

بررسی پلی مورفیسم‌های موجود در مناطق RD در ساب‌تایپ‌های مختلف مایکوباکتریوم توبرکلوزیس

احسان شریفی پور^۱، پریسا فرنیآ^{۲*}، شیوا ایرانی^۱

(۱) دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه زیست‌شناسی، تهران، ایران
(۲) مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی، پژوهشکده سل و بیماری‌های ریوی، مرکز آموزشی، پژوهشی و درمانی سل و بیماری‌های ریوی بیمارستان دکتر مسیح دانشوری، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی، تهران، ایران

چکیده:

بیماری سل به عنوان یکی از بیماری‌های تاثیرگذار بر روی سلامت و بهداشت جهانی شناخته می‌شود. فهم شیوه انتقال و شیوع و بررسی فاکتورهای میزبان و همچنین خصوصیات و فاکتورهای باکتری مایکوباکتریوم توبرکلوزیس که می‌توانند در شیوع بیماری سل تاثیر داشته باشند برای مدیریت شیوع و کنترل و مبارزه با این بیماری بسیار حیاتی می‌باشد. در همین راستا و برای به دست آوردن این اطلاعات استفاده از تکنیک‌های مولکولی و روش‌های اپیدمیولوژی بسیار ضروری هستند. یکی از روش‌هایی که امروزه مورد مطالعات بسیار قرار گرفته، بررسی مناطق ژنی موسوم به ناحیه تفاوت (RD) می‌باشد که در این مطالعه به بررسی این مناطق می‌پردازیم.

ابتدا ۱۹۰ سویه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با روش‌های اسپولیگوتایپینگ شناسایی شدند. مقاومت دارویی این سویه‌ها مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت ۶ لوکوس RD مورد نظر از جنبه حذف (Deletion) در ژنوم این ۱۹۰ سویه با روش PCR مورد بررسی و آنالیز قرار گرفتند.

از سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با روش اسپولیگوتایپینگ، H4(127) در ۷۲ نمونه (۳۷/۵٪)، CAS در ۳۷ مورد (۲۰٪)، T1 در ۱۸ نمونه (۹/۵٪) و Beijing در ۱۱ مورد شناسایی شدند و باقی نمونه‌ها شامل ۵۲ مورد (۲۷٪) ناشناخته بودند. ۷۰٪ نمونه‌ها حساس به دارو و ۳۰٪ مقاوم بودند. در سویه‌های Beijing، لوکوس‌های RD181 و RD105 و در سویه BCG لوکوس RD1، حذف داشتند.

بررسی مناطق RD روشی ساده و سریع است. استفاده از RD1 جهت شناسایی سویه BCG و همچنین RD181 جهت شناسایی سویه Beijing مناسب می‌باشد اما RD150 به علت عدم وجود پلی مورفیسم در سویه‌های مختلف کارایی چندانی به عنوان یک روش اپیدمیولوژی ندارند. همچنین در این تحقیق مشخص شد که مقاومت دارویی ارتباطی با حذف در مناطق RD ندارد.

واژگان کلیدی: اپیدمیولوژی ملکولی، سل، اسپولیگوتایپینگ، ناحیه تفاوت

* نویسنده مسئول:

دکتر پریسا فرنیآ. مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی، پژوهشکده سل و بیماری‌های ریوی، بیمارستان دکتر مسیح دانشوری، دارآباد، نیاوران، تهران، ایران، کد پستی: ۱۹۵۶۹-۴۴۴۱۳، پست الکترونیک: pfarnia@hotmail.com

مقدمه:

بیماری سل به عنوان یکی از مهم‌ترین و خطرناک‌ترین علل مرگ و میر در جهان شناخته می‌شود که بر اساس گزارش‌ها بیش از یک سوم جمعیت جهان به این بیماری آلوده هستند و طبق گزارش سازمان بهداشت جهانی (WHO) سالانه حدود یک میلیون و چهار صد و پنجاه هزار نفر به علت ابتلا به این بیماری جان خود را از دست می‌دهند [۲،۱]. کشور ایران از نظر جغرافیائی با سه کشور پاکستان، افغانستان و عراق که طبق گزارش سازمان بهداشت جهانی (WHO) بیماری سل در آنها شیوع فراوانی دارد همسایه است [۲]. به علاوه ارتباط زیادی که ایران با کشورهایی همچون چین، بنگلادش، نپال و سریلانکا دارد احتمال ورود این بیماری به کشور را افزایش داده است [۳]. فهم شیوه انتقال و شیوع و بررسی فاکتورهای میزبان و همچنین خصوصیات و فاکتورهای باکتری مایکوباکتریوم توبرکلوزیس که می‌توانند در شیوع بیماری سل تاثیر داشته باشند برای فهم و درک هرچه بیشتر و مدیریت شیوع و کنترل و مبارزه با این بیماری بسیار حیاتی می‌باشد لذا در همین راستا و برای بدست آوردن این اطلاعات و شناسایی صحیح رویدادهایی که در طی انتقال و شیوع رخ می‌دهد استفاده از تکنیک‌های مولکولار و روش‌های اپیدمیولوژیک بسیار ضروری هستند [۴]. روش‌های اپیدمیولوژی ملکولی ابزار مناسبی جهت بررسی و آنالیز تنوع ژنتیکی و الگوی انتقال سویه‌های مختلف مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس به شمار می‌روند [۵،۶]. تاکنون روش‌های مختلفی از جمله اسپولیگوتایپینگ^۱، MIRU-VNTR^۲ و ... جهت بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت‌های مختلف این باکتری گسترش پیدا کرده است [۷،۸]. یکی دیگر از روش‌هایی که در چند سال اخیر مورد مطالعات بسیاری قرار گرفته است بررسی مناطق ژنی موسوم به «ناحیه تفاوت»^۳ یا LSP^۴ می‌باشد [۷،۸]. این مناطق در مطالعات زیادی مورد بررسی قرار گرفته‌اند و اطلاعات مختلفی در مورد

بیولوژی و تکامل مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در اختیار ما قرار می‌دهند [۹،۱۰]. بررسی مناطق RD با استفاده از روش PCR می‌تواند جهت آسان‌تر کردن مطالعات اپیدمیولوژی مورد استفاده قرار بگیرد [۹]. در واقع تنوع در سویه‌های مختلف مایکوباکتریوم توبرکلوزیس نتیجه حذف^۵ و یا حضور این مناطق در ژنوم این باکتری می‌باشد. تاکنون ۶۸ منطقه RD مورد شناسایی قرار گرفته است [۱۱،۱۲]. بعضی از مطالعات، حذف در بعضی از این مناطق، مانند RD1 را در ارتباط با پتانسیل بیماری‌زایی مایکوباکتریوم‌ها می‌دانند و همین حذف در مایکوباکتریوم بوویس BCG را عامل غیر بیماری‌زا بودن این سویه در مقایسه با سویه‌های انسانی تلقی می‌کنند [۱۰،۱۱،۱۳]. هدف از این مطالعه تعیین میزان حذف در سه منطقه RD1، RD150 و RD181 در میان سویه‌های مختلف مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و بررسی پتانسیل این روش جهت استفاده در اپیدمیولوژی ملکولی برای تعیین و تشخیص پلی‌مورفیسم، به‌ویژه در جمعیت‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس شایع در ایران می‌باشد.

مواد و روش‌ها:

جداسازی و کشت نمونه‌ها: در این تحقیق، نمونه‌های بالینی متعلق به ۱۹۰ بیمار مبتلا به سل ریوی مراجعه کننده به مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی بیمارستان مسیح دانشوری از نظر اسپولیگوتایپینگ و حذف در مناطق RD1، RD150 و RD181 مورد مطالعه و بررسی قرار گرفتند. پس از کشت نمونه‌های ارسالی بر روی محیط کشت Lowenstein Jensen (LJ)، سویه‌های مایکوباکتریوم از این محیط کشت جدا شده و سایر آزمایشات بیوشیمیایی مانند تست نیاسین و فعالیت کاتالاز و احیای نیتراژ جهت شناسایی اولیه سویه‌ها استفاده شد. سپس با تست‌های حساسیت دارویی، میزان مقاومت و حساسیت سویه‌ها به داروهای مختلف از جمله ایزونیاژید و ریفامپین و ... مورد بررسی قرار گرفت. استخراج DNA از کلنی‌های موجود بر روی محیط LJ با روش N استیل N₃N₃N₃- تری متیل امونیوم بروماید (CTAB) انجام گرفت.

¹ Spoligotyping² Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit Variable Number of Tandem Repeat (MIRU-VNTR)³ Region of Difference (RD)⁴ Large Sequence Polymorphism (LSP)⁵ Deletion

جدول ۱ - توالی پرایمرهای مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

منابع	اندازه‌ی محصول PCR	توالی پرایمرها	لوکوس‌ها
Kamerbeek et.al 1997 [14]		5'-GGT TTT GGG TCT GAC GAC-3'	DRa
		5'-CCG AGA GGG GAC GGA AAC-3'	DRb
Kanji et. al 2011 [11]	1.5 kb	ET1: 5'-AAG CGG TTG CCG CCG ACC GAC C-3'	RD1
		ET2: 5'-CTG GCT ATA TTC CTG GGC CCG G-3'	
		ET3: 5'-GAG GCG ATC TGG CGG TTT GGG G-3'	
Tsolaki et. al 2005 [9]	2.5 kb	F: 5'-TGT GGC GTG GCT CGG CAA ATA G-3'	RD150
		R: 5'-GG GAC GGC AAA CGG GTG AT-3'	
Tsolaki et. al 2005 [9]	0.7 kb	F: 5'-CGC AAC GGC CGC GGT GAA CTC T-3'	RD181
		R: 5'-CGG GCG GCT GCG GGA ACC TT-3'	

گردید. پروتکل مورد استفاده جهت این لوکوس عبارت بود از: ۹۵°C به مدت ۳ دقیقه، ۴۰ سیکل شامل ۹۴°C برای ۳۰ ثانیه، ۶۵°C به مدت ۱ دقیقه، ۷۲°C به مدت یک دقیقه و ۳۰ ثانیه و در نهایت ۷۲°C برای مدت ۱۰ دقیقه (final extension). جهت الکتروفورز از ژل ۳٪ آگارز استفاده شد. در مورد لوکوس‌های RD181 و RD150 که سایز بزرگتری نسبت به RD1 دارند از HotStarTaq kit QIAGEN استفاده گردید. حجم نهایی جهت PCR این مناطق ۲۵ µl و میزان DNA مورد استفاده در واکنش ۱۵ ng بود و از پرایمر به میزان ۱ pmol جهت این لوکوس استفاده شد و همانند RD1، ۱/۲۵ واحد از آنزیم، به آن اضافه گردید. پروتکل این واکنش عبارت بود از ۹۴°C به مدت ۵ دقیقه (جهت دناتوراسیون اولیه)، ۳۵ سیکل شامل ۹۴°C برای ۱ دقیقه، ۶۵°C به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲°C به مدت ۴ دقیقه و در نهایت مرحله final extension که ۷۲°C برای مدت ۱۰ دقیقه بود. ژل مورد استفاده نیز، ژل ۱٪ آگارز بود.

نتایج:

از ۱۹۰ بیمار مورد بررسی در این تحقیق ۱۰۷ نفر (۵۶٪) مرد و ۸۳ نفر (۴۴٪) زن بودند. پس از جمع‌آوری نمونه‌ها و انجام تست‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی نتایج از این قرار بود که از مجموع ۱۹۰ نمونه، ۳۰ نمونه (۱۶٪) سل مقاوم به چند دارو^۳ (MDR)، ۱۲ نمونه (۷٪) مقاوم به ایزونیاژید، ۸ نمونه (۴٪) مقاوم به اتامبوتول و ۵ نمونه (۳٪) مقاوم به ریفامپین تشخیص داده شدند و بقیه نمونه‌ها یعنی ۱۳۵ نمونه (۷۱٪) نیز نسبت به تمام این

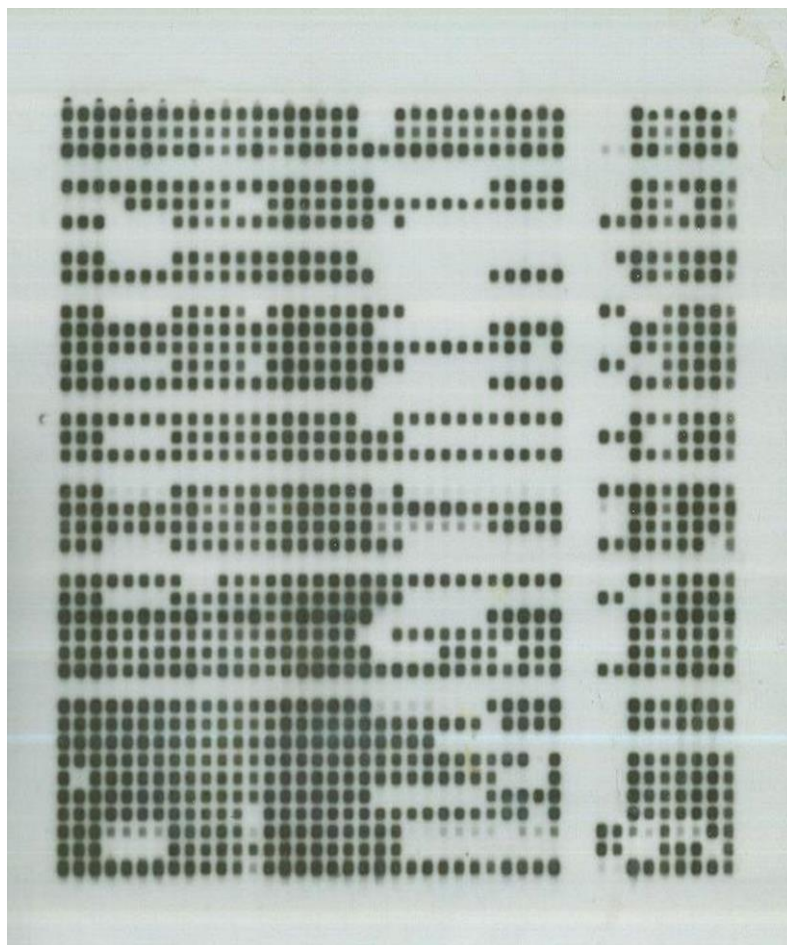
اسپولیگوتایپینگ: بر روی همه DNAهای استخراجی اسپولیگوتایپینگ انجام شد [۱۴]. اولین قدم برای این کار تکثیر قطعات (DR) Direct repeat با روش PCR بود که جهت انجام آن از پرایمرهایی که در جدول ۱ آمده است استفاده شد. سپس محصولات PCR را برای مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۹ درجه سانتی‌گراد دناتوره کرده و جهت انجام هیبریداسیون با آنزیم استرپتاویدین پراکسیداز^۱، بر روی غشای نیتروسلولز کردیم. سپس با اضافه کردن ماده لومینسانس ECL^۲ غشاء مربوطه جهت ظهور بر روی فیلم حساس رادیوگرافی قرار داده شد که نقاط سیاه موجود بر روی فیلم نشان دهنده حضور Spacerها یا نواحی فاصله‌انداز می‌باشند [۱۵]. نمونه‌ای از فیلم رادیوگرافی در شکل ۱ نشان داده شده است. در نهایت الگوی هر سویه را به صورت Octal code درآورده، با اطلاعات موجود در بانک جهانی اسپولیگوتایپینگ (SPOLDB4) مقایسه کرده و سویه‌های آن‌ها مشخص گردید [۱۶].

RD PCR: سپس DNAهای استخراجی جهت بررسی وجود یا عدم وجود حذف در مناطق RD181، RD150 و RD1 مورد بررسی قرار گرفتند. این روش روشی برپایه PCR می‌باشد که پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ آورده شده است. برای بررسی RD1 که سایز آن کوچکتر بود از کیت سیناژن استفاده شد. حجم نهایی این واکنش ۵۰ µl و میزان DNA مورد استفاده در این واکنش ۲۰ ng بود. از پرایمر به میزان ۱ pmol در این PCR استفاده شد و ۱/۲۵ واحد آنزیم Taq به آن اضافه

¹ Streptavidin peroxidase

² ElectroChemiluminescence

³ Multi Drug Resistance (MDR)



شکل ۱ - عکس نهایی اسپولیگوتایپینگ که بر روی نوار رادیولوژی ظاهر شده است و توالی‌های فاصله‌انداز در آن به خوبی مشخص می‌باشند

نمونه‌ها تعیین گردید که نتایج حاصل در جدول ۳ آمده است. با توجه به نتایج به دست آمده غالب‌ترین سویه‌ها، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس ژنوتیپ H4(127) و CAS بودند. جدول شماره ۴ نتایج حاصل از تست مقاومت آنتی‌بیوتیکی به تفکیک سویه‌های مختلف مایکوباکتریوم

داروها حساس بودند. سپس به وسیله تکنیک اسپولیگوتایپینگ، الگوی ژنتیکی هر یک از نمونه‌ها به دست آمد که در جدول شماره ۲ نشان داده شده است. با مقایسه این الگوها با اطلاعات موجود در بانک جهانی اسپولیگوتایپینگ (SPOLDB4)، سویه‌های مختلف

جدول ۲- الگوی اسپولیگوتایپ سویه‌های شناسایی شده به روش اسپولیگوتایپینگ

سویه‌های جدا شده روش اسپولیگوتایپینگ	الگوی اسپولیگوتایپ	گروه ژنتیک	تعداد	درصد
CAS		۱	۳۷	۲۰٪
Beijing		۱	۱۱	۶٪
H4		۲ و ۳	۷۲	۳۷/۵٪
T1		۲ و ۳	۱۸	۹/۵٪
نامعلوم			۵۲	۲۷٪

جدول ۳- نتایج حاصل از اسپولیگوتایپینگ برای تعیین سویه‌های نمونه‌های مورد بررسی

سویه	H4(127)	CAS	T1	Beijing	نامعلوم	جمع
تعداد	۷۲	۳۷	۱۸	۱۱	۵۲	۱۹۰
درصد	۳۷/۵٪	۲۰٪	۹/۵٪	۶٪	۲۷٪	۱۰۰٪

جدول ۴- نتایج مقاومت آنتی‌بیوتیکی به تفکیک ساب‌تایپ‌های مختلف مایکوباکتریوم توبرکلوزیس

حساسیت	RF	ETB	INH	MDR	
CAS	۷۶٪	۳٪	۹٪	۹٪	
H4(127)	۸۸٪	۴/۵٪	۳٪	۴/۵٪	
T1	۷۸/۵٪	-	۷/۵٪	۱۴٪	
Beijing	۵۵٪	-	۹٪	۳۶٪	
نامعلوم	۴۷/۵٪	۱۰/۵٪	۱۰/۵٪	۲۱٪	۱۰/۵٪

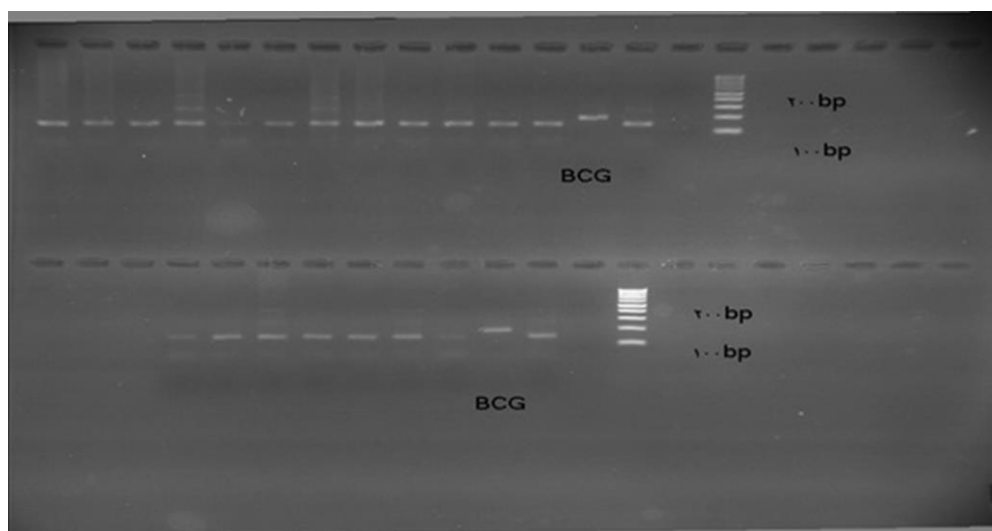
RF: Rifampin, ETB: Ethambutol, INH: Isoniazid, MDR: Multi Drug Resistant

از سویه‌ها از جمله سویه Beijing، هیچ‌گونه حذف دیده نشد. در میان ۱۱ سویه Beijing مورد مطالعه، ۵۵٪ حساس، ۳۶٪ MDR و ۹٪ نسبت به ایزونیزاید مقاوم بودند که در همه آنها اعم از مقاوم و حساس در لوکوس RD181 حذف مشاهده شد. در مورد RD1 و RD150 نیز تفاوتی در سویه‌های حساس و مقاوم از نظر حذف این مناطق مشاهده نگردید.

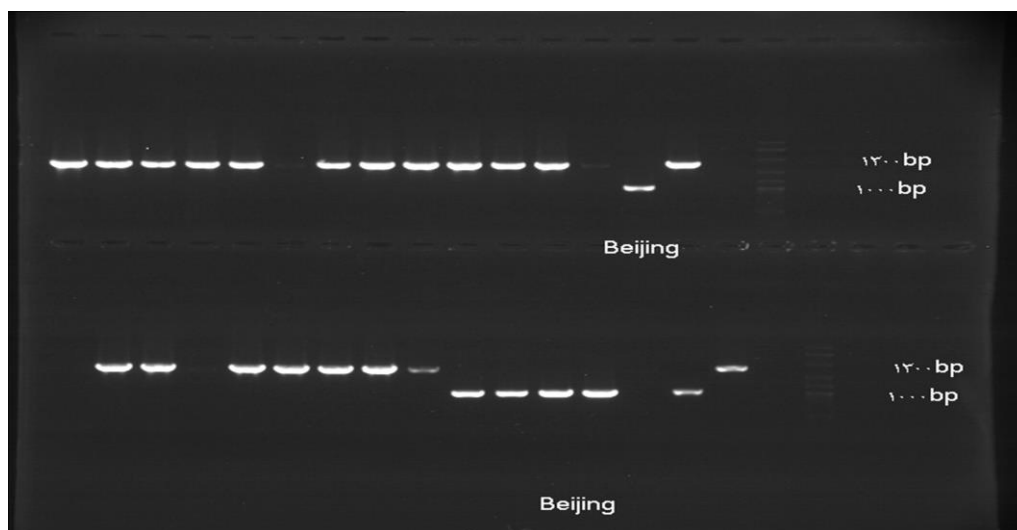
بحث:

امروزه اپیدمیولوژی بیماری سل اهمیت ویژه‌ای در کنترل بیماری سل پیدا کرده است و علاوه بر آن برای پیدا کردن ارتباط بین بیماری سل و سایر عوامل دخیل در انتشار بیماری باید منشا عفونت ردیابی شود. برای

توبرکلوزیس، که با روش اسپولیگوتایپینگ جدا شده‌اند را نشان می‌دهد. در نهایت جهت شناسایی حذف‌های رخ داده در مناطق RD1، RD150 و RD181 بر روی ۱۹۰ نمونه مورد بررسی PCR انجام شد. در هیچکدام از DNAهایی که در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت حذف در لوکوس RD1 مشاهده نشد و فقط در نمونه BCG که به عنوان کنترل نیز مورد استفاده قرار گرفت منطقه ژنی RD1 حذف شده بود که نمونه ژل آگارز مورد استفاده برای این لوکوس در شکل ۲ مشاهده می‌شود. منطقه ژنی RD181 فقط در ۱۱ نمونه Beijing مورد مطالعه، حذف داشت که در شکل ۳ قابل مشاهده است. ولی در منطقه ژنی RD150 در هیچکدام



شکل ۲- نمونه‌ای از ژل آگارز ۳٪ مورد استفاده برای تشخیص حذف موجود RD1. مشاهده می‌گردد که حذف در این ناحیه فقط در BCG دیده می‌شود. از مارکر ۱۰۰ bp برای این لوکوس استفاده شده است.



شکل ۳- نمونه‌ای از ژل آگارز ۱٪ مورد استفاده برای تشخیص حذف موجود در منطقه ژنی RD181 حذف در نمونه‌های Beijing مشهود است. همچنین باند DNA در ناحیه 1000bp مشاهده می‌شود، در صورتیکه در سایر سویه‌ها، این باند در ناحیه 1300bp قرار می‌گیرد. از مارکر 100bp برای این لوکوس استفاده شده است.

MDR-TB انجام دادند، از ۲۶۳ نمونه، ۲۰/۵٪ آنها Beijing بودند. فرنی‌ا در مطالعات خود نشان داد که ۷۶/۹٪ از سویه‌های Beijing، متعلق به بیماران افغانی بودند [۲۵]. در مطالعه دیگری هم که در سال ۲۰۰۹ توسط تاج‌الدین و همکارانش بر روی ۲۳۸ سویه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس جدا شده از بیماران ایرانی و افغانی انجام شد، ۵/۵٪ آنها به ژنوتایپ Beijing تعلق داشتند [۲۶]. در مطالعات دیگری در شیراز فراوانی این ژنوتایپ ۱۰٪ و در مشهد ۷/۱٪ گزارش شد [۲۷]. در مرحله بعد این مطالعه، حضور یا عدم حضور مناطق ژنی RD1، RD159 و RD181 مورد بررسی قرار گرفت. در مورد RD1، حذف تنها در نمونه مایکوباکتریوم بوویس BCG دیده شد که به عنوان کنترل نیز مورد استفاده قرار گرفته بود و در سویه‌های انسانی حذف مشاهده نشد. در همین زمینه در مطالعاتی که در هند [۲۸]، آلبانی [۲۹]، پاکستان [۱۱]، آفریقای جنوبی [۱۳] و هند [۳۰] انجام شد نیز همین نتایج یعنی حذف در سویه‌های مایکوباکتریوم بوویس BCG به تایید رسید. با توجه به این نتایج می‌توان بررسی‌های بیشتری در مورد ارتباط حذف در این منطقه ژنی با غیر بیماری‌زا بودن مایکوباکتریوم بوویس BCG انجام داد. همچنین می‌توان از ایجاد جهش در منطقه ژنی RD1 در سویه‌های مختلف مایکوباکتریوم توبرکلوزیس برای تولید و بهبود واکسن سل استفاده کرد [۳۱]. لوکوس دیگری که در این

مشخص کردن منشأ عفونت بیماری سل و جلوگیری از انتشار آن، شناسایی سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس می‌تواند موثر باشد [۱۷]. در دو دهه اخیر، چندین روش انگشتنگاری DNA به وجود آمده است که باعث گسترش و آشکار شدن پلی‌مورفیسم DNA در ژنوم مایکوباکتریوم توبرکلوزیس شده است [۴]. امروزه از روش‌های مبتنی بر PCR مانند Spoligotyping و MIRU-VNTR برای تمایز سابتایپ‌های مختلف مایکوباکتریوم توبرکلوزیس استفاده می‌شود [۱۸]. با وجود میزان اندک پلی‌مورفیسم DNA، تنوع ژنتیکی در سویه‌های مختلف مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در حدود ۱۰۰۰ bp در تخمین زده می‌شود [۲۰، ۱۹]. اخیراً مقایسه‌های ژنومیک، تفاوت‌هایی را در حضور یا عدم حضور مناطق RD در میان جمعیت‌های مختلف مایکوباکتریوم توبرکلوزیس آشکار کرده است [۲۰-۲۳]. ما در این مطالعه، ابتدا نمونه‌های مورد بررسی را از نظر مقاومت آنتی‌بیوتیکی بررسی کرده و سپس با روش اسپولیگوتایپینگ سویه نمونه‌های مورد بررسی را تعیین کردیم که سویه H4(127) شایع‌ترین سویه بود. در همین زمینه در سال ۲۰۰۶ در مطالعه‌ای که توسط ولایتی و همکارانش انجام شد خانواده EAI شایع‌ترین ژنوتایپ گزارش شده بود [۲۴]. در بررسی‌های ما سویه Beijing، ۶٪ نمونه را تشکیل می‌داد. در مطالعه‌ای که فرنی‌ا و همکارانش در سال ۲۰۰۶ بر روی سویه‌های

مطالعه مورد بررسی قرار گرفت RD181 بود که حذف آن تنها در ۱۱ نمونه Beijing مشاهده گردید و در سایر سویه‌ها هیچ‌گونه حذفی دیده نشد. در مطالعات مشابه در این زمینه، نتایج به دست آمده در چین تاییه [۳۲]، میانمار [۳۳] و پاکستان [۱۱] نیز تایید کننده نتایجی است که در این مطالعه به دست آمده است. همچنین در مطالعه Tsolaki و همکارانش در سال ۲۰۰۵ [۹]، نتایج متغیری به دست آمد و به غیر از دو ساب‌تایپ در سایر ساب‌تایپهای Beijing، حذف در ناحیه RD181 گزارش شد. ژنوتایپ Beijing، اولین بار در سویه‌های بدست آمده از منطقه پکن توسط روش RFLP-IS6110 شناسایی شد و علت نامگذاری این خانواده تحت عنوان Beijing، تراکم بالای آن در منطقه پکن می‌باشد [۳۴]. برآورد شده است که بیش از یک چهارم موارد سل در جهان به وسیله این ژنوتایپ ایجاد می‌شود. از طرف دیگر، ارتباط این سویه با مقاومت چند دارویی و همچنین توانایی تکثیر سریع داخل ماکروفاژهای انسان، برنامه‌های کنترل سل را در دنیا تهدید می‌کند. لذا روشی سریع و ساده برای تشخیص و تمایز ایزوله‌های خانواده Beijing در مناطقی که سل همه‌گیر است مورد نیاز می‌باشد [۲۶]. با توجه به نتایج بدست آمده در مورد منطقه ژنی RD181 و تایید تقریبی آن توسط سایر مطالعات صورت گرفته، می‌توان استفاده از این لوکوس را روشی مفید جهت تشخیص سویه‌های Beijing عنوان کرد که روشی سریع‌تر، ساده‌تر و ارزان‌تر نسبت به سایر روش‌هاست [۱۳]. یکی دیگر از لوکوس‌های مورد بررسی در این مطالعه RD150 بود که در هیچ یک از سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، حذف مشاهده نشد. در همین زمینه در مطالعه‌ای که Tsolaki و همکارانش در سال ۲۰۰۵ انجام دادند نتایج متغیری حاصل شد ولی در اکثر قریب به اتفاق سویه‌ها از جمله سویه Beijing، حذف گزارش نکردند [۹] که با توجه به این موضوع می‌توان نتیجه گرفت که این منطقه ژنی RD150 برای مطالعات اپیدمیولوژی ملکولی زیاد مناسب نیستند.

نتیجه‌گیری:

در نهایت می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از این روش یعنی بررسی حذف در مناطق RD مختلف و گسترش مطالعات روی این مناطق ژنی می‌تواند ما را در فهم بهتر

تکامل و بیماری‌زایی در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس یاری نماید. با توجه به این که این روش، روشی مبتنی بر PCR است می‌تواند به عنوان روشی ساده و سریع و ارزان نسبت به سایر روش‌های مرسوم مورد استفاده قرار بگیرد. همچنین با توجه به عدم تفاوت در حذف در مناطق RD مورد بررسی در این تحقیق در سویه‌های مقاوم و حساس به داروهای ضد سل، عدم ارتباط بین مقاومت دارویی با حذف در مناطق RD قابل مشاهده است.

تقدیر و تشکر:

بدین‌وسیله از مدیریت و پرسنل مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی واقع در بیمارستان مسیح دانشوری تهران که در این مدت کمال همکاری را جهت انجام این طرح مبذول داشتند، تشکر می‌گردد.

منابع:

- 1) Dye C, Scheele S, Dolin P, Pathania V, Raviglione MC. Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project. JAMA : the journal of the American Medical Association. 1999;282(7):677-686.
- 2) World Health Organization (WHO). Global Tuberculosis Report. http://www.who.int/tb/publications/global_report/2012/en/index.html.
- 3) Rohani M, Farnia P, Nasab MN, Moniri R, Torfeh M, Amiri MM. Beijing genotype and other predominant Mycobacterium tuberculosis spoligotypes observed in Mashhad city, Iran. Indian journal of medical microbiology. 2009;27(4):306-310.
- 4) Bryant JM, Schurch AC, van Deutekom H, et al. Inferring patient to patient transmission of Mycobacterium tuberculosis from whole genome sequencing data. BMC infectious diseases. 2013;13(1):110.
- 5) Aleksic E, Merker M, Cox H, et al. First molecular epidemiology study of Mycobacterium tuberculosis in Kiribati. PLoS one. 2013;8(1):e55423.
- 6) Comas I, Gagneux S. The past and future of tuberculosis research. PLoS pathogens. 2009;5(10):e1000600.
- 7) Wan K, Liu J, Hauck Y, et al. Investigation on Mycobacterium tuberculosis diversity in China and the origin of the Beijing clade. PLoS one. 2011;6(12):e29190.
- 8) Supply P, Allix C, Lesjean S, et al. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-

- Journal of clinical microbiology. 1993;31(9):2446-2450.
- 18) Han H, Wang F, Xiao Y, et al. Utility of mycobacterial interspersed repetitive unit typing for differentiating Mycobacterium tuberculosis isolates in Wuhan, China. Journal of medical microbiology. 2007;56(Pt 9):1219-1223.
 - 19) Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE, et al. Restricted structural gene polymorphism in the Mycobacterium tuberculosis complex indicates evolutionarily recent global dissemination. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1997;94(18):9869-9874.
 - 20) Rao KR, Kauser F, Srinivas S, et al. Analysis of genomic downsizing on the basis of region-of-difference polymorphism profiling of Mycobacterium tuberculosis patient isolates reveals geographic partitioning. Journal of clinical microbiology. 2005;43(12):5978-5982.
 - 21) Behr MA, Wilson MA, Gill WP, et al. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. Science. 1999;284(5419):1520-1523.
 - 22) Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, et al. A new evolutionary scenario for the Mycobacterium tuberculosis complex. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2002;99(6):3684-3689.
 - 23) Gordon SV, Brosch R, Billault A, Garnier T, Eiglmeier K, Cole ST. Identification of variable regions in the genomes of tubercle bacilli using bacterial artificial chromosome arrays. Molecular microbiology. 1999;32(3):643-655.
 - 24) Velayati AA, Farnia P, Mirsaeidi M, Reza Masjedi M. The most prevalent Mycobacterium tuberculosis superfamilies among Iranian and Afghan TB cases. Scandinavian journal of infectious diseases. 2006;38(6-7):463-468.
 - 25) Farnia P, Masjedi MR, Mirsaeidi M, et al. Prevalence of Haarlem I and Beijing types of Mycobacterium tuberculosis strains in Iranian and Afghan MDR-TB patients. The Journal of infection. 2006;53(5):331-336.
 - 26) Tajeddin E, Farnia P, Kargar M, Noroozi J, Masjed M, Velayati A. identification of mycobacterium tuberculosis beijing genotype using three different molecular methods. journal of semnan university of medical sciences. 2009;11(1).
 - 27) Rohani M, Farnia P, Naderinasab M, Sadeghian A, Khajeh KaramAldini M, Moniri R. frequency of beijing genotype in mycobacterium tuberculosis strain isolated variable-number tandem repeat typing of Mycobacterium tuberculosis. Journal of clinical microbiology. 2006;44(12):4498-4510.
 - 9) Tsolaki AG, Gagneux S, Pym AS, et al. Genomic deletions classify the Beijing/W strains as a distinct genetic lineage of Mycobacterium tuberculosis. Journal of clinical microbiology. 2005;43(7):3185-3191.
 - 10) Tsolaki AG, Hirsh AE, DeRiemer K, et al. Functional and evolutionary genomics of Mycobacterium tuberculosis: insights from genomic deletions in 100 strains. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2004;101(14):4865-4870.
 - 11) Kanji A, Hasan Z, Tanveer M, Laiq R, Hasan R. Occurrence of RD149 and RD152 deletions in Mycobacterium tuberculosis strains from Pakistan. Journal of infection in developing countries. 2011;5(2):106-113.
 - 12) Alland D, Lacher DW, Hazbon MH, et al. Role of large sequence polymorphisms (LSPs) in generating genomic diversity among clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis and the utility of LSPs in phylogenetic analysis. Journal of clinical microbiology. 2007;45(1):39-46.
 - 13) Warren RM, Gey van Pittius NC, Barnard M, et al. Differentiation of Mycobacterium tuberculosis complex by PCR amplification of genomic regions of difference. The international journal of tuberculosis and lung disease: the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease. 2006;10(7):818-822.
 - 14) Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of Mycobacterium tuberculosis for diagnosis and epidemiology. Journal of clinical microbiology. 1997;35(4):907-914.
 - 15) Farnia P, Mohammadi F, Masjedi MR, et al. Evaluation of tuberculosis transmission in Tehran: using RFLP and spoligotyping methods. The Journal of infection. 2004;49(2):94-101.
 - 16) Dale JW, Brittain D, Cataldi AA, et al. Spacer oligonucleotide typing of bacteria of the Mycobacterium tuberculosis complex: recommendations for standardised nomenclature. The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease. 2001;5(3):216-219.
 - 17) Chevrel-Dellagi D, Abderrahman A, Haltiti R, Koubaji H, Gicquel B, Dellagi K. Large-scale DNA fingerprinting of Mycobacterium tuberculosis strains as a tool for epidemiological studies of tuberculosis.

- from tuberculosis patients in city of mashhad. Journal of Mazandaran University of Medical Science. 2007;17(60):79-86.
- 28) Soman S, Joseph BV, Sarojini S, Kumar RA, Katoch VM, Mundayoor S. Presence of region of difference 1 among clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis from India. Journal of clinical microbiology. 2007;45(10):3480-3481.
- 29) Parsons LM, Brosch R, Cole ST, et al. Rapid and simple approach for identification of Mycobacterium tuberculosis complex isolates by PCR-based genomic deletion analysis. Journal of clinical microbiology. 2002;40(7):2339-2345.
- 30) Parkash O, Singh BP, Pai M. Regions of differences encoded antigens as targets for immunodiagnosis of tuberculosis in humans. Scandinavian journal of immunology. 2009;70(4):345-357.
- 31) Lewis KN, Liao R, Guinn KM, et al. Deletion of RD1 from Mycobacterium tuberculosis mimics bacille Calmette-Guerin attenuation. The Journal of infectious diseases. 2003;187(1):117-123.
- 32) Dou HY, Tseng FC, Lin CW, et al. Molecular epidemiology and evolutionary genetics of Mycobacterium tuberculosis in Taipei. BMC infectious diseases. 2008;8:170.
- 33) Stavrum R, Valvatne H, Bo TH, et al. Genomic diversity among Beijing and non-Beijing Mycobacterium tuberculosis isolates from Myanmar. PloS one. 2008;3(4):e1973.
- 34) Chin PJ, Chiu CC, Jou R. Identification of Beijing lineage Mycobacterium tuberculosis with combined mycobacterial interspersed repetitive unit loci 26, 31, and ETR-A. Journal of clinical microbiology. 2007;45(3):1022-1023.

Investigation on the Polymorphisms of the RD's Region in *Mycobacterium Tuberculosis* Subtypes

Ehsan Sharifipour¹, Parisa Farnia^{2*}, Shiva Irani¹

- 1) Islamic Azad University, Science and Research Branch, Department of Biology, Tehran, Iran.
- 2) Mycobacteriology Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Science, Tehran, Iran.

Abstract:

Tuberculosis epidemiology is valuable for control of TB by understanding the transmission dynamics. A potential molecular epidemiology method to distinguish the origins of *Mycobacterium tuberculosis* is region of differences (RDs) polymorphisms. Worldwide, 68 RDs have been specified, so far. By studying deletion and polymorphisms in the RD regions of RD1, RD150 and RD181, this study focused on the molecular diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in Iran for the first time. One hundred ninety *Mycobacterium tuberculosis* strains were isolated from patient's clinical samples in Mycobacteriology Research Center (MRC). DNA was extracted and spoligotyping was performed by using DR region PCR. The spoligotyping patterns were obtained from SPOLDB4 database. Drug susceptibility tests were performed for all isolates and finally, three regions of RD1, RD150 and RD181 loci were amplified by PCR. Out of 190 *M. Tuberculosis* strains, 70% of isolates were susceptible to Isoniazid, Rifampin and Etambutol drugs and the remaining (30%) were drug resistant. The spoligotyping patterns demonstrated H4 (127) and CAS families were more prevalent than other families by 37.5% and 20% respectively. Other prevalent families were T1 (9.5%), Beijing (11%) and unknown families (27%). The RD181 loci had deletion in Beijing strains, and RD1 showed deletion in BCG strains. The RD150 loci showed deletion in none of the strains. The RD1 and RD181 are appropriate to identify BCG and Beijing strains respectively. Whereas, RD150 loci is not efficient to show polymorphisms in various strains. As a result RD1 and RD181 polymorphism detection can be used effectively for molecular epidemiology studies to determine ongoing transmission clusters.

Keywords: Molecular Epidemiology, Tuberculosis, Region of Difference, Spoligotyping.

* Corresponding Author:

Parisa Farnia, PhD. Mycobacteriology Research Center (MRC), PO Box 19575-154, Tehran, Iran. Email: pfarnia@hotmail.com