري سل کمک قابل توجهي در برنامه کنترل آن نماید. همان طور که مشاهده می‌شود، مطالعات مختلفی توسط محققین در جهت ارتقاء قدرت تفکیک تکنیک‌های مولکولی صورت گرفته‌است، به لحاظ این که اکثر این مطالعات محدود به تعداد خاصی نمونه از منطقه مشخصی و شامل جدایه‌های معدودی از کمپلکس *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* بوده است و با توجه به این که هیچ کدام از این مطالعات بر اساس نمونه گیری تصادفی بر اساس جمعیت و اطلاعات کلی بیماری در جامعه نبوده، لذا توانایی کلی این تکنیک‌ها به خصوص تکنیک مطالعه حاضر در سری های مختلف، هنوز به طور کامل مشخص نشده است و بایستی بر روی نمونه‌هایی که به طور تصادفی در سطح هر منطقه مورد مطالعه قرار گیرد. علت این امر، وجود تفاوت ژنتیکی احتمالی در جدایه‌های مایکوباکتریایی پراکنده در مناطق جغرافیایی متفاوت می‌باشد. محققان ژن‌های متفاوتی را جهت طبقه بندی و تعیین هویت اعضای کمپلکس توبرکلوزیس استفاده کرده‌اند. آن‌ها با مطالعه توام ژن‌های نشان داده‌اند که تنوع ژنتیکی در بین جدایه‌های *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* کم می‌باشد، در حالی که طیف وسیعی از مشخصات ژنوتیپی علیرغم تشابه فنوتیپی در بین جدایه‌های مایکوباکتریوم بویس دیده می‌شود.

نتیجه گیری

به کمک این مطالعه می‌توان نتیجه گیری کرد تکنیک RD typing برای کنترل سریع بیماری، تعیین میزان شیوع و بروز عفونت‌های *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* و غیر توبرکلوزیس بسیار ارزشمند است. با توجه به مطالعاتی که بر روی تکنیک‌های مولکولی، جهت تعیین هویت مایکوباکتریوم انجام گرفته مشخص شده که هر تکنیک توانایی تشخیص تا سطح خاصی را ممکن می سازد، لذا استفاده از این نوع تکنیک‌ها تحت تاثیر هدف مطالعه و اهمیت سطح تشخیص می‌باشد، به طوری که حتی در صورت نیاز می‌توان از تلفیقی از تکنیک های مولکولی استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همکاری مرکز توبرکولین موسسه واکسن و سرم سازی رازی کرج جهت فراهم آوری امکانات منابع مالی این تحقیق و همچنین از پرسنل محترم که در راستای تحقق اهداف این پروژه از هیچ کوششی دریغ نکردند و از سرکار خانم مهشید ناصحی و آزمایشگاه مرجع منطقه‌ایی سل تهران که امکان دریافت نمونه‌ها را فراهم کردند کمال تشکر وقدردانی را داریم.

منابع مورد استفاده

1. Bonard, D., P. Msellati, L. Rigouts, P. combe, D. Coulibaly, I.M. Coulibaly and F. portaels. 2000. What is the meaning of repeated isolation of *Mycobacterium africanum*? International Journal of *Tuberculosis Lung Disease* 4: 1176–1180.
2. Cole, S.T., R. Brosch, J. Parkhil, T. Garnier, C. Churcher, S. Whitehead, and B.G. Barrell. 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genomesequence. *Nature*, 393: 537-544.
3. Cosivi, O., J. Grange, M. Daborn C J. 1998. Zoonotic tuberculosisdue to *Mycobacterium bovisin* developing countries. *Emerg Infection Disease* 4: 59–70.
4. Eramabadi M,Tadayon, K., N. Mosavari, R. Keshavarz, R. Banihashemi and Ghaderi. 2014. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* Complex,Using Molecular methods, *mljqoums* 7(5):9-15
5. Hermans, P., W D. van Soolingen. 1991. Insertion element IS987 from *Mycobacterium bovis* BCG is located in a hot-spot integration region for insertion elements in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *Infection Immun.*59(8): 2695-705.
6. Hesseling, A C., H S. Schaaf, W A. Hanekom, et al. 2003. Danish bacille Calmette-Guerin vaccine-induced disease in human immunode- ficiency virus-infected children. *Clinical Infection Disease* 37: 1226– 1233.
7. Huard, R., C L C. Lazzarini. 2003."PCR-based method to differentiate the subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* complex on the basis of genomic deletions." *J Clin Microbiol.* 41(4): 1637-50.
8. Kamerbeek, J., L. Schouls, A. Kolk, M. van Agterveld, D. van Soolingen. 1997. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* 35: 907-914.
9. Mostowy, S., D. Cousins, J. Brinkman, A. Aranaz, MA .Behr. 2002. Genomic deletions suggest a phylogeny for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Infection Disease*. 186(1): 74-80.
10. Mosavari, N., M. Salehi, K. Tadayon, M. Taheri, K. Soleimani. 2007. Molecular detection of *Mycobacterium bovis* from *Mycobacterium tuberculosis* in by PCR-RFLP and comparison by standard isolation, *Medical Microbiology Journal of Iran*, 2,1- pages
11. Organization WHO. Global tuberculosis report 2013.
12. Ross, B.C., K. Raios, K. Jackson, B. Dwyer. 1992 . Molecular cloning of a highly repeated DNA element from *Mycobacterium tuberculosis* and its use as an epidemiological tool. *Journal of Clinical Microbiology*. (30): 942-946
13. Salfinger, M and G.E. Pfyffer. 1994. The new diagnostic mycobacteriology laboratory. *European Journal of Clinical Mycobacteriology and Infections diseses*. 13: 961-979
14. Sharifipour, E., MJ. Nasiri, P. Farnia, M. Mozafari, S. Irani. 2014. Evaluation of Molecular Diversity of *Mycobacterium tuberculosis* Strains By Polymorphisms in RD Regions. *Journal Mycobacterium Disease* 4: 153.
15. Tchatchouang, S., A. chokote, W. Guiewi, T. G. M. M, L. K. Sidze, E. M. Tekwu, J. C. Tedom, J. P. A. Assam, and V. N. P. Beng. 2015. *Mycobacterium tuberculosis* complex identification by polymerase chain reaction from positive culture in patients from Jamot and Mbalmayo district hospitals. *African Journal of Biotechnology* .14(11), 971-978.
16. Van Embden, J., MD. Cave, JT. Crawford, J. Dale, K. Eisenach. 1993. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *Journal of clinical microbiology* 31: 406-409.
17. Warren, R., M. N. C. Gey van Pittius. 2006. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex by PCR amplification of genomic regions of difference. *International Journal Tuberclosis Lung Disease* 10(7): 818-22.
18. WHO Global tuberculosis control: key findings from the December. 2009.
19. Warren, R,. M. T. C. Victor. 2001."Patients with active tuberculosis often have different strains in the same sputum specimen.
20. *Am Journal Respir Crit Care Med*, 169(5): 610-4.