دارای رتبه علمی – پژوهشی
از کمیسیون نشریات علوم پزشکی کشور

تعیین هویت اعضاء *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* کمپلکس با استفاده از روش های ملکولی

مریم ارم آبادی
کارشناس ارشد میکروب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان ،کرج، ایران
کیوان تدین
استادیار میکروب شناسی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران
نادر مصوری
استادیار میکروب شناسی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران
روح اله کشاورز
دکتری عمومی دامپزشکی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران
رضا بنی هاشمی
کارشناس ارشد ایمنی شناسی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران
رایناک قادری
دکترای تخصصی میکروب شناسی دامپزشکی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران
محمد سخاوتی
کارشناس علوم آزمایشگاهی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران
مهدی احمدی
کارشناس ارشد میکروب شناسی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران
پریسا ارم ابادی
کارشناس میکروب شناسی، دانشگاه ازاد اسلامی، سنندج، ایران
ابراهیم خداوردی داریان
کارشناس ارشد میکروب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، کرج، ایران
عماد یاحقی
کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی بقیةالله، تهران، ایران
هدیه سادات میرشرف الدینی
کارشناس ارشد اقتصاد ،دانشگاه آزاد اسلامی، واحدفیروزکوه، گروه اقتصاد ، فیروزکوه،ایران

نویسنده مسئول: کیوان تدین

پست الکترونیک:k.tadayon@rvsri.ac.ir

تلفن: ۰۲۶۳۴۵۰۲۸۹۲

آدرس: کرج ، حصارک ، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، بخش واکسن های هوازی

دریافت:۹۱/۱۰/۱۳
ویرایش پایانی:۹۲/۳/۲۰
پذیرش:۹۲/٤/۲۵

چکیده

زمینه و هدف: *تشابه بسیار میان ژنوم باکتری های مایکوباکتریوم توبرکولوزیس کمپلکس، تشخیص افتراقی آنها با روش های بیوشیمیایی مرسوم آزمایشگاهی را مشکل می نماید. این تحقیق به منظور شناسایی و تعیین هویت جدایه های مایکوباکتریوم توبرکولوزیس کمپلکس عامل بیماری در میان مسلولین استان گلستان صورت پذیرفته است.*

روش بررسی: *جدایه های جمع آوری شده از نمونه های کلینیکی ۴۲ مسلول استان گلستان در محدوده زمانی ۱۳۸۷ تا ۱۳۸۹ به موسسه رازی منتقل و بر روی محیط های کشت لونشتاین- جانسون گلسیرینه و پیرووات دار، تجدید کشت گردیدند. ژنوم همه جدایه ها به روش جوشانیدن استخراج و هویت جدایه ها توسط یک برنامه PCR سه مرحله ای به نام روش Huard-Warren شامل آزمون های ۱۶ SrRNA Rv Typing مشتمل بر لوکوس های (Rv0577, Rv3877.8, Rv1970, Rv3120, Rv1510 , IS1561 و) RD typing شامل لوکوس های (RD1, RD4, RD9, RD12) تعیین گردید.*

یافته ها: *هویت همه جدایه ها مایکوباکتریوم توبرکولوزیس تعیین شد و نشانه ای از آلودگی هیچ یک از بیماران به سایر اعضای مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس یا آلودگی هم زمان آنها به بیش از یک عضو کمپلکس مشاهده نگردید.*

نتیجه گیری: *با توجه به اهمیت پرورش گاو و گوسفند در اقتصاد منطقه فقدان مایکوباکتریوم بوویس در میان جدایه های بررسی شده تا حدودی غیر منتظره به نظر می رسد. همان گونه که این مطالعه نشان می دهد روش هوارد– وارن که انجام آن ساده و مقرون به صرفه می باشد، می تواند در هر دو گروه از آزمایشگاه های منطقه ای و همچنین مرجع در تشخیص افتراقی میان اعضاء مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس به کار گرفته شود.*

واژه های کلیدی: *مایکوباکتریوم توبر کلوزیس کمپلکس، روش Huard-Warren، 16SrRNA، استان گلستان، RD typing، Rv typing*

آدرس مقاله:
ارم آبادی م، تدین ک، مصوری ن، کشاورز ر، بنی هاشمی ر، قادری ر، سخاوتی م، احمدی م، ارم آبادی پ، یاحقی ع، میرشرف الدین ه" تعیین هویت اعضاء *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* کمپلکس با از روش های ملکولی" مجله علوم آزمایشگاهی، ۱۳۹۲ویژه نامه باکتری شناسی، دوره هفتم(شماره۵):۹-۱۵

مقدمه

بیش از ۸۰ درصد از مسلولین جهان فقط در ۲۲ کشور در حال توسعه زندگی می کنند که افغانستان و پاکستان، همسایگان شرقی ایران، از این گروه می باشند. ماهیت عفونی سل ریوی و امکان انتشار آن از طریق ترشحات دستگاه تنفسی که برخلاف بیماری های عفونی دیگر انتقال بیماری را به سادگی فراهم می نماید، باعث می گردد که تشخیص سریع و دقیق بیماری توسط پزشک از اهمیت کلیدی در کنترل بیماری در جامعه برخوردار گردد. معتقدند هر مسلول می تواند تا بیش از۱۴ نفر از اطرافیانش را در طول دوره بیماری خود مبتلا سازد (۱). کشت میکروبی و استفاده از محیط های کشت اختصاصی در جداسازی عامل سل از نمونه های بیماران از اواخر قرن نوزدهم میلادی در میکروبیولوژی سل معرفی و بکارگرفته شده است. و در حال حاضر محیط های کشت جامد نظیر لونشتاین- جانسون و مایع نظیر Middlebrook در تمام آزمایشگاه های مایکوباکتریولوژی شناخته شده و به صورت همزمان یا مستقل بکار گرفته می شوند. اگرچه به صورت سنتی جداسازی و کشت باکتری سل آزمون تشخیصی نسبتا" ساده ای محسوب می گردد اما اجرا و تفسیر درست روش های بیوشیمیایی مورد استفاده در تشخیص افتراقی اعضاء کمپلکس به خصوص افتراق میان *مایکوباکتریوم توبرکولوزیس* و *مایکوباکتریوم بوویس* محدود به آزمایشگاه های مرجع می گردد که خدمات آنها همیشه و در همه حال فراهم نبوده و محدود به موارد خاص می باشد. به همین دلیل معرفی و دستیابی به روش های ساده تر، دقیق تر و البته ارزان تر تشخیص افتراقی *مایکوباکتریوم توبرکولوزیس* کمپلکس بسیار مورد توجه پزشکان و میکروبیولوژیست ها می باشد(۲). به گونه ای که کاربری این روش ها در حال حاضر در تشخیص و اپیدمیولوژی سل مورد پذیرش WHO قرار گرفته و استفاده از آنها رسمیت یافته است (۴،۳). به طور کلی روش های های ملکولار بیولوژی در آزمایشگاه های مایکوباکتریولوژی به دو گروه اصلی قابل تقسیم می باشند: روش های شناسایی و تعیین هویت مایکوباکتریوم ها در سطح جنس و گونه (۵-۷) هویت در سویه و بعد از آن، که به اصطلاح ژنوتایپینگ و یا انگشت نگاری ژنتیکی نامیده می شوند تقسیم می شوند (۹،۸). از روش های گروه اول می توان به IS*6110*-PCR که وجود شاخص ژنتیکی IS*6110* در ژنوم مایکوباکتریوم ها را به عنوان مشخصه عضویت آنها در کمپلکس *مایکوباکتریوم توبرکولوزیس* بررسی می نماید(۱۰) و از گروه دوم می توان به Variable Number Tandem Repeat Analysis (VNTR Analysis) که با بررسی وجود و اندازه گروهی از لوکوس های تکراری خاص ژنتیکی در میان اعضای *مایکوباکتریوم توبرکولوزیس* کمپلکس می پردازد، اشاره نمود (۱۱). همگام با افزایش اطلاعات موجود از ژنوم مایکوباکتریوم ها در نتیجه تعیین توالی کامل تعداد روزافزونی از مایکوباکتریوم ها بصورت پیوسته مارکرهای ژنتیکی بیشتری با کاربرد تشخیصی در میان این باکتری ها مورد شناسایی قرار گرفته اند (۱۲). منطقه ژنتیکی 16S rRNA یکی از بخش های شناخته شده ای از ژنوم باکتری ها است که در تشخیص هویت آنها و تعیین توالی نوکلئوتیدهای قسمت های خاصی از این لوکوس ژنتیکی در تعیین جنس و گونه باکتری ها به کار می رود (۱۳). این بخش از ژنوم در میان تمام اعضای ۸ گانه *مایکوباکتریوم توبرکولوزیس کمپلکس* شامل *مایکوباکتریوم توبرکولوزیس*، *مایکوباکتریوم بوویس*، *مایکوباکتریوم آفریکانوم*، *مایکوباکتریوم کنتی*، *مایکوباکتریوم میکروتی*، *مایکوباکتریوم کاپره*، *مایکوباکتریوم بوویس* BCG ، *مایکوباکتریوم پینی پدی* یکسان اما با سایر مایکوباکتریوم ها متفاوت می باشد. در سال ۲۰۰۲ Mostowy با مقایسه ژنوم سویه واکسینال *مایکوباکتریوم بویس* BCG با سویه آزمایشگاهی *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* H۳۷Rv متوجه کوتاهتر بودن ژنوم سویه گاوی و شناسایی ۱۶ منطقه ژنتیکی گردید که بنام "منطقه حذف شده" معروف گردیدند (۱۴). مطالعات بعدی نشان داد وجود و یا فقدان این مناطق ژنتیکی از نظر تکاملی معنادار و بصورت هدفمند صورت می پذیرد که بر اساس آن می توان سیر تکاملی پیدایش گونه های حال حاضر در *مایکوباکتریوم توبرکولوزیس* کمپلکس را از یک نمونه اجدادی بیان نمود. به عنوان مثال مشخص گردیده که در ژنوم سویه واکسینال BCG منطقه ژنتیکی RD1 به

صورت دائمی حذف گردیده است و این امر در طبیعت برگشت پذیر نیست (۱۵). در سال ۲۰۰۶ Warren با موفقیت یک برنامه تشخیصی متکی بر PCR را ابداع نمود که با بکارگیری چهار لوکوس ژنتیکی RD1,RD4 ,RD9 ,RD12 امکان تشخیص افتراقی میان همه اعضاء ۸ گانه *مایکوباکتریوم توبرکولوزیس* کمپلکس به صورت قطعی فراهم می گردد. قطعیت و درستی استراتژی Warren با بکارگیری آن در آزمایشگاهها و مطالعات مختلف و متعدد بین المللی به اثبات رسیده و اکنون به عنوان یک روش شناخته شده معتبر مورد استفاده قرار می گیرد (۱۶). در مطالعه حاضر با هدف کاربرد آزمایشگاهی و دستیابی به توانایی اجرای سیستم های شناسایی و تعیین هویت مایکوباکتریوم ها، تلفیقی از روش های مشروح فوق در قالب یک برنامه سه مرحله ای به نام روش Huard-Warren بر روی ۴۲ جدایه مایکوباکتریایی جمع آوری شده از مسلولین استان گلستان صورت پذیرفت.

روش بررسی

نمونه خلط ۴۲ بیمار اسمیر مثبت در فاصله زمانی ۱۳۸۷ تا ۱۳۸۹ جمع آوری شد و به آزمایشگاه مایکوباکتریولوژی شعبه اراک موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی منتقل شدند. در آزمایشگاه با استفاده از روش استاندارد پتروف (۱۷) عملیات هضم و آماده سازی آنها صورت پذیرفت و تمام نمونه ها بر روی ۲ محیط کشت جامد لونشتاین–جانسون گلیسیرینه و پیرووات دار کشت و به مدت ۸ هفته در دمای C ۳۷° نگهداری گردیدند. سپس توسط رنگ آمیزی اسید–فست مورد بررسی قرار گرفتند. برای استخراج DNA از روش ساده" جوشانیدن"استفاده شد. معادل یک لوپ کامل از کشت میکروبی به یک میکروفیوژ تیوب (۱/۵ ml) مجهز به واشر ضد نشت محتوی ۴۰۰lμ بافر (1x) TE انتقال و در عمق بن ماری محتوی آب در دمای C ۹۵° به مدت ۴۰ دقیقه استقرار یافته غیر فعال گردید. سوسپانسیون حاصله به مدت ۵ دقیقه در g ۵۰۰۰ سانتریفیوژ و از فیلتر سرسرنگیμ ۰/۲ گذرانیده شد. مایع صاف شده محتوی ماده ژنتیکی جهت استفاده مستقیم در آزمون های PCR برای استفاده بعدی در یخچال (۴°C) و یا فریزر (-۲۰°C) نگهداری گردید.

آزمایش PCR براساس یک برنامه تشخیصی شامل آزمون 16SrRNA (۱۲)، آزمون Rv Typing (مشتمل‌بر لوکوس‌های (12) (Rv0577, Rv3877.8, Rv1970, Rv3120, Rv1510, IS*1561* وآزمون RD typing (مشتمل بر لوکوس های ,RD1, RD4) RD9, RD12 (۱۲، ۱۶) که هویت جدایه های مایکوباکتریایی را تعیین می نمایندصورت پذیرفت(جدول۱). برای انجام PCR از مخلوط تجارتی آماده مصرف Ampliquon (Ampliquor, Denmark) محتوی تمام اجزاء مورد نیاز برای PCR بجز پرایمر و نمونه DNA باکتری استفاده گردید. روش انجام کار بر اساس روش کار و همچنین توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای مورد استفاده (جدول۲)صورت گرفت. تولید و اندازه محصولات حاصل از تکثیر با کمک الکتروفورز ژل آگاروز حاوی اتیدیوم بروماید مورد بررسی قرار گرفت. اجزاء آزمون های PCR: ۶ میکرولیتر مخلوط آماده مصرف PCR، ۰/۴ میکرولیتر از هر پرایمر (از محلول آماده مصرف به غلظت ۵ پیکامول در هر میکرولیتر)، ۲ میکرولیتر از محلول محتوی ماده ژنتیکی باکتری و ۳/۲ میکرولیتر آب مقطر مناسب برای PCR مجموعا به حجم ۱۲ میکرولیتر(پروتکلA)، ۶ میکرولیتر مخلوط آماده مصرف PCR، ۱/۲۵ میکرولیتر از هر پرایمر (از محلول آماده مصرف به غلظت ۵ پیکامول در هر میکرولیتر) ۲، میکرولیتر از محلول محتوی ماده ژنتیکی باکتری و ۱/۲۵ میکرولیتر آب مقطر مناسب برای PCR مجموعا به حجم ۱۲ میکرولیتر(پروتکلB). شرایط آزمون های PCR : ۵ دقیقه گرمایش ابتدایی در دمای ۹۴درجه سانتیگراد و به دنبال آن ۳۵ نوبت گرمایش در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه، ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه و ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه و در نهایت یک نوبت گرمایش در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه(پروتکلA)،۷ دقیقه گرمایش ابتدایی در دمای ۹۵درجه سانتیگراد و به دنبال آن ۴۰ نوبت گرمایش به مدت ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۶۵ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه و در نهایت یک نوبت گرمایش در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۷ دقیقه(پروتکلB).

جدول۱ –مبانی روش تشخیصی Huard-Warren

Subspecies	PCR product size (bp) Locus										
	16S rRNA	***Rv0577***	***IS1561***	***RV1510***	***RV1970***	***Rv3877/8***	***Rv3120***	**RD1**	**RD4**	**RD9**	**RD12**
Mycobacterium tuberculosis	543	786	943	1,033	1,116	999	404	146	172	235	369
Mycobacterium bovis	543	786	943	No product	No product	999	No product	146	268	108	306
Mycobacterium bovis BCG	543	786	943	No product	No product	No product	No product	196	268	108	306
Mycobacterium africanum subtype I	543	786	943	1,033	No product	999	404	146	172	108	369
Mycobacterium africanum subtype II	543	786	943	1,033	1,116	999	404	146	172	108	369
Mycobacterium microti	543	786	943	1,033	No product	999	404	146	172	108	369
Mycobacterium canetti	543	786	No product	1,033	1,116	999	No product	146	172	235	No product
Mycobacteria other than tuberculosis	543	No product	No product	No product	No product	No product	No product	No product	No product	No product	No product

جدول ۲-اجزاء و شرایط اجرا آزمون های PCR مورد استفاده در این تحقیق

PCR target locus	Primer name and sequence (5'-3')	PCR protocol	Reference
16S rRNA	**16S rRNAf ACG GTG GGT ACT AGG TGT GGG TTT C** **16S rRNAr TCT GCG ATT ACT AGC GAC TCC GAC TTC A**	**A**	**(12)**
Rv0577	**Rv0577f ATG CCC AAG AGA AGC GAA TAC AGG CAA** **Rv0577r CTA TTG CTG CGG TGC GGG CTT CAA**	**A**	**(12)**
IS1561	**IS1561f GCT GGG TGG GCC CTG GAA TAC GTG AAC TCT** **IS1561r AAC TGC TCA CCC TGG CCA CCA CCA TTG ACT**	**A**	**(12)**
Rv1510	**Rv1510f GTG CGC TCC ACC CAA ATA GTT GC** **Rv1510r TGT CGA CCT GGG GCA CAA ATC AGT C**	**A**	**(12)**
Rv1970	**Rv1970f GCG CAG CTG CCG GAT GTC AAC** **Rv1970r CGC CGG CAG CCT CAC GAA ATG**	**A**	**(12)**
Rv3877/8	**Rv3877/8f CGA CGG GTC TGA CGG CCA AAC TCA TC** **Rv3877/8r CTT GCT CGG TGG CCG GTT TTT CAG C**	**A**	**(12)**
Rv3120	**Rv3120f GTC GGC GAT AGA CCA TGA GTC CGT CTC CAT** **Rv3120r GCG AAA AGT GGG CGG ATG CCA GAA TAG T**	**A**	**(12)**
RD1	**RD1f AAG CGG TTG CCG CCG ACC GAC C** **RD1int CTG GCT ATA TTC CTG GGC CCG G** **RD1r GAG GCG ATCT GGC GGT TTG GGG**	**B**	**(16)**
RD4	**RD4f ATG TGC GAG CTG AGC GAT G** **RD4int TGTA CTA TGC TGA CCC ATG CG** **RD4r AAA GGA GCA CCA TCG TC**	**B**	**(16)**
RD9	**RD9f CAAGTTGCCGTTTCGAGCC** **RD9int CAATGTTTGTTGCGCTGC** **RD9r GCTACCCTCGACCAAGTGTT**	**B**	**(16)**
RD12	**RD12f GGGAGCCCAGCATTTACCTC** **RD12int GTGTTGCGGGAATTACTCGG** **RD12r AGCAGGAGCGGTTGGATATTC**	**B**	**(16)**

یافته ها

رشد ترجیحی بر روی محیط کشت لونشتاین-جانسون پیرووات دار (ویژگی جدایه های *مایکوباکتریوم بوویس*) در هیچکدام از جدایه ها مشاهده نگردید. ماده ژنتیکی بدون اشکال از تمام جدایه های بروش جوشانیدن استخراج و استفاده از آن سبب تولید محصول در تمام آزمون های PCR گردید. هر ۴۲ جدایه تحت بررسی 16SrRNA، محصولی را به اندازه ۵۴۳ bp تولید نمودند که نشان دهنده هویت تمام آنها به عنوان جدایه ها ی متعلق به جنس مایکوباکتریوم بود. در نتیجه اجرای۶ آزمون مستقل PCR با استفاده از پرایمرهای مربوط به ۶ لوکوس Rv typing این گروه بر روی ۴۲ جدایه، محصولات مورد انتظار از قرار Rv0577 (۷۸۶ bp)، IS*1561* (۹۴۳ bp)، Rv1510 (۱۰۳۳ bp)،Rv1970 (۱۱۱۶ bp)، Rv3120 (۴۰۴ bp)، Rv3877/8 (۹۹۹bp) تولید و شناسایی گردیدند(جدول۱). انجام RD Typing بر روی همه ۴۲ جدایه موجب تولید محصول از RD1 (۱۴۶ bp)، RD4 (۱۷۲ bp)، RD9 (۲۳۵ bp) و RD12 (۳۶۹ bp) گردید که تلفیق این یافته ها هویت تمام ۴۲ جدایه را به عنوان *مایکوباکتریوم توبرکولوزیس* مورد تایید قرار داد.

بحث

استان گلستان پس از سیستان و بلوچستان بیشترین فراوانی سل را در کشور دارد (۱۸). در سال ۲۰۰۲ قائمی و همکاران به مطالعه فراوانی انواع مایکوباکتریوم های محیطی در خاک زمین های ماسه ای و علفزار دو منطقه شرقی و غربی استان گلستان که معمولا" به ترتیب میزان بالاتر و پایین تری از سل انسانی از آنها گزارش می گردد پرداختند، این مطالعه نشان دادکه فراوانترین مایکوباکتریوم در نمونه های خاک منطقه *Mycobacterium fortuitum* (21.8%), *Mycobacterium flavesens* (20.5%) *Mycobacterium chelonae* (16.8%) هستند. قائمی نشان داد در نمونه های خاک اخذ شده از دو گروه مناطق جغرافیایی این استان شامل مناطق با میزان شیوع بالاتر سل و مناطق با شیوع پایین تر آن در انسان، فراوانی *این مایکوباکتریوم* با فراوانی *مایکوباکتریوم توبرکولوزیس* نسبت عکس دارد(۱۹). در سال ۲۰۰۶ قاضی سعیدی در بررسی آلودگی به *Mycobacterium marinum* در میان ماهی گیران و ماهیان خاویاری منطقه آشوراده استان گلستان ضمن آنکه موردی از آلودگی به این پاتوژن را درمیان ماهیگیران نیافت به شناسایی دو مورد آلودگی به این مایکوباکتریوم در میان ماهیان خاویاری منطقه اشاره نمود (۲۰). در سال ۲۰۱۱ لیوانی میزان فراوانی مقاومت چند دارویی جدایه های *مایکوباکتریوم توبرکولوزیس* در استان گلستان را در حدود ۳/۴ درصد اعلام نمود (۲۱). در سال ۲۰۰۹ جاوید با مطالعه بر روی ۱۰۴ جدایه مایکوباکتریایی از بیماران در استان گلستان نشان داد که فراوانی موارد مقاومت چندگانه دارویی در این استان عمومیت ندارد و بیش از ۱۶ درصد بیماران تحت مطالعه آلوده به مایکوباکتریوم های غیر از اعضاء *مایکوباکتریوم توبرکولوزیس* کمپلکس بودند. جاوید در جمع بندی یافته های خود بر لزوم استفاده از روش های شناسایی هویت جدایه های جمع آوری شده از بیماران در این منطقه به کمک روش های بیوشیمیایی یا ملکولی تاکید می نماید (۲۲). علیرغم اهمیت ویژه *مایکوباکتریوم توبرکولوزیس* کمپلکس در موارد سل، بسیاری دیگر از انواع گونه های مایکوباکتریوم می توانند اسباب ایجاد تظاهرات بالینی در انسان گردند که وفور این گونه موارد در ایران پیش از این توسط محققین دیگر مورد توجه و تاکید قرار گرفته است (۲۳-۲۶). به این ترتیب شناسایی این موارد دارای اهمیت درمانی می باشد. استفاده از 16S rRNA زمینه شناسایی این گونه ها را فراهم می نماید. هر ۴۲ جدایه تحت بررسی، محصول PCR به طول ۵۴۳ bp را تولید نمودند که هویت آنها به عنوان مایکوباکتریوم را تایید نمود. در ایران از میان هشت عضو شناخته شده *مایکوباکتریوم توبرکولوزیس* کمپلکس، آلودگی انسان تنها به *مایکوباکتریوم توبرکولوزیس*(۲۸،۲۷)، *مایکوباکتریوم بوویس* (۲۹) و *مایکوباکتریوم بوویس* BCG (۳۱،۳۰) گزارش گردیده است. در مطالعه حاضر در هیچکدام از ۴۲ جدایه تحت بررسی رشد ترجیحی نسبت به محیط لونشتاین-جانسون پیرووات دار مشاهده نگردید. این مشاهده نشانه ای از عدم وجود *مایکوباکتریوم بوویس* در میان این جدایه ها است. این یافته با

انجام دو آزمون RD4 و Rv3877/8 در این تحقیق مورد تایید قرار گرفت. میزبان اصلی *مایکوباکتریوم بوویس* گاو و راه انتقال آن به انسان، مصرف شیر غیر پاستوریزه و گوشت آلوده می باشد. وجود این باکتری به صورت اندمیک در میان گله های گاو تقریبا تمام استان های کشور به اثبات رسیده است (۳۲). با توجه به ساختار اجتماعی سنتی استان گلستان و توسعه دامداری در منطقه جداسازی این مایکوباکتریوم از میزبان انسانی دور از انتظار نیست و جدا نشدن آن از میان بیماران تحت مطالعه در این تحقیق می تواند به تعداد نسبتا کم آنها مربوط باشد. یکی دیگر از ویژگی های قابل توجه برنامه مورد استفاده در این مطالعه که در واقع از ۱۱ آزمون مستقل PCR تشکیل گردیده است عدم نیاز آن به استخراج حجم زیاد ماده ژنتیکی از باکتری می باشد. در مقایسه با روش های ملکولی نظیر Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) که اجرای آنها در مورد اعضای *مایکوباکتریوم توبرکولوزیس* کمپلکس متکی بر کشت انبوه باکتری و اعمال روش پرهزینه و طولانی استخراج ژنوم می باشد، استفاده مستقیم از عصاره حاصل از جوشاندن باکتری که تهیه آن به کمتر از یک ساعت زمان احتیاج خواهد داشت برای اجرای برنامه پیشنهاد شده در این تحقیق کفایت می نماید.

نتیجه گیری

به کارگیری سیستم احراز هویت تلفیقی RV typing و RD typing که انجام آنها در آزمایشگاه های مایکوباکتریولوژی مجهز به دستگاه PCR امکان پذیر می باشد می تواند با هزینه نسبتا کم در تشخیص دقیق و سریع عامل مایکوباکتریایی و به دنبال آن اتخاذ سیاست درمانی متناسب به کادر پزشکی کمک نمود.

تشکر و قدردانی

تمام هزینه های آزمایشگاهی انجام این تحقیق توسط موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی و در قالب یک فقره پروژه تحقیقاتی مصوب به شماره ۹۰۰۴۷-۱۸-۱۸-۲ پرداخت شده است. همه عملیات آزمایشگاهی مربوط به این مطالعه پس از دریافت نمونه های کلینیکی در فضاهای آزمایشگاهی این مرکز واقع در کرج و اراک صورت پذیرفته است. از دکتر سمنانی، ریاست محترم وقت دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی گلستان به واسطه موافقت با انجام این مطالعه و خانم دکتر پورغفور از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی گلستان و خانم نعمتی شجاع دانشجوی سابق دانشگاه علوم پزشکی گلستان بخاطر سازماندهی عملیات جمع آوری و انتقال نمونه های کلینیکی تقدیر و تشکر می گردد. این مقاله ناظر بر بخشی از یافته های پروژه کارشناسی ارشد مریم ارم آبادی می باشد.

References

1. Leitritz L, Schubert S, Bucherl B, Masch A, Heesemann J, Roggenkamp A. *Evaluation of bactec mgit 960 and bactec 460tb systems for recovery of mycobacteria from clinical specimens of a university hospital with low incidence of tuberculosis.* J Clin Microbiol. 2001; 39(10): 3764-7.

2. Alcaide F, Coll P. *Advances in rapid diagnosis of tuberculosis disease and anti-tuberculous drug resistance. Enferm Infecc Microbiol* Clin. 2011; 29(1): 34-40.

3. Rolfe NE, Garcia C, Widen RH, Taylor SP. *Rapid diagnosis of mycobacterium abscessus endophthalmitis*. J Med Microbiol. 2013; 62(7): 1089-91.

4. Arega SM, Conraths FJ, Ameni G. *Prevalence of tuberculosis in pigs slaughtered at two abattoirs in ethiopia and molecular characterization of mycobacterium tuberculosis isolated from tuberculous-like lesions in pigs.* BMC Vet Res. 2013; 9: 97.

5. Esparcia Ó, Español M, Garrigó M, Moreno C, Montemayor M, Navarro F, et al. *[use of different pcr-based techniques integrated into a non-tuberculous identification algorithm]*. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2012;30(1): 3-10.

6. Stucki D, Malla B, Hostettler S, Huna T, Feldmann J, Yeboah-Manu D, et al. *Two new rapid snp-typing methods for classifying mycobacterium tuberculosis complex into the main phylogenetic lineages.* PLoS One. 2012; 7(7): 1.

7. Cardoso Oelemann M, Gomes HM, Willery E, Possuelo L, Batista Lima KV, Allix-Beguec C, et al. *The forest behind the tree: Phylogenetic exploration of a dominant mycobacterium tuberculosis strain lineage from a high tuberculosis burden country.* PLoS One. 2011; 6(3): 1.

8. Thorne N, Borrell S, Evans J, Magee J, Garcia de Viedma D, Bishop C, et al. *Is6110-based global phylogeny of mycobacterium tuberculosis.* Infect Genet Evol. 2011;11(1): 132-8.

9. Aleksic E, Merker M, Cox H, Reiher B, Sekawi Z, Hearps AC, et al. *First molecular epidemiology study of mycobacterium tuberculosis in kiribati.* PLoS One. 2013; 8(1): e55423.

10. Huard RC, Lazzarini LC, Butler WR, van Soolingen D, Ho JL. *Pcr-based method to differentiate the subspecies of the mycobacterium tuberculosis complex on the basis of genomic deletions.* J Clin Microbiol. 2003; 41(4): 1637-50.

11. Tortoli E, Gitti Z, Klenk HP, Lauria S, Mannino R, Mantegani P, et al. *Survey of 150 strains belonging to the mycobacterium terrae complex and description of mycobacterium engbaekii sp. Nov., mycobacterium heraklionense sp. Nov. And mycobacterium longobardum sp. Nov.* Int J Syst Evol Microbiol. 2013; 63(2): 401-11.

12. Mostowy S, Cousins D, Brinkman J, Aranaz A, Behr MA. *Genomic deletions suggest a phylogeny for the mycobacterium tuberculosis complex.* J Infect Dis. 2002; 186(1): 74-80.

13. Mostowy S, Inwald J, Gordon S, Martin C, Warren R, Kremer K. *Revisiting the evolution of mycobacterium bovis.* J Bacteriol. 2005; 187(18): 6386-95.

14. Warren RM, NC Gey van Pittius, M Barnard, A Hesseling, E Engelke, M de Kock, MC Gutierrez, et al. *Differentiation of mycobacterium tuberculosis complex by pcr amplification of genomic regions of difference.* Int J Tuberc Lung Dis. 2006;10(7): 818-22.

15. Medeiros L, Marassi C, Duarte R, da Silva M, Lilenbaum W. *Comparison of decontamination methods for primary isolation of mycobacterium bovis in paucibacillary bovine tissues.* Lett Appl Microbiol. 2012; 54(3): 182-186.

16. Salek S, Salek S, Emami H, Masjedi MR, Velayati AA. *Epidemiologic status of tuberculosis in golestan province.* Tanaffos. 2008; 7(3): 63-68.

17. Ghaemi E, Ghazisaidei K, Kohsarei H, Kohsar F, Behnampour N, Basorei M, et al. *The comparison of environmental mycobacteriums in the regions with high and low prevalency of tb in golestan province.* Journal of Gorgan University of Medical Sciences. 2002; 4(2): 48-53.

18. Ghazisaidi K, Hashemzadeh R, Mohammadi M, Fateminasab F, Ghaemi E. *Mycobacterium marinum infection in caviar fishes and fishermans in ashorada of golestan province in north of iran.* Journal of Gorgan University of Medical Sciences. 2006; 8(2): 60-62.

19. Livani S, Mirinargesi M, Nemati Se, Rafiee S, Taziki M, Tabarraei A, et al. *Prevalence of multidrug resistantmycobacterium tuberculosis by mycobacteria growth indicator tube in golestan province, north of iran.* Medical Laboratory Journal. 2011; 5(2): 7-14.

20. Javid S, Ghaemi A, Amirmozaffari N, Rafiee S, Moradi A, Dadgar T. *Detection of isoniazid and rifampin resistant strain of mycobacterium tuberculosis isolated from patients in golestan province (north of iran).* Medical Laboratory Journal. 2009; 3(1): 66.

21. Marjani M, Mansouri N, Tabarsi P, Baghaei P, Farnia P, Sheikholslami FM, et al. *Clinical and radiological deterioration due to mycobacterium szulgai in an asthmatic patient.* J Infect Dev Ctries. 2012; 6(1): 89-91.

22. Baghaei P, Tabarsi P, Farnia P, Marjani M, Sheikholeslami FM, Chitsaz M, et al. *Pulmonary disease caused by mycobacterium simiae in iran's national referral center for tuberculosis.* J Infect Dev Ctries. 2012; 6(1): 23-8.

23. Shojaei H, Heidarieh P, Hashemi A, Feizabadi MM, Daei Naser A. *Species identification of neglected nontuberculous mycobacteria in a developing country.* Jpn J Infect Dis. 2011; 64(4): 265-71.

24. Tabarsi P, Baghaei P, Farnia P, Mansouri N, Chitsaz E, Sheikholeslam F, et al. *Nontuberculous mycobacteria among patients who are suspected for multidrug-resistant tuberculosis-need for earlier identification of nontuberculosis mycobacteria.* Am J Med Sci. 2009; 337(3): 182-4.

25. Akhavan R, Meshkat Z, Khajekaramadini M, Meshkat M. *Eight-year study of mycobacterium tuberculosis in mashhad, northeast of iran.* Iranian Journal Of Pathology. 2013; 8(2): 73-80.

26. Hashemi A, Shojaei H, Heidarieh P, Aslani MM, Naser AD. *Genetic diversity of iranian clinical isolates of mycobacterium tuberculosis.* New Microbiol. 2012; 35(1): 61-5.

27. Velayati AA, Farnia P, Boloorsaze MR, Sheikholslami MF, Khalilzadeh S, Hakeeme SS, et al. *Mycobacterium bovis infection in children in the same family: Transmission through inhalation.* Monaldi Arch Chest Dis. 2007; 67(3): 169-72.

28. Shojaei H, Rahimi-Hajiabadi H, Heidarieh P, Hashemi-Shahraki A, Emadoleslami M, Ataei B, et al. *Molecular microbiological investigation of post-vaccination bacille calmette-guerin infection in iranian patients.* Int J Tuberc Lung Dis. 2011; 15(11): 1497-503.

29. Monajemzadeh M, Shahsiah R, Zarei A, Alamooti AA, Mahjoub F, Mamishi S, et al. *Frequency of bacille calmette-guerin (bcg) and mycobacterium tuberculosis in tissue biopsy specimens of children vaccinated with bcg.* Am J Clin Pathol. 2010; 133(1): 102-6.

30. Tadayon K, Mosavari N, Feizabadi MM. *An epidemiological perspective on bovine tuberculosis spotlighting facts and dilemmas in iran, a historically zebu-dominant farming country.* Iran J Microbiol. 2013; 5(1): 1-13.

31Monajemzadeh M, Shahsiah R, Zarei A, Alamooti AA, Mahjoub F, Mamishi S, Khotai G, Pazira R, and Eram N. *Frequency of bacille calmette-guerin (bcg) and mycobacterium tuberculosis in tissue biopsy specimens of children vaccinated with bcg.* Am J Clin Pathol. 2010;133(1): 102-6.

32.Tadayon K, Mosavari N, and Feizabadi MM. *An epidemiological perspective on bovine tuberculosis spotlighting facts and dilemmas in iran, a historically zebu-dominant farming country.* Iran J Microbiol. 2013;5(1): 1-13.

Identification of Mycobacterium Tuberculosis Complex, Using Molecular Methods

Eramabadi, M. (MSc)
MSc of Microbiology, Islamic Azad University, Karaj Branch, Iran

Tadayon, K. (PhD)
Assistant Professor of Microbiology, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Karaj, Iran

Mosavari, N. (PhD)
Assistant Professor of Microbiology, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Karaj, Iran

Keshavarz, R. (DVM)
Doctor of veterinary medicine, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Karaj, Iran

Banihashemi, R. (MSc)
MSc of Immunology, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Karaj, Iran

Ghaderi, Gh. (PhD)
PhD of Microbiology, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Karaj, Iran

Sekhavati, M (BSc)
BSc of Medical laboratory sciences, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Karaj, Iran

Ahmadi, M. (MSc)
MSc of Microbiology, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Karaj, Iran

Eramabadi, P. (BSc)
BSc of Microbiology, Islamic Azad University, Sanandaj Branch, Iran

Khodaverdi Daryan, E. (MSc)
MSc of Microbiology, Islamic Azad University, Karaj, Iran

Ya Haghi, E. (MSc)
MSc of Microbiology, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Iran

Mir Sharafodin, H. (MSc)
MSc of Economy, Islamic Azad University, Firouz Kouh, Iran

Corresponding Author: Tadayon, K.

Email: k.tadayon@rvsri.ac.ir

Received: 3 Jan 2012
Revised: 10 Jun 2013
Accepted: 16 Jul 2013

Abstract

Background and Objective: A high level of homogeneity observed within all bacteria in the *Mycobacterium tuberculosis* complex makes a property that seriously challenges traditional biochemical-based identification methods of these pathogens in the laboratory. The work presented here was conducted to characterize *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates in Golestan, Northern Iran.

Material and Methods: Between 2008 and 2010, 42 mycobacterial isolates were collected from clinical tuberculosis-suspected patients in Golestan province. The isolates were sub-cultured on fresh Mycobacterium-specific culture media including glycerinated and pyruvated Lowenstein-Jensen slopes. The isolates were subsequently subjected to a PCR-based identification scheme coined Huard-Warren method. This strategy consisted of three individual algorithms namely, 16SrRNA; RV typing (Rv0577, Rv3877.8, Rv1970, Rv3120, Rv1510 and IS*1561*) and RD typing (RD1, RD 4, RD9 and RD12).

Results: All isolates were proved to be *M. tuberculosis.* Furthermore, none of the patients were being infected with any other member of the *M. tuberculosis* complex or simultaneously co-infected with two mycobacteria. This fundamental observation was independently obtained by specific culture media, RV typing and also RD typing.

Conclusion: Considering the fact that cattle and sheep farming play an important role in the economy of the region, absence of *Mycobacterium bovis* in the studied isolates can be unexpected to some extent. Huard-Warren which is a simple and cost-effective identification method can be used in both reference and regional laboratory for differential diagnosis of tuberculosis.

Keywords: *Mycobacterium Tuberculosis* Complex, Huard-WarrenMethod, 16SrRNA, Golestan Province, RD Typing, RV Typing

This paper should be cited as: Eramabadi M, Tadayon K, Mosavari N, Keshavarz R, Banihashemi R, Ghaderi Gh, Sekhavati M, Ahmadi M, Eramabadi P, Khodaverdi Daryan E, Ya Haghi E, Mir Sharafodin H. [Identification of Mycobacterium Tuberculosis Complex, Using Molecular Methods]. MLJ. 2014; 7(Suppl.5):9-15.[Article in Persian]