

بررسی ژن *pncA* با استفاده از روش‌های PCR-RFLP و Allele-Specific-PCR در افتراق مایکوباکتریوم بوویس از مایکوباکتریوم توبرکلوزیس

محمد رضا اله یار ترکمن^۱، دکتر فاطمه مریم شیخ‌الاسلامی^۲، دکتر پریسا فرنیان^۳،
دکتر محمد حسن شاه حسینی^۴، محدثه مظفری^۵، مهدی شمسی^۶، دکتر محمد رضا مسجدی^۷،
دکتر علی اکبر ولایتی^۷

خلاصه

مقدمه: مایکوباکتریوم بوویس به عنوان عامل سل مزمن گاوی به صورت موردی انسان را نیز درگیر می‌کند. یک موتاسیون منحصر به فرد در نقطه‌ی ۱۶۹ (G←C) ژن *pncA* در مایکوباکتریوم بوویس آن را از مایکوباکتریوم توبرکلوزیس متمایز می‌کند. استفاده از روش PCR-RFLP برای اولین بار در این تحقیق در جدا سازی این دو ارگانیسم مورد استفاده قرار گرفت.

روش‌ها: این مطالعه بر روی ۹۸ بیمار مبتلا به سل با بررسی میکروسکوپی، همراه با کشت و آنتی‌بیوگرام انجام شد. در قدم بعد، با استفاده از روش‌های Allele-specific PCR و PCR-RFLP تغییر نوکلئوتید ۱۶۹ ژن *pncA* مورد بررسی قرار گرفت و همچنین نتایج حاصل با Spoligotyping مقایسه شد.

یافته‌ها: از میان نمونه‌های مورد بررسی، با روش آنتی‌بیوگرام ۲۸ نمونه (۲۸/۵۷ درصد) مقاوم، ۵۴ نمونه (۵۵/۱ درصد) حساس به پیرازینامید و ۱۶ نمونه (۱۶/۲۳ درصد) فاقد رشد بودند. از ۲۸ نمونه‌ی مقاوم، ۳ نمونه (۳/۱ درصد) با روش‌های کلاسیک مایکوباکتریوم بوویس تشخیص داده شدند. با روش‌های مولکولی از ۹۸ نمونه، ۹۵ نمونه (۹۶/۹۳ درصد) مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و ۳ نمونه (۳/۰۶ درصد) م.بوویس تشخیص داده شدند. مقایسه‌ی روش‌های Allele-specific PCR و PCR-RFLP با حساسیت و ویژگی ۱۰۰ درصد با نتایج Spoligotyping انطباق داشتند.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان داد که فراوانی مایکوباکتریوم بوویس در جمعیت ایرانی با فراوانی ۳/۱ درصد، بالاتر از میانگین موارد بررسی شده‌ی پیشین است (۰/۵ تا ۱ درصد). همچنین نشان داد که روش Allele-specific PCR به علت ارزان‌تر و سریع‌تر بودن روش انتخابی است و روش PCR-RFLP به منظور پیش‌گیری از عدم تطبیق‌های احتمالی در Allele-specific PCR می‌تواند جایگزین مناسبی باشد.

واژگان کلیدی: مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، مایکوباکتریوم بوویس، Allele-specific PCR، PCR-RFLP، *pncA*.

مقدمه

M. pinnipedii، *Dassie bacillus* و *M. canettii* است که

اگرچه خصوصیات فنوتیپی متفاوتی در تست‌های بیوشیمیایی از خود نشان می‌دهند، اما همولوژی بالایی به لحاظ ژنتیکی دارند (۱-۲).

کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (MTB) مجموعه‌ای

از ارگانیزم‌های *M. tuberculosis*، *M. africanum*،

M. bovis BCG، *M. bovis*، *M. caprae*، *M. microti*

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران و مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

^۲ مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

^۳ دانشیار، گروه میکروبیولوژی پزشکی، مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

^۴ دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهریار، تهران، ایران.

^۵ کارشناس ارشد، مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

^۶ کارشناس، مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

^۷ استاد، پژوهشکده سل و بیماری‌های ریوی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

باکتری جلوگیری می‌کند یکی از این مشکلات است. همچنین غلظت دارو هم بر حساسیت تست‌ها بی‌تأثیر نیست (۱۰). بنابراین استفاده از روش‌های بر پایه‌ی بررسی DNA باکتری در مقایسه با روش‌های کلاسیک کشت و آنتی‌بیوگرام قابل توجه هستند.

پیش از این از ژن *mtp40* (حاضر در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و غایب در مایکوباکتریوم بوویس) برای تفریق این دو گونه استفاده می‌شد (۱۳)، ولی به تازگی معلوم شده است که این ژن در همه‌ی گونه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس وجود ندارد (۱۴، ۸). همچنین در مطالعه‌ای که توسط Weil و همکاران و با استفاده از توسط ژن *mtp40* انجام شد، مواردی از مایکوباکتریوم افریکانوم که به طور اشتباه مایکوباکتریوم بوویس تشخیص داده شد (۱۵). بنابراین *mtp40* برای این هدف نامناسب تشخیص داده شده است.

در حال حاضر از ژن‌های *oxyR* و *pncA* که به ترتیب برای مایکوباکتریوم بوویس در نقاط ۲۸۵ و ۱۶۹ نسبت به مایکوباکتریوم توبرکلوزیس تغییر نوکلئوتیدی دارند، برای تمایز استفاده می‌شود (۱۶، ۱۲). ژن *pncA* مشتمل بر ۵۶۱ نوکلئوتید است که آنزیم PZAase با ۱۸۶ اسید آمینه را کد می‌کند (۸). در ژن *pncA* مایکوباکتریوم بوویس تغییر در نوکلئوتید ۱۶۹ (تبدیل اسید آمینه ۵۷ اسید آسپارتیک به هیستیدین) سبب مقاومت ذاتی آن به پیرازینامید می‌شود (۱۰، ۱). از این خاصیت می‌توان در تشخیص مایکوباکتریوم بوویس و مایکوباکتریوم بوویس BCG از مایکوباکتریوم توبرکلوزیس استفاده کرد. ناگفته نماند، هر تغییری در اسید آمینه ی ۵۷ دلیل بر مایکوباکتریوم بوویس بودن ارگانسیم نیست؛ برای مثال تغییر در اسید نوکلئیک ۱۷۰ (۱۱) یا تغییر اسید آمینه ی ۵۷ به اسید آمینه‌ای به جز

افتراق اعضای MTB برای پیشبرد درمان موفق، به ویژه در مناطقی که بیماری به صورت اپیدمیک در می‌آید یا تماس انسان و حیوان زیاد است، ضروری می‌باشد (۳)؛ چرا که میزان مرگ و میر ناشی از مایکوباکتریوم بوویس بیشتر از مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می‌باشد (۴).

تشخیص مایکوباکتریوم بوویس و مایکوباکتریوم بوویس BCG از دیگر اعضای MTB به دلیل مقاومت ذاتی (۵) آن‌ها به آنتی‌بیوتیک پیرازینامید از اهمیت راهبردی برخوردار است (۶، ۳). این در حالی است که مقاومت به پیرازینامید در مایکوباکتریوم‌های غیر MTB عمومیت ندارد (۷). پیرازینامید جزء داروهای خط اول مقابله با بیماری سل و توانا به کشتن باکتری‌های نیمه خفته و اغلب داخل سلولی است. این خصوصیات امکان کاهش زمان درمان از ۱۲ تا ۱۸ ماه به ۶ ماه را امکان‌پذیر می‌کند (۸).

نیکوتینامید به عنوان پیش دارو تحت تأثیر آنزیم پیرازینامیداز (PZAase) باکتریایی به داروی مؤثر پیرازینوئیک اسید (POA) تبدیل می‌شود (۱۰-۹). آنزیم پیرازینامیداز را ژن *pncA* کد می‌کند، غالب موتاسیون‌ها در این ژن سبب از دست رفتن فعالیت آنزیم و در نتیجه مقاومت به دارو می‌شود (۱۱).

روش‌های کلاسیک تفریق مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و مایکوباکتریوم بوویس و تست‌های حساسیت به دارو بر پایه‌ی احیای نیترا، فعالیت آنزیم PZNase، تجمع نیاسین و رشد در محیط تیوفن ۲-کربوکسیلیک اسید هیدروژید استوار است (۱۲). حال آن که این روش‌ها مشکلاتی به همراه دارند. نیاز به زمان زیاد برای کشت و نیاز به محیط با pH پایین برای فعال شدن آنزیم که تا ۵۰ درصد از تشکیل کلنی

هیستیدین (۱۶) از این دسته هستند.

اولین بار Scorpio و همکاران پیشنهاد دادند که از موقعیت ۱۶۹ ژن pncA با کمک روش PCR-SSCP (Polymerase chain reaction-Single-strand conformation polymorphism) در جداسازی مایکوباکتریوم بوویس از مایکوباکتریوم توبرکلوزیس استفاده شود (۱۷، ۵). Espinosa de los Monteros و همکاران در اسپانیا با ادامه ی همین نظر و طراحی Allele-specific PCR، علاوه بر کنار گذاشتن مشکلات PCR-SSCP، بر سرعت عمل تشخیص مایکوباکتریوم بوویس افزودند (۱۲)؛ گرچه این روش هم خالی از اشکال نبود.

هدف از انجام پژوهش حاضر، مقایسه ی روش های Allele-specific PCR و PCR-RFLP (PCR-Restriction fragment length polymorphism) در رسیدن به روشی قابل اعتمادتر و سریع تر در تشخیص مایکوباکتریوم بوویس از سایر اعضای MTB و مقایسه ی آن ها با نتایج Spoligotyping به عنوان شاهد و مقایسه با نتایج فنوتیپیک (آنتی بیوگرام) برای بررسی ارتباط این جهش و مقاومت به دارو بود.

روش ها

محیط کشت انتخابی LJ (Lowenstein Jensen) برای جداسازی اولیه ی سویه های مایکوباکتریوم استفاده شد و برای شناسایی سویه ها از تست های نیاسین و کاتالاز و احیای نیترات استفاده گردید (۱۸).

آنتی بیوگرام توسط آزمون حساسیت باکتری به پیرازینامید با کمک محیط 7H10agar و با غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر دارو انجام شد. ۹/۵ گرم از محیط آماده ی 7H10agar در ۴۵۰ میلی گرم آب مقطر

حل و به آن ۳/۳ گرم مونو پتاسیم فسفات، ۰/۵ گرم کازین هیدرولیز و ۲/۵ میلی لیتر گلیسرول اضافه شد. ۵۰ میلی لیتر OADC بعد از اتوکلاو و رسیدن به دمای ۵۴ درجه ی سانتی گراد به محلول اضافه و به دو ظرف تقسیم شد (مطابق دستور شرکت سازنده ی DIFCO). فلاکس اول حاوی ۲/۵ میلی لیتر محلول پیرازینامید ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر در ۲۴۷ میلی لیتر از محلول 7H10agar و فلاکس دوم بدون آنتی بیوتیک تهیه شد. محلول ها در لوله های آزمایش تقسیم و بعد از تلقیح نمونه و گذشت ۲۱ روز رشد یا عدم رشد پرگنه، تعیین کننده ی حساسیت باکتری به دارو بود (۱۹).

از روش CTAB به کار رفته توسط Miyata و همکاران جهت استخراج DNA استفاده شد (۲۰). بعد از غیر فعال کردن باکتری با دمای ۸۰ درجه ی سانتی گراد و مدت ۲۰ دقیقه، محلول رویی با سانتریفیوژ (۴۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه) جدا و با بافر (1x) TE به حجم ۱۰ میلی لیتر رسانیده شد. با سانتریفیوژ مجدد و اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر آنزیم لیزوزیم و ۴۵۰ میکرولیتر بافر (1x) TE به رسوب، در ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت. سپس به هر نمونه ۷۲/۵ میکرولیتر محلول ۱۰ درصد SDS و پروتیناز K اضافه و به مدت یک روز در دمای ۶۵ درجه ی سانتی گراد قرار داده شد. به هر نمونه ۱۰۰ میکرولیتر NaCl با غلظت ۵ مولار و ۱۰۰ میکرولیتر CTAB/NaCl اضافه و بعد از ورتکس در دمای ۶۵ درجه ی سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد. به هر میکروتیوب، ۷۵۰ میکرولیتر از مخلوط کلروفرم ایزوآمیل الکل اضافه و بعد از سانتریفیوژ به رسوب هر نمونه به ازای هر ۱۰۰۰ میکرولیتر محلول ۶۰۰

توبرکلوزیس و در مخلوطی دیگر ۱۵ پیکومول MT، ۱۵ پیکومول MB برای میکوباکتریوم بوویس و ۱ واحد از آنزیم Taq شرکت سیناژن برای مخلوط نهایی ۲۵ میکرولیتر استفاده شد.

برنامه‌ی PCR هم به ترتیب ۱ سیکل ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۱۰ دقیقه (Initial denaturation)، ۳۰ سیکل ۹۴ درجه (Denaturation)، ۶۴ درجه (Annealing) و ۷۲ درجه (Synthesis) هر کدام ۱ دقیقه و برای مرحله‌ی تکثیر نهایی ۱ سیکل ۷۲ درجه (Final synthesis) برای ۱۰ دقیقه دنبال شد. در انتها نتایج تکثیر PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد با اندازه‌ی ۱۸۵ bp برای میکوباکتریوم توبرکلوزیس یا میکوباکتریوم بوویس قابل مشاهده بودند.

در روش PCR-RFLP در گام اول برای PCR از دو پرایمر *pncA-F* و *pncA-R* (جدول ۱) به ترتیب با غلظت‌های ۵ و ۸ پیکومول، ۰/۲ میلی‌مول dNTP، ۵ میکرولیتر PCR-Buffer (۰/۲ میلی‌مول Tris-HCl، pH برابر ۸/۸، ۰/۱ مول KCl، ۰/۱ مول (NH₄)₂SO₄ و ۱/۵ مول (MgCl₂)، ۲/۵ مول MgCl₂ و ۱ واحد Taq شرکت سیناژن برای مخلوط نهایی ۵۰ میکرولیتر مورد استفاده قرار گرفت.

میکرولیتر ایزوپروپانول اضافه و ۲۴ ساعت در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس به رسوب، ۱۰۰۰ میکرولیتر الکل ۷۰ درصد افزوده و بعد از سانتریفیوژ، خشک کردن و افزودن ۳۰ میکرولیتر بافر TE (۱x) در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳ تا ۴ ساعت، نمونه‌ها آماده‌ی اندازه‌گیری با دستگاه پیکودراپ بودند (۲۰).

بعد از تأیید وجود DNA با اسپکتروفتومتر و تعیین مقدار آن، تکثیر به روش‌های Allele-specific PCR مطابق با گزارش Espinosa de los Monteros و همکاران (۱۲) انجام شد و از پرایمرهای سه‌گانه‌ی MT، MB و TB (جدول ۱)؛ به این صورت که به ترتیب پرایمر فوروارد مشترک، پرایمر با انتهای ۳'-G برای میکوباکتریوم بوویس و پرایمر با انتهای ۳'-C برای میکوباکتریوم توبرکلوزیس بودند استفاده و ترکیبات مخلوط PCR به صورت زیر فراهم گردید: ۰/۰۴ میلی‌مول dNTP، ۲ میلی‌مول MgCl₂، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (۰/۲ میلی‌مول Tris-HCl، pH برابر ۸/۸، ۰/۱ مول KCl، ۰/۱ مول (NH₄)₂SO₄ و ۱/۵ مول (MgCl₂) در یک مخلوط جداگانه‌ی ۵ پیکومول پرایمر TB، ۵ پیکومول پرایمر MT برای میکوباکتریوم

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه‌ی حاضر در روش‌های Allele-specific PCR، PCR-RFLP

Spoligotyping و

پرایمرها	توالی (۵'→۳')	روش
TB	۵'-ATGCGGGCGTTGATCATCGTC-۳'	Allele-specific
MB	۵'-CGGTGTGCCGAGAAGCCG-۳'	Allele-specific
MT	۵'-CGGTGTGCCGAGAAGCGG-۳'	Allele-specific
<i>pncA-F</i>	۵'-GGCGTCATGGACCCTATATC-۳'	PCR-RFLP
<i>pncA-R</i>	۵'-CAACAGTTCATCCCGGTTCC-۳'	PCR-RFLP
DRa5'biotinylated	۵'-GGTTTTGGGTCTGACGAC-۳'	Spoligotyping
DRb	۵'-CCGAGAGGGGACGGAAAC-۳'	Spoligotyping

مایکوباکتریوم بوویس و ۹۵ نمونه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس تشخیص داده شد. شکل ۱ گویای حضور یا عدم حضور باند ۱۸۵ bp جدا کننده دو گونه مایکوباکتریوم است.



شکل ۱. محصول ۳۲۰ bp در روش Allele-specific PCR.

مخلوط A: تهیه شده توسط پرایمرهای TB و MT.

مخلوط B: تهیه شده توسط پرایمرهای TB و MB.

Rv: مایکوباکتریوم توبرکلوزیس سویه استاندارد H37Rv.

Bov: مایکوباکتریوم بوویس.

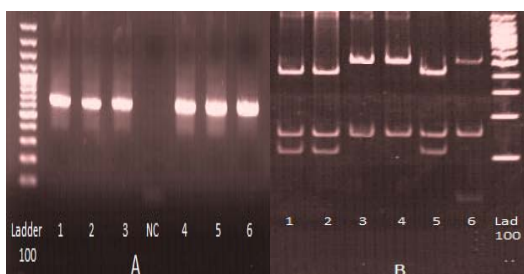
NC: شاهد منفی. ۱: Rv* با مخلوط B. ۲: Bov** با مخلوط A. ۳:

Rv با مخلوط A. ۴: Bov با مخلوط B. ۵ و ۷: نمونه‌ی بیمار مبتلا به

مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به ترتیب با مخلوط A و B. ۶ و ۸: نمونه‌ی

بیمار مبتلا به مایکوباکتریوم بوویس به ترتیب با مخلوط B و A.

از طرف دیگر تکثیر ژن و هضم با آنزیم BstEII (شکل ۲) در روش PCR-RFLP با نتایج به دست آمده از روش Allele-specific با کمک آزمون χ^2 با حساسیت و ویژگی ۱۰۰ درصد مطابقت داشت.



شکل ۲. A: محصول PCR با کمک پرایمرهای *pncA-F* و

pncA-R. B: هضم با آنزیم BstEII.

۱ و ۲: بیماران مبتلا به مایکوباکتریوم توبرکلوزیس. ۳ و ۴: بیماران

مبتلا به مایکوباکتریوم بوویس. ۵: مایکوباکتریوم توبرکلوزیس سویه‌ی

استاندارد H37Rv. ۶: مایکوباکتریوم بوویس.

برنامه‌ی PCR هم به ترتیب ۱ سیکل ۹۵ درجه Initial denaturation به مدت ۵ دقیقه، ۴۰ سیکل ۹۵ درجه Denaturation هر یک به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۰ درجه Annealing به مدت ۴۰ ثانیه، ۷۲ درجه Synthesis به مدت ۱ دقیقه و ۱ سیکل انتهایی ۷۲ درجه برای Final synthesis برای ۱۰ دقیقه ادامه پیدا کرد (۵). بعد از مشاهده‌ی باند ۶۷۰ bp روی ژل آگارز ۱/۵ درصد در گام بعدی هضم با آنزیم محدود کننده‌ی BstEII برای اولین بار در این تحقیق بر مبنای برش آنزیمی در ناحیه‌ی پالیندرومی '5'G↓GTNACC3' جهت تعیین موتاسیون در نقطه‌ی ۱۶۹ ژن *pncA* مورد استفاده قرار گرفت. مشاهده باندهای ۱۳۶ bp، ۴۲۳ bp و ۱۰۳ bp برای م. توبرکلوزیس و ۵۲۶ bp و ۱۴۶ bp برای م. بوویس روی ژل پلی آکریل آمید ۸ درصد در مرحله‌ی آخر وجه تفاوت مایکوباکتریوم بوویس و مایکوباکتریوم توبرکلوزیس است.

یافته‌ها

از میان ۹۸ نمونه‌ی جمع‌آوری شده از بیماران مراجعه کننده به مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی پژوهشکده‌ی سل و بیماری‌های ریوی بیمارستان مسیح دانشوری تهران، بعد از تشخیص میکروسکوپی وجود باسیل سل، کشت و آنتی‌بیوگرام نمونه‌ها در محیط حاوی پیرازینامید، ۲۸ نمونه (۲۸/۵۷ درصد) به دارو مقاوم، ۵۴ نمونه (۵۵/۱ درصد) حساس و ۱۶ نمونه (۱۶/۲۳ درصد) بدون رشد (نه در لوله‌ی نمونه نه در لوله‌ی شاهد) بود.

از تعداد ۹۸ نمونه، بعد از استخراج DNA به روش CTAB، با کمک روش Allele-specific، ۳ نمونه

جدول ۲. نتایج روش‌های Allele-specific PCR-RFLP و آنتی‌بیوگرام

PCR- RFLP	Allel-specific	Spoligotyping	Antibiogram
			R (۲) مایکوباکتریوم بوویس
۳/۱	۳/۱	۳/۱	S (۱)
			R (۲۶) مایکوباکتریوم
۹۶/۹	۹۶/۹	۹۶/۹	S (۵۵/۱) توبرکلوزیس
			N (۱۵/۶)

R: مقاومت دارویی، S: حساسیت به دارو، N: بدون رشد

امکان‌پذیر نمی‌باشد. از این رو در تشخیص و افتراق سویه‌های مایکوباکتریوم، به ویژه مایکوباکتریوم بوویس (تحقیق حاضر)، به روش‌های سریع‌تر و ارزان‌تری اتکا شده است که Allele-specific ارائه شده توسط Espinosa de los Monteros و همکاران (۱۲) و روش PCR-RFLP در این تحقیق از آن جمله است.

بر اساس مقایسه‌ی نتایج، دو روش مذکور قادر به شناسایی مایکوباکتریوم بوویس از مایکوباکتریوم توبرکلوزیس هستند، اما نمی‌توانند مایکوباکتریوم بوویس را از مایکوباکتریوم بوویس BCG جدا نمایند. با این حال در نوزادان با علائم بالینی بعد از واکسیناسیون BCG یا در افراد مشکوک به سل گاوی در تماس نزدیک با حیوانات می‌توانند مفید فایده باشند؛ به خصوص که بر اساس تحلیل Fingerprinting انجام شده در تحقیق Majoor و همکاران (۴) ما بین سال‌های ۱۹۹۳ تا ۲۰۰۷ انتقال مایکوباکتریوم بوویس از انسان به انسان نادر بوده است.

با وجود مشاهده نشدن تفاوت معنی‌دار در نتیجه‌ی هر کدام از تکنیک‌های یاد شده، مواردی وجود دارند که این روش‌ها را از همدیگر متمایز و بسته به تشخیص محقق ارجح می‌کنند. روش Allele-specific نیاز به زمان کمتر دارد، در حالی که PCR-RFLP با احتساب مراحل بعد از PCR و هضم آنزیمی طولانی‌تر خواهد بود. همچنین Allele-specific روشی ارزان‌تر و

با این حال از جمله موارد اختلاف دو روش مقدار DNA مورد نیاز برای هر کدام از روش‌ها بود. DNA به مقدار حداقل ۳۵ نانوگرم برای روش PCR-RFLP و حداقل ۱۵۰ نانوگرم برای روش Allele-specific مورد نیاز است تا تکثیر مطلوب صورت پذیرد. لازم به ذکر است مقادیر زیاد DNA در روش Allele-specific ارائه شده توسط Espinosa de los Monteros و همکاران به دلیل احتمال بالای Mismatch، به راحتی سبب ظهور باندهای غیر اختصاصی می‌شود (۱۲)، در حالی که مقادیر بالای DNA حتی تا ۲۵۰ نانوگرم هم در روش RFLP ارائه شده در این تحقیق، باندهای غیر اختصاصی به دنبال ندارد. به جهت کنترل یافته‌های به دست آمده از روش‌های یاد شده وجود مایکوباکتریوم بوویس توسط Spoligotyping تأیید شد و در جدول ۲ نشان داده شده است. نبود ۵ فاصله‌انداز آخر در روش Spoligotyping نشان دهنده‌ی مایکوباکتریوم بوویس است. در این پروژه نتایج حاصل از Allele-specific و PCR-RFLP با نتایج حاصل از Spoligotyping همخوانی کامل داشت.

بحث

اگرچه روش‌های Sequencing و Spoligotyping در تشخیص گونه و سویه‌ی مایکوباکتریوم از دقت بالایی برخوردار هستند، اما دسترسی آن‌ها برای همه‌ی آزمایشگاه‌ها به دلیل نیاز به زمان و هزینه‌ی بالا

آسان تر در تشخیص است؛ چرا که برای مشاهده و تحلیل نتایج آن فقط به ژل آگارز نیاز دارد (۱۲).

عیب این روش دقت کمتر به دلیل احتمال عدم تطبیق (Mismatch) بالا است. با وجود یک نوکلئوتید متغیر در انتهای ۳' پرایمر ریورس احتمال خطا وجود خواهد داشت؛ گو این که در عمل در صورت تنظیم نبودن مقدار DNA باند های غیر اختصاصی زیادی وجود خواهد داشت (۱۲).

از طرف دیگر، میزان شیوع مایکوباکتریوم بوویس در جمعیت انسانی مبتلا به سل در کشورهای مختلف متفاوت است. برای مثال در مطالعه‌ی de Kantor و همکاران (۲۵)، از ۱۰ کشور آمریکای جنوبی بین سال های ۱۹۷۰ تا ۲۰۰۷ این عدد از ۰/۴۳ تا ۱ درصد متغیر بود، در حالی که در تحقیقی در هلند ۱/۴ درصد (۴) و در مجموعه‌ای از چند کشور اروپای شرقی به صورت میانگین ۰/۲۱ درصد گزارش شد (۲۶). در این تحقیق این رقم تا ۳/۱ درصد به دست آمد. با توجه به این که انتقال از انسان به انسان برای مایکوباکتریوم بوویس به ندرت اتفاق می‌افتد، بنابراین ممکن است این عدد ناشی از انتقال حیوان به انسان بوده باشد. ناگفته نماند، موردی از انتقال انسان به انسان (انتقال از یک پسر ۵ ساله به خواهر ۱ ساله اش با آبروسل) توسط ولایتی و همکاران، مطلق بودن انتقال سل گاوی تنها از حیوان به انسان را رد می‌کند (۲۷).

آن چه در روش Spoligotyping به دست آمد به دلیل دقت و حساسیت بالای این روش (۲۱)، به عنوان شاهد در نظر گرفته شد و با مقایسه‌ی نتایج Allele-specific و PCR-RFLP با Spoligotyping، آن چه تحت عناوین Beijing, Haarlem, CAS, X family و T family دسته‌بندی می‌شوند، سویه‌های

مایکوباکتریوم توبرکلوزیس هستند که به همراه الگوی Spoligotyping Bov (مایکوباکتریوم بوویس) با نتایج دو روش مذکور منطبق بود.

با توجه به این که اغلب هر جهشی در ژن *pncA* سبب مقاومت می‌شود و نقطه‌ی ۱۶۹ نیز از این قاعده‌ی مثنی نیست، مایکوباکتریوم بوویس که در این نقطه تغییر C به G را نشان می‌دهد، باید به پیرازینامید مقاوم باشد؛ در عمل در آزمون آنتی بیوگرام هم همین گونه بود؛ برعکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس که بدون تغییر در نقطه‌ی ۱۶۹ به این دارو حساس است.

همان طور که در جدول ۲ نشان داده شده است، همه‌ی نمونه‌هایی که با روش‌های Allele-specific و RFLP مایکوباکتریوم بوویس تشخیص داده شده‌اند، با آنتی بیوگرام هم مقاوم به پیرازینامید بودند. این نتیجه از فرضیه‌ی Scorpio و همکاران (۵) مبنی بر ارتباط این نقطه و مقاومت ذاتی مایکوباکتریوم بوویس به پیرازینامید دفاع می‌کند.

در مجموع این دو روش به عنوان کاندیدهای افتراق مایکوباکتریوم بوویس از مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مطرح بوده است و به پزشک در شناسایی مایکوباکتریوم بوویس و عدم تجویز داروی استراتژیک پیرازینامید در این بیماران کمک می‌کند.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران به شماره‌ی ۸۸۰۸۴۸۶۶۴ است. نویسندگان از مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی، پژوهشکده‌ی سل و بیماری‌های ریوی و کارکنان محترم به جهت پشتیبانی در اجرای این طرح پژوهشی کمال امتنان را دارند.

References

1. Somoskovi A, Dormandy J, Parsons LM, Kaswa M, Goh KS, Rastogi N, 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. *J Clin Microbiol* 2007; 45(2): 595-9.
2. Mostowy S, Cousins D, Behr MA. Genomic interrogation of the *dassie* bacillus reveals it as a unique RD1 mutant within the Mycobacterium tuberculosis complex. *J Bacteriol* 2004; 186(1): 104-9.
3. Barouni AS, Augusto CJ, Lopes MT, Zanini MS, Salas CE. A *pncA* polymorphism to differentiate between Mycobacterium bovis and Mycobacterium tuberculosis. *Mol Cell Probes* 2004; 18(3): 167-70.
4. Majoor CJ, Magis-Escurra C, van IJ, Boeree MJ, van SD. Epidemiology of Mycobacterium bovis disease in humans, The Netherlands, 1993-2007. *Emerg Infect Dis* 2011; 17(3): 457-63.
5. Scorpio A, Lindholm-Levy P, Heifets L, Gilman R, Siddiqi S, Cynamon M, et al. Characterization of *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41(3): 540-3.
6. Jureen P, Werngren J, Toro JC, Hoffner S. Pyrazinamide resistance and *pncA* gene mutations in Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52(5): 1852-4.
7. Sun Z, Scorpio A, Zhang Y. The *pncA* gene from naturally pyrazinamide-resistant Mycobacterium avium encodes pyrazinamidase and confers pyrazinamide susceptibility to resistant M. tuberculosis complex organisms. *Microbiology* 1997; 143(Pt 10): 3367-73.
8. Lee KW, Lee JM, Jung KS. Characterization of *pncA* mutations of pyrazinamide-resistant Mycobacterium tuberculosis in Korea. *J Korean Med Sci* 2001; 16(5): 537-43.
9. Sekiguchi J, Nakamura T, Miyoshi-Akiyama T, Kirikae F, Kobayashi I, Augustynowicz-Kopec E, et al. Development and evaluation of a line probe assay for rapid identification of *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant mycobacterium tuberculosis strains. *J Clin Microbiol* 2007; 45(9): 2802-7.
10. Shenai S, Rodrigues C, Sadani M, Sukhadia N, Mehta A. Comparison of phenotypic and genotypic methods for pyrazinamide susceptibility testing. *Indian J Tuberc* 2009; 56(2): 82-90.
11. Barco P, Cardoso RF, Hirata RD, Leite CQ, Pandolfi JR, Sato DN, et al. *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant Mycobacterium tuberculosis clinical isolates from the southeast region of Brazil. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58(5): 930-5.
12. Espinosa de los Monteros LE, Galan JC, Gutierrez M, Samper S, Garcia Marin JF, Martin C, et al. Allele-specific PCR method based on *pncA* and *oxyR* sequences for distinguishing Mycobacterium bovis from Mycobacterium tuberculosis: intraspecific M. bovis *pncA* sequence polymorphism. *J Clin Microbiol* 1998; 36(1): 239-42.
13. Taylor GM, Goyal M, Legge AJ, Shaw RJ, Young D. Genotypic analysis of Mycobacterium tuberculosis from medieval human remains. *Microbiology* 1999; 145(Pt 4): 899-904.
14. Herrera EA, Segovia M. Evaluation of *mtp40* genomic fragment amplification for specific detection of Mycobacterium tuberculosis in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1996; 34(5): 1108-13.
15. Weil A, Plikaytis BB, Butler WR, Woodley CL, Shinnick TM. The *mtp40* gene is not present in all strains of Mycobacterium tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1996; 34(9): 2309-11.
16. Yuksel P, Tansel O. Characterization of *pncA* mutations of pyrazinamide-resistant Mycobacterium tuberculosis in Turkey. *New Microbiol* 2009; 32(2): 153-8.
17. Scorpio A, Collins D, Whipple D, Cave D, Bates J, Zhang Y. Rapid differentiation of bovine and human tubercle bacilli based on a characteristic mutation in the bovine pyrazinamidase gene. *J Clin Microbiol* 1997; 35(1): 106-10.
18. Amirmozafari N, Ramezanzadeh R, Farnia P, Ghazi F. The Frequency of Beijing Genotype of Mycobacterium Tuberculosis Isolated from Tuberculosis Patients. *rjms* 2006; 13(52): 7-17.
19. Farnia P, Varahram M, Doraghi M, et al. Druge Susceptibility Test Against Mycobacterium Tuberculosis. Tehran: Mycobacteriology Research Center (MRC), National Research Institute of Tuberculosis and Lung Disease (NRITLD); 2007.
20. Miyata M, Barreto Santos AC, Mendes NH, Cunha EA, Melo FA, Leite CQ. Assessment of the quality of dna extracted by two techniques from Mycobacterium tuberculosis for fast molecular identification and genotyping. *Braz J Microbiol* 2011; 42(2): 774-7.
21. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van AM, van SD, Kuijper S, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of Mycobacterium tuberculosis for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* 1997; 35(4): 907-14.
22. Kazempour M, Masjedi MR, Velayati AA, Tajeddin E, Farnia P, Kargar M, et al. Identification of mycobacterium tuberculosis

- beijing genotype using three different molecular methods. *Koomesh* 2009; 11(1): 7-14.
23. Velayati AA, Farnia P, Mirsaedi M, Reza MM. The most prevalent *Mycobacterium tuberculosis* superfamilies among Iranian and Afghan TB cases. *Scand J Infect Dis* 2006; 38(6-7): 463-8.
24. 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 J Med Microbiol* 2009; 27(4): 306-10.
25. de Kantor IN, Ambroggi M, Poggi S, Morcillo N, Da Silva Telles MA, Osorio RM, et al. Human *Mycobacterium bovis* infection in ten Latin American countries. *Tuberculosis (Edinb)* 2008; 88(4): 358-65.
26. Pavlik I, Yayo Ayele W, Havelkova M, Svejnochova M, Katalinic-Jankovi V. *Mycobacterium bovis* in human population in four Central European countries during 1990–1999. *Vet Med - Czech* 2003; 48(4): 90-8.
27. Velayati AA, Farnia P, Boloorsaze MR, Sheikholislami 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.

The Study of PncA Gene Using PCR-RFLP and Allele-Specific PCR Methods in Distinguishing Mycobacterium Bovis from Mycobacterium Tuberculosis

Mohammad Reza Allahyar Torkaman¹, Fatemeh Maryam Sheikholslami PhD², Parisa Farnia PhD³, Mohammad Hassan Shahhosseiny PhD⁴, Mohadeseh Mozafari MSc², Mehdi Shamsi², Mohammad Reza Masjedi MD⁵, Ali Akbar Velayati MD⁵

Abstract

Background: Bovine tuberculosis is a chronic bacterial disease of cattle that occasionally affects human. A unique mutation at position 169 (C→G) in Mycobacterium bovis differentiates it from Mycobacterium tuberculosis. For the first time, PCR-RFLP method was used in this study to separate the two organisms.

Methods: In this study, 98 tuberculosis patients were assessed using microscopic evaluations, culture and antibiogram. Then, nucleotide changes in position 169 were investigated using Allele-specific PCR and PCR-RFLP methods. Finally, the results were compared with spoligotyping results .

Findings: Antibiogram revealed 28 subjects (28.57%) to be resistant and 54 (55.1%) to be sensitive to pyrazinamide while and 16 cases (16.23%) showed no growth. Of 28 resistant patients, 3 (3.1%) were diagnosed with M. Bovis using the classical methods. Using molecular methods, 95 (96.93%) out of 98 subjects were diagnosed with M. tuberculosis and 3 (3.06%) with M. bovis. Allele-specific PCR and PCR-RFLP matched with spoligotyping results.

Conclusion: Our result showed the incidence of M. bovis infection to be higher in Iranian population (3.1%) than other studied cases (0.5-1%). In addition, we showed that Allele-specific PCR is the method of choice because it is faster and cheaper than PCR-RFLP. However, PCR-RFLP could be a proper alternative to prevent probable mismatches in Allele-specific PCR.

Keywords: Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium bovis, Allele-specific PCR, PCR-RFLP, PncA.

¹ Department of Biology, Sciences and Research Branch, Islamic Azad University and Mycobacteriology Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

² Mycobacteriology Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

³ Associate Professor, Mycobacteriology Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

⁴ Associate Professor, Department of Microbiology; Shahryar Branch; Islamic Azad University, Tehran, Iran.

⁵ Professor, National Research Institute of Tuberculosis and Lung Disease (NRITLD), Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Corresponding Author: Mohammad Reza Allahyar Torkaman, Email: mu.allahyar@gmail.com