مقاله اصلی

نشر، سال ۳، شماره ۱، بهار ۱۳۹۵، صفحات ۳۱ تا ۴۰

تعیین هویت مولکولی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس‌های جدا شده از مسلولین استان خراسان رضوی

مرجان جلالی‌مهر[۱*]، نادر مصوری[۲]، کیومرث امینی[۳]

۱) دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات ساوه، ساوه، ایران

۲) آزمایشگاه رفرانس مایکوباکتریوم بیماریزای دام، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج (تات)، کرج، ایران

۳) گروه میکروب شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه، ساوه، ایران

چکیده:

سل، بیماری زئونوزی است که از دیرباز شناسایی شده و هنوز به عنوان یکی از مهم‌ترین بیماری‌های تهدید کننده مرگ خودنمایی می‌نماید. با وجود همه پیشرفت‌هایی که در زمینه درمان این بیماری حاصل شده است، سازمان بهداشت جهانی در سال ۱۹۹۳ از آن به عنوان بیماری با اولویت نخست مبارزه یاد نمود. در حال حاضر در بین عوامل عفونی سل دومین علت مرگ و میر به تنهایی است. از این رو برای درمان موفق بیماری، تعیین هویت گونه‌های کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. هدف از این پژوهش شناسایی ملکولی گونه‌های مایکوباکتریایی در جدایه‌های مسلولین استان خراسان رضوی که به آزمایشگاه رفرانس سل موسسه رازی ارسال شده‌اند، می‌باشد.

امروزه از روش‌های مختلف مولکولی به عنوان ابزار مفید و سریعی برای شناسایی جدایه‌ها استفاده می‌شود. در این پژوهش، به منظور تشخیص هویت، ابتدا آزمون PCR بر روی ژن 16S rRNA تعداد ۱۰۰ جدایه انجام شد و مشخص گردید که جدایه‌ها به جنس مایکوباکتریوم تعلق دارند. سپس با آزمون تکمیلی IS6110 تعلق تمامی جدایه‌ها به مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس به اثبات رسید. همچنین برای افتراق میان اعضای کمپلکس از روش RD Typing استفاده شد و با استفاده از این روش گونه اعضای کمپلکس مشخص گردیدند.

با استفاده از تعیین هویت مولکولی نمونه‌های ارسالی از استان خراسان رضوی مشخص گردید که تمامی جدایه‌ها مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می‌باشند. نتایج فوق نشان داد که مسلولین استان مورد آزمایش، به مایکوباکتریوم بویس و دیگر اعضای کمپلکس آلوده نبودند. این موضوع یا بدلیل استفاده گسترده از شیر پاستوریزه و عدم استفاده از شیر آلوده به مایکوباکتریوم بویس و یا بدلیل برنامه منظم کنترل و ریشه کنی سل در این شهر می‌باشد. البته لازم به ذکر است این مطالعه برروی تنها یکصد عدد از جدایه‌های افراد مسلول صورت گرفت و برای بررسی بیشتر به حجم بالاتری از جدایه‌هایی این استان احتیاج است.

کلمات کلیدی: مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، RD Typing، 16S rRNA

* **نویسنده مسئول:**

مرجان جلالی‌مهر، کارشناس ارشد میکروب‌شناسی. دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات ساوه، پست الکترونیک: mjjalalimehr@yahoo.com

مقدمه:

علیرغم حدود یک قرن تلاش در جهت کنترل و پیشگیری از بیماری سل[1] (TB)، این بیماری هنوز یکی از مهم‌ترین بیماری‌های عفونی و یکی از شایع‌ترین علل مرگ و میر در دنیا، خصوصا در کشورهای در حال توسعه می باشد [۱]. طبق آخرین آمار سازمان جهانی بهداشت[2] (WHO) در سال ۲۰۱۴ میلادی، ۹ میلیون مورد جدید ابتلا به سل اتفاق افتاده و ۱/۵ میلیون نفر بر اثر ابتلا به این بیماری جان خود را از دست داده‌اند [۲]. عفونت همزمان با HIV به عنوان یک عامل مهم در ظهور مجدد[3] سل و ظهور سویه‌های مقاوم به چند دارو[4] (MDR-TB) مشکلات فراوانی را ایجاد کرده‌اند و این مشکلات با پیدایش سویه‌هایی با مقاومت گسترده[5] (XDR-TB) پیچیده‌تر هم شده است [۳]. از طرفی بیش از ۸۰ درصد افراد مبتلا به سل جهان در ۲۲ کشور در حال توسعه زندگی می‌کنند که افغانستان و پاکستان به عنوان همسایگان شرقی ایران در این گروه قرار دارند. لذا با توجه به ماهیت عفونی این بیماری و امکان انتشار ساده این میکروارگانیسم از طریق دستگاه تنفس از فردی به فرد دیگر، تشخیص سریع و به موقع آن در راستای کنترل این بیماری در کشور بسیار حائز اهمیت است [۴]. در حال حاضر تشخیص این بیماری به واسطه اسمیر و کشت در محیط لون‌اشتاین-جانسون[6] (LJ) در آزمایشگاه‌های مایکوباکتریولوژی به راحتی قابل انجام است. با این وجود، یکی از مشکلات مهم و اساسی در مسیر تشخیص، کنترل و درمان بیماری‌های حاصل از خانواده مایکوباکتریوم، افتراق گونه‌ها و تعیین هویت سریع آنها می‌باشد که این امر به صورت سنتی بر اساس خصوصیات فنوتیپی از قبیل مورفولوژی کلنی، سرعت رشد، تست‌های بیوشیمیایی مانند احیای نیترات، تجمع نیاسین، مقاومت به تیوفن کربوکسیلیک اسید هیدرازید[7] (TCH) و پیرازین آمید[8] انجام می گیرد که بدلیل هزینه بالا، وقت‌گیر بودن، مشکل بودن تفسیر و عدم وجود امکانات ویژه، غالبا در همه آزمایشگاه ها قابل انجام نیستند [۶،۵]. به همین منظور، دستیابی به روش‌های جایگزین، ساده‌تر، دقیق‌تر و ارزان‌تر جهت تشخیص افتراقی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس[9] بسیار مهم و حائز اهمیت است. در مجموع، روش‌های بیولوژی مولکولی در آزمایشگاه‌های مایکوباکتریولوژی شامل روش های تعیین هویت مولکولی مایکوباکتریوم‌ها در سطح جنس و گونه و همچنین روش‌های ژنوتایپینگ[10] و یا انگشت نگاری ژنتیکی است که در سطح سویه صورت می گیرند. روش‌های جدید بر اساس PCR یکی از کاربردی ترین و ساده‌ترین روش‌های مولکولی برای تعیین هویت مایکوباکتریوم‌ها است. به واسطه‌ی تعیین توالی کامل ژنوم تعداد بسیار زیادی از مایکوباکتریوم‌ها و افزایش اطلاعات موجود در ژنوم این باکتری‌ها، مارکرهای[11] ژنتیکی بیشتری به‌منظور تشخیص آن‌ها شناخته شده‌اند که توالی 16S rRNA یکی از مهم‌ترین آنها است [۷]. این ناحیه ژنتیکی یکی از بخش‌های محافظت شده ژنوم مایکوباکتریوم‌ها است که از آن در تعیین هویت جنس و گونه باکتری‌ها استفاده می‌گردد. توالی 16S rRNA در جنس مایکوباکتریوم و همچنین سکانس IS 6110 در تمامی اعضای مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس شامل گونه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس[12]، مایکوباکتریوم بویس[13]، مایکوباکتریوم آفریکانوم[14]، مایکوباکتریوم میکروتی[15]، مایکوباکتریوم کانتی[16]، مایکوباکتریوم کاپره[17]، مایکوباکتریوم پنی‌پدی[18]، مایکوباکتریوم سوریکاتا[19] و مایکوباکتریوم مونگی[20] بعنوان عوامل اصلی ایجادکننده توبرکلوزیس در انسان و حیوانات یکسان بوده و با بقیه مایکوباکتریوم‌ها تفاوت دارد [۸]. از طرفی بعد از شناسایی نواحی ژنتیکی خاص حذف شده در ژنوم

[1] Tuberculosis
[2] World Health Organization
[3] Reactivation
[4] Multi-drug resistant TB (MDR-TB)
[5] Extensively drug resistant TB (XDR-TB)
[6] Löwenstein–Jensen medium
[7] Thiophene carboxylic acid hydrazide
[8] Pyrazine amide

[9] Mycobacterium Tuberculosis Complex
[10] Genotyping
[11] Markers
[12] Mycobacterium tuberculosis
[13] Mycobacterium bovis
[14] Mycobacterium africanum
[15] Mycobacterium microti
[16] Mycobacterium canetti
[17] Mycobacterium caprae
[18] Mycobacterium pinnipedii
[19] Mycobacterium suricattae
[20] Mycobacterium mungi

مایکوباکتریوم‌ها - بنام نواحی تفاوت‌ها[1] (RD) - مشخص شد که وجود و یا فقدان این نواحی ژنتیکی از نظر تکاملی معنادار و هدفمند می‌باشد که بر پایه‌ی آن می‌توان سیر تکاملی پیدایش گونه‌های موجود در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس را مشخص نمود. بر همین اساس در سال ۲۰۰۶ Warren و همکاران یک برنامه تشخیصی مبتنی بر PCR را ابداع کردند و با استفاده از چهار لوکوس RD1، RD4، RD9 و RD12 امکان تشخیص افتراقی میان کلیه اعضای مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس را فراهم آوردند [۹]. در مطالعه حاضر، تعیین هویت ۱۰۰ جدایه مایکوباکتریومی جمع-آوری شده از مسلولین استان خراسان رضوی با استفاده از PCR و تکثیر ژن16S rRNA و همچنین روش RD typing انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها:

نمونه گیری و کشت:

نمونه خلط ۱۰۰ بیمار اسمیر مثبت در فاصله زمانی ۱۳۹۴ تا ۱۳۹۵ از مسلولین استان خراسان رضوی جمع-آوری و به آزمایشگاه مایکوباکتریولوژی موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی حصارک کرج ارسال شدند. پس از هضم و آلودگی‌زدایی به روش پتروف[2] [۱۰] یک دهم میلی لیتر از مایع بالایی سوسپانسیون از کلیه نمونه‌ها برداشته و بر روی دو محیط کشت جامد لون-اشتاین-جانسون گلیسیرینه و پیروات‌دار تلقیح گردید. محیط‌های کشت مدت ۸ تا ۱۲ هفته در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری و در هفته اول به صورت روزانه و پس از آن به صورت هفتگی از نظر رشد باکتری و یا بروز آلودگی احتمالی بررسی شدند.

استخراج DNA:

برای استخراج ژنوم باکتری از روش جوشاندن (Boiling) استفاده شد. به طور خلاصه از کشت تازه باکتری بر روی محیط جامد لون‌اشتاین-جانسون به - میزان یک تا دو لوپ برداشت و به یک میکروتیوب حاوی ۴۰۰ میکرولیتر بافر TE (1x) انتقال داده شد. سپس میکروتیوب در بن ماری محتوی آب در حال جوش با دمای ۹۷ °C به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد تا باکتری غیرفعال گردد. پس از خروج میکروتیوب از بن‌ماری به مدت ۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه نگهداری و پس از خنک شدن در دمای اتاق به مدت ۵ دقیقه در g۱۲۰۰ سانتریفیوژ گردید. مایع فوقانی حاوی ژنوم باکتری برداشت و به یک میکروتیوب جدید انتقال داده شد و سپس سوسپانسیون حاصله تا هنگام انجام آزمون‌های مطالعه در کوتاه مدت در دمای ۴°C و در صورت نیاز به نگهداری برای چند ماه در دمای ۲۰°C- نگهداری گردید.

شناسایی مولکولی جنس مایکوباکتریوم بوسیله PCR-16S rRNA:

برای شناسایی مولکولی جنس مایکوباکتریوم از واکنش PCR مبتنی بر تکثیر قطعه‌ای به‌طول ۵۴۳ bp با روش معرفی شده توسط Huard استفاده شد [۱۱]. برای انجام PCR از مخلوط تجاری آماده مصرف(Ampliquon (Ampliquor, Denmark محتوی تمام اجزای مورد نیاز برای PCR، بجز پرایمر و نمونه DNA باکتری استفاده گردید. بنابراین ۶ میکرولیتر مخلوط آماده به مصرف PCR، ۰/۴ میکرولیتر از هر پرایمر (غلظت ۵ پیکومول در هر میکرولیتر)، ۲ میکرولیتر از DNA نمونه و ۱/۲۵ میکرولیتر آب مقطر مناسب PCR مجموعا به حجم ۱۲ میکرولیتر جهت انجام واکنش سکانس پرایمرها و شرایط PCR مورد استفاده در این تست به ترتیب در جداول ۱ و ۲ آمده است.

شناسایی مولکولی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس از انواع غیرسلی بوسیله PCR-IS6110:

برای شناسایی مولکولی ایزوله‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس از انواع غیر سلی، واکنش PCR مبتنی بر تکثیر قطعه‌ای به طول ۲۴۵ bp با روش معرفی شده توسط McHugh استفاده شد [۱۲]. در این واکنش نیز برای انجام PCR از مخلوط تجاری آماده مصرف Ampliquon استفاده شد. سکانس پرایمرهای مورد استفاده در این بخش شامل دو پرایمر INS1 و INS2 و شرایط PCR مورد استفاده در این تست به ترتیب در جداول ۱ و ۲ آمده است.

[1] Region of Differences
[2] Petrov

جدول ۱ - پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

Target genes		Primers	Annealing (C°)	Amplicon size (bp)	Ref
16S Rrna	F R	ACGGTGGGTACTAGGTGTGGGTTTC TCTGCGATTACTAGCGACTCCGACTTCA	۶۲	۵۴۳	(۱۱)
IS6110	F R	CCTGCGAGCGTAGGCGTCGG CTCGTCCAGCGCCGC	۶۸	۱۲۳	(۱۲)
RD1	F INT R	AAGCGGTTGCCGCCGACCGACC CTGGCTATATTCCTGGGCCCGG GAGGCGATCTGGCGGTTTGGGG	۶۲	۱۴۶	(۹)
RD4	F INT R	ATGTGCGAGCTGAGCGATG TGTACTATGCTGACCCATGCG AAAGGAGCACCATCGTCCAC	۶۲	۱۷۲	(۹)
RD9	F INT R	CAAGTTGCCGTTTCGAGCC CAATGTTTGTTGCGCTGC GCTACCCTCGACCAAGTGTT	۶۲	۲۳۵	(۹)
RD12	F INT R	GGGAGCCCAGCATTTACCTC GTGTTGCGGGAATTACTCGG AGCAGGAGCGGTTGGATATTC	۶۲	۳۶۹	(۹)

افتراق اعضای مختلف کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بوسیله RD-Typing:

برای شناسایی گونه ایزوله‌های مختلف در کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از روش PCR ابداع شده توسط Warren و همکاران با اندکی تغییر استفاده شد [۱۳،۹]. چهار PCR جداگانه شامل RD1، RD4، RD9 و RD12 بوسیله پرایمرهای اشاره شده در جدول ۱ جهت افتراق اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس انجام گردید. واکنش‌های PCR به‌گونه‌ای تنظیم گردیدند که حجم نهایی هر واکنش در سطح µl ۱۶ باشند. مقادیر ثابت اجزاء عمومی واکنش‌ها عبارت بودند از: µl ۱/۲۵ از محلول بافرPCR فاقد MgCl2، µl ۰/۲۵ از محلول آماده مصرف dNTPs محتوی هر چهار نوکلئوتید (به غلظت کلی mM ۱۰ و غلظت انفرادی هر نوکلئوتید حدود mM ۲/۵)، µl ۰/۰۶۲۵ آنزیم Taq polymerase (معادل U ۰/۳۱۲۵)، مقادیر متفاوتی از محلول MgCl2 (از محلول‌های غلیظ mM ۲۵ و یا mM ۵۰) و مقادیر متفاوتی از محلول مجزای پرایمرها، µl ۳ از نمونه DNA و بالاخره مقدار کافی از آب مقطر مناسب برای مولکولار بیولوژی جهت تنظیم حجم نهائی هر واکنش (جدول ۲). جهت انجام واکنش این اجزاء در مورد هر نمونه DNA مربوط به یک سویه یا جدایه از یک میکروتیوب PCR مجزا به حجم ml ۰/۲ استفاده گردید. در عمل به منظور تسهیل در تهیه محلول‌ها و تسریع در زمان کار واکنش‌های PCR، محلول Master mix حاوی تمام اقلام مورد نیاز به جز نمونه‌های DNA در میکروتیوب‌های بزرگتر به حجم ۱/۵ میلی‌لیتر آماده و سپس به میزان µl ۹/۵ در لوله-های PCR به حجم ۰/۲ میلی‌لیتر از قبل شماره‌گذاری شده، تقسیم گردیدند و نمونه‌های DNA در آخرین مرحله به محتویات لوله مربوطه اضافه گردیدند. بر حسب مورد به عنوان کنترل مثبت از DNA استخراج شده از سویه مایکوباکتریوم بویس BCG و بعنوان کنترل منفی آب مقطر دو بار تقطیر مناسب مولکولار بیولوژی و یا بافر TE (1x) به جای نمونه DNA به سایر اقلام واکنش اضافه گردید.

نتایج:

نمونه‌ها:

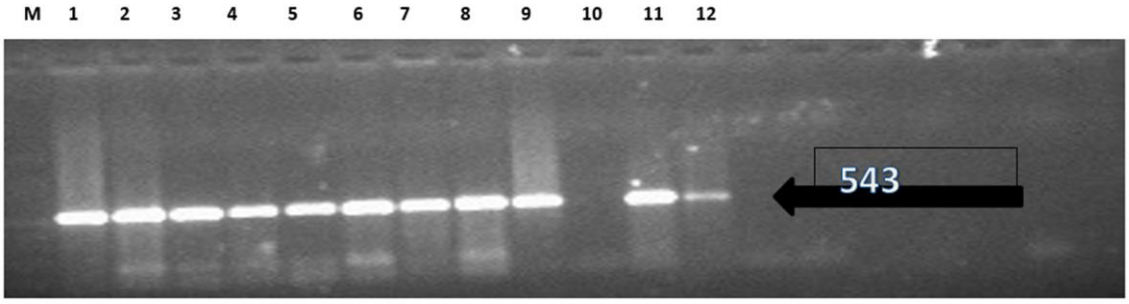
رشد ترجیحی بر روی محیط کشت LJ حاوی پیرووات به عنوان ویژگی مایکوباکتریوم بویس در ارتباط با هیچکدام از جدایه ها مشاهد نشد. DNA لازم جهت انجام آزمون‌های PCR از کلیه جدایه‌های مورد آزمایش بدون اشکال با روش جوشاندن استخراج گردید.

شناسایی مولکولی جنس مایکوباکتریوم بوسیله PCR-16S rRNA:

برای شناسایی مولکولی جنس مایکوباکتریوم از واکنش PCR مبتنی بر تکثیر قطعه‌ای به‌طول bp ۵۴۳ استفاده

جدول ۲ - شرایط PCR مورد استفاده در این مطالعه

PCR reaction	PCR buffer (µl)	dNTPs (µl)	MgCl2 (µl)	Primer forward (µ)	Primer reverse (µl)	Primer internal (µl)	Taq polymerase (µl)	DNA template (µl)	PCR water (µl)
16S rRNA	۶	۰/۵	۰/۷۵	۰/۵	۰/۵	۰	۰/۰۶۲۵	۳	۶
IS6110	۴	۱	۰/۷۵	۱	۱	۰	۰/۰۶۲۵	۳	۴
RD1	۵/۷۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۰۶۲۵	۳	۵/۷۵
RD4	۴/۲۵	۰/۵	۰/۵	۱	۱	۱	۰/۰۶۲۵	۳	۴/۲۵
RD9	۵/۷۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۰۶۲۵	۳	۵/۷۵
RD12	۵/۷۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۰۶۲۵	۳	۵/۷۵



شکل ۱ - آزمون SRN۱۶: ستون جانبی M سایزمارکر با مضربی از bp۱۰۰ ستون اول تا نهم نمونه‌های بیماران و ستون دهم کنترل منفی و ستون ۱۱ و ۱۲ کنترل مثبت

شد که در همه جدایه‌های تحت مطالعه در تحقیق حاضر در این آزمون قطعه مورد نظر تولید گردید که بدین ترتیب هویت آنها به‌عنوان اعضای جنس مایکوباکتریوم مورد تأیید قرار گرفت (شکل ۱).

شناسایی مولکولی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس از انواع غیر سلی بوسیله PCR-IS6110:

برای شناسایی مولکولی ایزوله‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس از انواع غیر سلی، واکنش PCR مبتنی بر تکثیر قطعه‌ای به طول ۲۴۵ bp استفاده شد که در نتیجه نشانه‌ی تعلق جدایه‌های تحت آزمون به کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بود. همه سویه‌های مولد و همچنین همه جدایه‌های تحت مطالعه در تحقیق حاضر در این آزمون قطعه مورد نظر را تولید نمودند که بدین ترتیب هویت آنها به عنوان اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مورد تایید قرار گرفت (جدول ۳ و شکل ۲).

افتراق اعضای مختلف کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بوسیله RD-Typing:

جهت شناسایی گونه ایزوله‌های مختلف در کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از چهار آزمون PCR مستقل شامل RD1، RD4، RD9 و RD12 استفاده شد که در مورد تمامی یکصد جدایه مورد آزمایش منجر به تولید محصول از RD1 (۱۴۶ bp)، RD4 (۱۷۲ bp)، RD9 (۲۳۵ bp) و RD12 (۳۶۹ bp) شد که جمع‌بندی این یافته‌ها تمامی یکصد جدایه را به‌عنوان مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مورد تایید قرار داد (شکل‌های ۳ تا ۶).

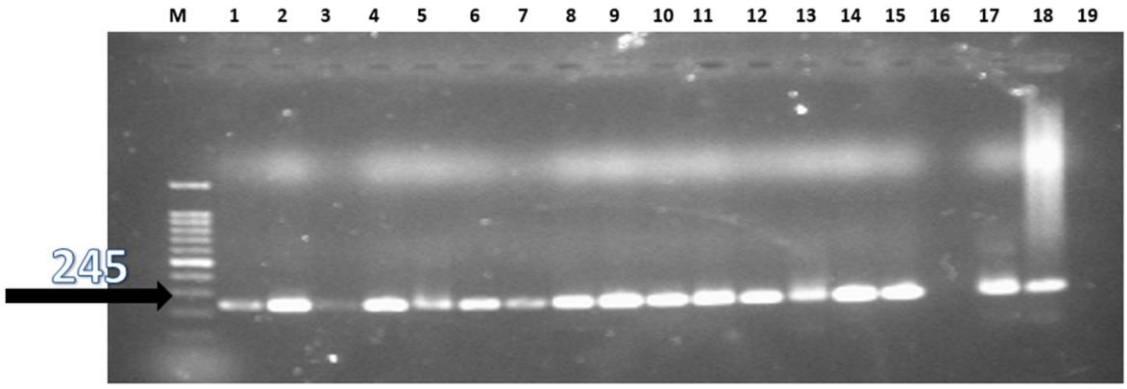
بحث:

استان خراسان رضوی پس از استان سیستان و بلوچستان و گلستان به‌عنوان سومین استان درگیر از نظر فراوانی بیماری سل محسوب می‌شود [۱۴]. در این استان، شهر مشهد به‌عنوان دومین شهر شلوغ کشور، یکی از مقدس‌ترین شهرهای مسلمانان شیعه در جهان می‌باشد و به تنهایی سالانه بیش از بیست میلیون نفر را به خود

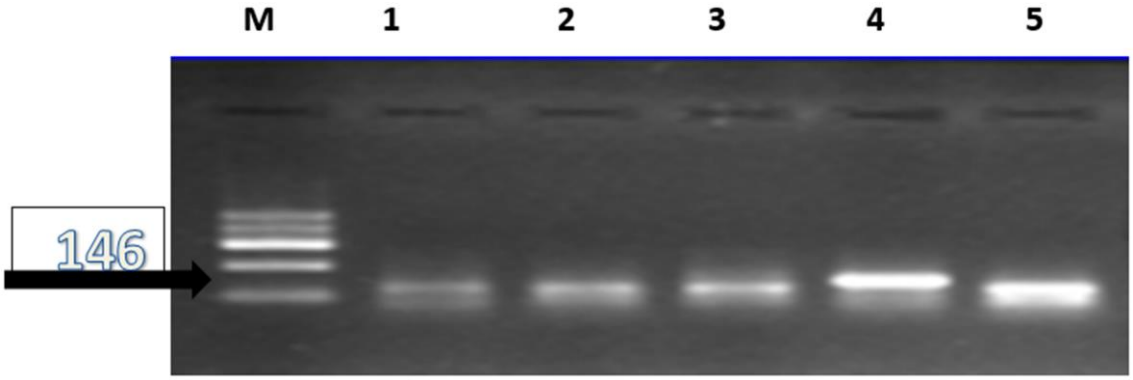
جدول ۳ - جزییات اندازه سایزهای باندهای ایجاد شده اعضای مایکوباکتریوم کمپلکس برای تشخیص افتراقی آنها از یکدیگر

	16S rRNA	IS 6110	RD1	RD4	RD9	RD12
M.tuberculosis	۵۴۳	۲۴۵	۱۴۶	۱۷۲	۲۳۵	۳۶۹
M.bovis	۵۴۳	۲۴۵	۱۴۶	۲۶۸	۱۰۸	۳۰۶
M.bovis BCG	۵۴۳	۲۴۵	۱۹۶	۲۶۸	۱۰۸	۳۰۶
M.africanum	۵۴۳	۲۴۵	۲۴۵	۱۷۲	۱۰۸	۳۶۹
M.canetti	۵۴۳	۲۴۵	۲۴۵	۱۷۲	۲۳۵	No Product
M.microti	۵۴۳	۲۴۵	۲۴۵	۱۷۲	۱۰۸	۳۶۹
M.pinnipedii	۵۴۳	۲۴۵	۲۴۵	۱۷۲	۱۰۸	۳۶۹

جذب می‌کند که به‌منظور زیارت امام رضا (ع) به آنجا می‌آیند. از طرفی سالانه بیش از صدها هزار نفر از کشورهای همسایه در شرق ایران از جمله افغانستان که همواره درگیر مشکلات سیاسی، جنگ، فقر، تروریسم و ضعف سیستم بهداشتی بوده‌اند وارد کشور شده که این مساله فشار مضاعفی را بر ساختار بهداشتی و درمانی این استان تحمیل می‌سازد. در نتیجه، انتقال بیماری‌های عفونی از این کشورها چهره اپیدمیولوژیک این بیماری‌ها را در این استان کاملا تغییر داده است. بیماری سل نیز به عنوان یک مشکل اساسی در این میان مطرح می‌باشد. بنابراین شناسایی عوامل بیماری‌زای شایع از جمله مهم‌ترین آنها سل و اپیدمیولوژی آنها در این استان بسیار حائز اهمیت می‌باشد [۱۵]. با وجود اینکه اکثر ایزوله‌های جدا شده از نمونه‌های بالینی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس است (بویژه در کشورهایی مثل ایران که در آن بیماری سل به عنوان یک بیماری آندمیک شناخته می‌شود) ولی با توجه به موارد فراوانی که از انتقال عفونت از سایر منابع وجود دارد تعیین گونه ایزوله‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس جدا شده از انسان بسیار مهم است. بدیهی است که شناسایی سریع عفونت‌های مایکوباکتریومی می‌تواند کمک شایانی به کاهش شیوع سل در استان و متعاقباً در کشور نماید. به‌عنوان مثال، در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۵ توسط Soleimanpour و همکاران بر روی ۴۲ نمونه جدا شده از مسلولین استان مرکزی انجام شد، مشخص گردید که یک مورد از این نمونه‌ها مایکوباکتریوم بویس است [۱۶]. در نتیجه با توجه به بالا بودن میزان فراوانی سل در استان خراسان رضوی و همچنین اثبات وجود این باکتری بصورت اندمیک در میان گله‌های گاو استان، این انتظار وجود دارد که جداسازی سایر گونه‌های اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به‌ویژه مایکوباکتریوم بویس بیشتر باشد [۱]. البته تا به امروز گزارشی از جداسازی مایکوباکتریوم بویس و یا سایر گونه‌های کمپلکس از انسان در این استان گزارش نشده است که شاید به‌دلیل عدم انجام آزمایشات تشخیصی لازم باشد. در بسیاری از نقاط دنیا تشخیص گونه‌های مختلف مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس جدا شده از انسان به طور رایج انجام می‌گیرد. در یک مطالعه و بررسی سیستماتیک که در سال ۲۰۱۳ توسط Muller و همکاران بر روی مقالات دو دهه اخیر در ۶۱ کشور جهان انجام شد مشخص گردید که حدود ۳ درصد از موارد سل انسانی بواسطه مایکوباکتریوم بویس است [۱۷]. البته بطور قطع موارد سل ناشی از این باکتری در انسان بیشتر از این میزان است که به دلیل عدم انجام آزمایشات افتراقی از نظر دور مانده است. در مطالعه‌ای دیگر، ولایتی و همکاران آلودگی دو کودک مبتلا به سل ناشی از مایکوباکتریوم بویس را در یک خانواده گزارش کردند. ایشان در این مطالعه نشان دادند که عفونت در یکی از کودکان از منبع شیر آلوده ایجاد گردیده و سپس از طریق تنفسی به کودک دیگر منتقل شده است [۱۸]. نتایج این مطالعه اهمیت امکان انتقال این باکتری در تماس فرد به فرد و نیز نقش جستجو و تشخیص سایر گونه‌های مایکوباکتریومی موثر در ایجاد سل انسانی را (مانند مایکوباکتریوم بویس) بیش از پیش نمایان ساخت [۱۸].



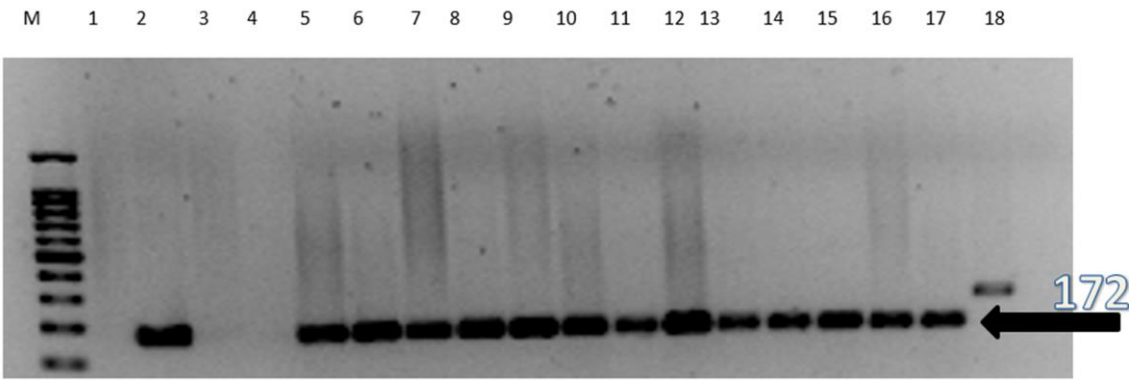
شکل ۲ - آزمون IS6110: ستون M سایزمارکر با باندهای با مضرب ۱۰۰bp، ستون شماره ۱ تا ستون شماره ۱۵ نمونه‌های بیماران، ستون‌های شماره ۱۷ و ۱۸ کنترل مثبت مایکوباکتریوم بویس BCG و ستون شماره ۱۹ کنترل منفی



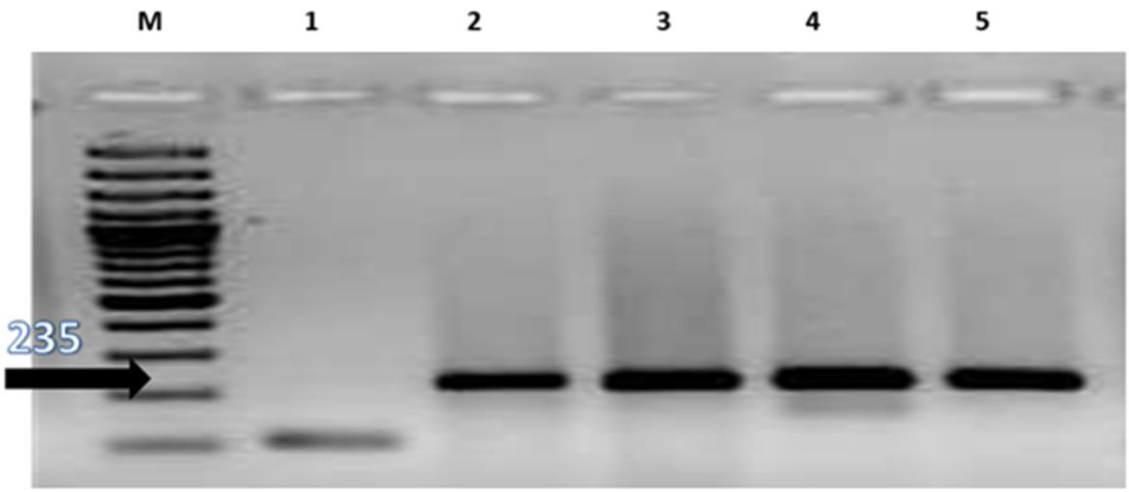
شکل ۳ - آزمون RD1: ستون M سایز مارکر به مضرب ۱۰۰bp ، از ستون شماره ۱ تا ستون شماره ۴ و ستون ۵ به‌عنوان کنترل مثبت AN5 مایکوباکتریوم بویس

از طرفی در برنامه ریشه‌کنی سل شناسایی منابع عفونت، مسیرهای انتقال و پیدا نمودن مخازن بسیار حائز اهمیت می‌باشند. با وجود اینکه شناسایی گونه ایزوله‌های بالینی مایکوباکتریوم بسیار مشکل و پیچیده است، تمایز بین مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از سایر مایکوباکتریوم‌های کمپلکس توبرکلوزیس از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است لذا ایجاد یک روش دقیق و سریع برای تمایز این گونه‌ها ضروری می‌باشد. در حال حاضر تمایز بین گونه‌های مختلف کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکولوزیس بر اساس مشخصات فنوتیپی از جمله مورفولوژی کلنی، میزان رشد و انجام تست‌های بیوشیمیایی میسر می‌باشد که پس از کشت انجام می‌پذیرد اما این روش‌ها بسیار وقت‌گیر هستند. اخیراً به منظور تمایز بین اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از روش‌های مختلف ژنوتایپینگ به‌عنوان ابزار مفید و سریعی برای شناسایی گونه‌ها و مطالعات اپیدمیولوژیک استفاده می‌شود. تاکنون چندین تکنیک برای تمایز اعضای مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس ابداع شده‌اند که هر کدام هدف خاصی را بر روی ژنوم دنبال می‌کنند، از قبیل بررسی موتاسیون بر روی ژن‌های oxyR [۱۹]، pncA [۲۰] و mtp40 [۲۱]، اسپولیگوتایپینگ[1] [۲۲]، تعیین توالی لوکوس ETR-D [۲۳] و RD typing [۹]. تکنیک‌های oxyR , pncA و mtp40 بیشتر در تمایز مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، مایکوباکتریوم بویس و مایکوباکتریوم بویس BCG از دیگر اعضای خانواده مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس به کار می‌روند و در تمایز دیگر اعضای خانواده از هم بسیار ضعیف می‌باشند. اما در تست RD typing به راحتی می‌توان اعضای کمپلکس را از هم شناسایی و تفکیک کرد [۹].

[1]Spoligotyping

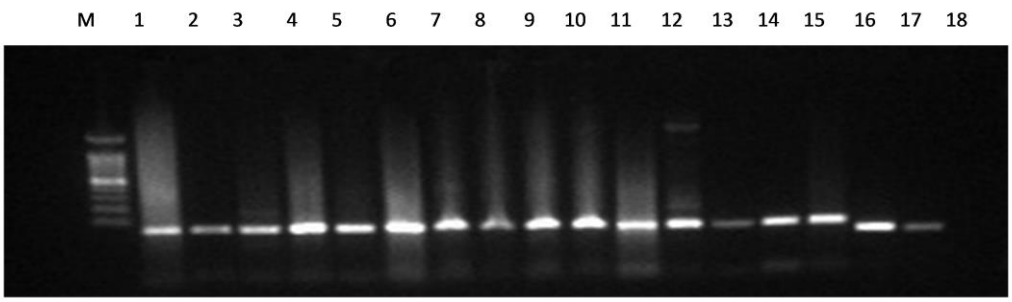


شکل ۴ - آزمون RD4: ستون M سایز مارکر به طول ۱۰۰bp، ستون شماره ۱ کنترل منفی، ستون شماره ۲ تا ستون شماره ۱۷ نمونه های بیماران، ستون شماره ۱۸ مایکوباکتریوم بویس BCG بعنوان کنترل مثبت. لازم به ذکراست که نمونه ستون‌های شماره ۳ و ۴ بدلیل حجم کم نمونه (DNA استحصالی) مجددا تکرار گردید.



شکل ۵ - آزمون RD9: ستون M سایز مارکر به مضربی از ۱۰۰bp، ستون ۱ مایکوباکتریوم بوویس BCG بعنوان کنترل مثبت و بقیه ستون‌ها نمونه‌های بیماران

با وجود اینکه در ایران از بین نه عضو شناخته شده کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، آلودگی در انسان تنها با سه مورد مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، مایکوباکتریوم بویس و مایکوباکتریوم بویس BCG گزارش شده است اما قطعا معرفی روشی که بتواند به - راحتی کلیه اعضای این کمپلکس را تفکیک کند بسیار کمک کننده خواهد بود [۲۴]. در همین راستا همانطور که عنوان شد، Warren و همکاران در سال ۲۰۰۶ یک Multiplex PCR را طراحی کردند که توسط چهار دسته پرایمر سه‌تایی بر پایه حضور یا عدم حضور توالی های RD1، RD2، RD4 و RD12 می‌توان به‌راحتی اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس را از هم شناسایی و تفکیک کرد [۹]. به همین منظور در این مطالعه، هویت یکصد جدایه مایکوباکتریومی جمع‌آوری شده از مسلولین استان خراسان رضوی با استفاده از PCR و تکثیر ژن 16S rRNA، قطعه IS6110 و همچنین روش RD typing تعیین گردید. نتایج حاصل از این مطالعه مشابه نتایج بسیاری از مطالعات دیگر نشان می‌دهد مایکوباکتریوم بویس در استان خراسان رضوی نقش چندانی در ایجاد عفونت در انسان ندارد. این موضوع یا بدلیل استفاده گسترده از شیر پاستوریزه و عدم استفاده از شیر آلوده به مایکوباکتریوم بویس و یا بدلیل برنامه منظم کنترل و ریشه‌کنی سل گاوی در این شهر می‌باشد. البته برای رسیدن به یک دیدگاه جامع و دقیق



شکل ۶ - آزمون RD12: ستون M سایز مارکر به طول ۱۰۰bp، ستون شماره ۱ تا ستون شماره ۱۵ نمونه‌های بیماران، ستون ۱۶ و ستون ۱۷ سویه مایکوباکتریوم بوویس BCG و مایکوباکتریوم بویس AN5 هر دو بعنوان کنترل مثبت وستون ۱۸ کنترل منفی

در این زمینه نیاز به انجام تحقیقات بیشتر و گسترده‌تر می‌باشد.

تاکنون تحقیقی منسجم و برنامه‌ریزی شده در زمینه تشخیص و شناسایی گونه‌های مختلف مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس در این استان وجود نداشته و این اولین تحقیقی است که با کمک وزارت بهداشت درمان انجام شد. از طرفی این تحقیق اولین بررسی انجام شده در ایران جهت تشخیص سریع و کم هزینه کمپلکس مایکوباکتریوم‌های توبرکلوزیس بود که توسط روش مولکولی RD typing انجام گرفت و مشخص شد که بررسی وسیع بوسیله این تکنیک ساده می‌تواند در تشخیص بموقع بیماری و متعاقباً درمان آسان آن، به خصوص در بیماران دارای نقص سیستم ایمنی کمک شایان توجهی نماید. همچنین با شناسایی سریع منابع عفونت، مسیرهای انتقال و پیدا نمودن مخازن آن، در امر کمک قابل توجهی به برنامه کنترل و ریشه‌کنی بیماری سل انجام شود.

تشکر و قدردانی:

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

منابع:

1) Kaufmann SHE. Fact and fiction in tuberculosis vaccine research: 10 years later. The Lancet Infectious Diseases. 2011;11(8):633-640.
2) Global tuberculosis report [Internet], World Health Organization; 2015. Available from: http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/
3) Corbett EL. Epidemiology of Tuberculosis in a High HIV Prevalence Population Provided with Enhanced Diagnosis of Symptomatic Disease. PLoS Medicine. 2007;4(1).
4) Caminero JA. Multidrug-resistant tuberculosis: epidemiology, risk factors and case finding. International Journal of Tuberculosis and Lung Disease. 2010;14(4):382-390.
5) arsons LM, Somoskovi A, Gutierrez C, et al. Laboratory diagnosis of tuberculosis in resource-poor countries: challenges and opportunities. Clinical Microbiology Reviews. 2011;24(2):314-350.
6) Dorman SE. New diagnostic tests for tuberculosis: bench, bedside, and beyond. Clinical Infectious Diseases. 2010;50 Suppl 3:S173-177.
7) Kox LF, van Leeuwen J, Knijper S, Jansen HM, Kolk AH. PCR assay based on DNA coding for 16S rRNA for detection and identification of mycobacteria in clinical samples. Journal of Clinical Microbiology. 1995;33(12):3225-3233.
8) Vasconcellos SE, Huard RC, Niemann S, et al. Distinct genotypic profiles of the two major clades of Mycobacterium africanum. BMC Infectious Diseases. 2010;10:80.
9) Warren R. M., van Pittius N. C. G., Barnard M. et al. Differentiation of Mycobacterium tuberculosis complex by PCR amplification of

genomic regions of difference. International Journal of Tuberculosis and Lung Disease2006;10(7):818– 822.
10) de Kantor IN, Laszlo A. Tuberculosis: Laboratory procedure for developing countries. In: Gangadharan PRJ, editor. Mycobacteria basic aspects. Vol. 1. New York: Chapman Hall ITP; 1998. pp. 351–399.
11) Huard R. C., de Oliveira Lazzarini L. C., Butler W. R., Van Soolingen D., J. L. Ho. PCR-based method to differentiate the subspecies of the Mycobacterium tuberculosis complex on the basis of genomic deletions. Journal of Clinical Microbiology 2003;41(4):1637–1650.
12) Doroudchi M, Kremer K, Basiri EA, et al. IS6110-RFLP and spoligotyping of Mycobacterium tuberculosis isolates in Iran. Scandinavian Journal of Infectious Diseases. 2000;32(6):663-668.
13) Soleimanpour S, Hamedi Asl D, Tadayon K, et al. Extensive Genetic Diversity among Clinical Isolates of Mycobacterium tuberculosis in Central Province of Iran. Tuberc Res Treat. 2014;2014:195287.
14) Rafiee S, Besharat S, Jabbari A, Golalipour F, Nasermoaadel A. Epidemiology of Tuberculosis in Northeast of Iran: A Population-Based Study. Iranian Journal of Medical Sciencesi 2009;34(3):193-197.
15) Farsiani H, Mosavat A, Soleimanpour S, et al. Limited genetic diversity and extensive antimicrobial resistance in clinical isolates of Acinetobacter baumannii in north-east Iran. Journal of Medical Microbiology. 2015;64(7):767-773.
16) Soleimanpour S, Mosavari N, Asl DH, et al. Zoonotic tuberculosis caused by Mycobacterium bovis, Central province, Iran. Lung, Journal of Pulmonary and Respiratory Research. 2015, 2(5): 44-54.
17) Müller B, Dürr S, Alonso S, Hattendorf J, et al. Zoonotic Mycobacterium bovis–induced Tuberculosis in Humans. Emerging Infectious Diseases 2013; 19(6):899-908.
18) Velayati AA, Farnia P, Boloorsaze MR, et al. Mycobacterium bovis infection in children in the same family: transmission through inhalation. Monaldi Archives for Chest Disease Archivio Monaldi per Le Malattie Del Torace. 2007;67(3):169-172.
19) Sreevatsan S, Escalante P, Pan X, et al. Identification of a polymorphic nucleotide in oxyR specific for Mycobacterium bovis. Journal of Clinical Microbiology. 1996;34(8):2007-2010.
20) Somoskovi A, Dormandy J, Parsons LM, et al. Sequencing of the pncA gene in members of the Mycobacterium tuberculosis complex has important diagnostic applications: Identification of a species-specific pncA mutation in “Mycobacterium canettii” and the reliable and rapid predictor of pyrazinamide resistance. Journal of Clinical Microbiology. 2007;45(2):595-599.
21) Weil A, Plikaytis BB, Butler WR, Woodley CL, Shinnick TM. The mtp40 gene is not present in all strains of Mycobacterium tuberculosis. Journal of Clinical Microbiology. 1996;34(9):2309-2311.
22) Gori A, Bandera A, Marchetti G, et al. Spoligotyping and Mycobacterium tuberculosis. Emerging Infectious Diseases. 2005;11(8):1242-1248.
23) Coitinho C, Greif G, Robello C, van Ingen J, Rivas C. Identification of Mycobacterium tuberculosis complex by polymerase chain reaction of Exact Tandem Repeat-D fragment from mycobacterial cultures. International Journal of Mycobacteriology. 2012;1(3):146-148.
24) Suheir E, Abedelmajeed N, Hagai L, et al. First-time detection of Mycobacterium bovis in livestock tissue and milk in the West bank, Palestinian territories. PLOS Neglected Tropical Diseases. 2013; 7(9): 17-24.

Nafas, Vol. 3, No. 1, Spring 2016, Pages: 31-40

Original Article

Molecular Identification of Mycobacterium Tuberculosis Complex, Isolated from Tuberculosis Patients of Khorasan Razavi

Marjan Jalalimehr[1*], Nader Mossavari[2], Kiumars Amini[3]

1) Saveh Branch of Azad Islamic University, Saveh, Iran
2) Bovine Tuberculosis Reference Laboratory, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Karaj, Iran
3) Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Saveh Branch of Azad Islamic University, Saveh, Iran

Abstract:
Tuberculosis has long been recognized as one of the important threatening zoonotic diseases. Despite all the advances in its treatment; in 1993, WHO has announced that tuberculosis remains as the first major problem and the second cause of mortality by infectious agent in the world. Successful treatment of this disease, relies on the identification of species between Mycobacterium tuberculosis complexes. Regarding this matter, through application of molecular techniques, this research aims to identify the Mycobacterial isolates from Mashhad tuberculosis patients, which were submitted to the Reference Laboratory of Tuberculosis at Razi Vaccine and Serum Research Institutes.
Nowadays, different molecular techniques are used as effective rapid tools for identification of Mycobacterial isolates. In this research, the initial PCR test for 16s rRNA gene of 100 isolates, revealed that all the isolates belonged to the Mycobacterium genus. Then, the supplementary test of IS6110 confirmed that all the isolates belonged to the Mycobacterium tuberculosis complex. Furthermore, the RD Typing techniques were used to differentiate between the species of complex and accordingly, they were identified.
Results showed that all the one hundred isolates from Khorasan Razavi are Mycobacterium tuberculosis and the tested tuberculosis patients are not contaminated with Mycobacterium bovis or other species of the complex.
This is either due to the widespread usage of pasteurized milk (instead of contaminated milk with Mycobacterium bovis) or due to the proper and regular "Control and Eradication Scheme" of bovine tuberculosis in this city.
It should be noted that this study was done on merely 100 isolates of tuberculosis patients, however, further studies with higher sample size of isolates of this province is needed to find more reliable results.
Keywords: Mycobacterium tuberculosis, RD Typing, 16s rRNA.

[*] **Corresponding Author:**
Marjan Jalalimehr, Saveh Branch of Azad Islamic University, Saveh, Iran. Email: mjjalalimehr@yahoo.com