

# بررسی فراوانی ژنوتیپ Beijing در نمونه های مایکوباکتریوم

## توبرکلوزیس جدا شده از بیماران مبتلا به سل شهر مشهد

محبوبه نادری نسب (Ph.D.) \*\*\*

پریسا فرنیا (Ph.D.) \*\*

مهدی روحانی (M.Sc.) \*

رضوان منیری (Ph.D.) \*\*\*\*\*

مهرانگیز خواجه کرم‌الدین (Ph.D.) \*\*\*\*\*

علی صادقیان (Ph.D.) \*\*\*\*

### چکیده

**سابقه و هدف:** ژنوتیپ Beijing یکی از مهمترین سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می‌باشد و نقاط مختلف دنیا در ارتباط با همه‌گیری‌های بیماری سل بوده است. با توجه به عدم دسترسی به اطلاعات در این زمینه در ایران، این مطالعه با هدف تعیین فراوانی این ژنوتیپ در شهر مشهد انجام پذیرفت.

**مواد و روش‌ها:** این مطالعه توصیفی بر روی ۱۱۳ نمونه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس جدا شده از بیماران مبتلا به سل مراجعه کننده به مراکز بهداشتی و بیمارستان‌های قائم (عج) و بیمارستان امام رضا (ع) شهر مشهد انجام پذیرفت. در این مطالعه اعضای خانواده ژنوتیپ Beijing با استفاده از روش Spoligotyping که یک روش مبتنی بر PCR است مورد شناسایی قرار گرفتند. اطلاعات حاصل با آمار توصیفی ارائه و فاصله اطمینان آن در جامعه برآورد گردید.

**یافته‌ها:** از مجموع ۱۱۳ نمونه مطالعه شده ۸ نمونه (۷/۱ درصد) [CI 95%, 2.36-11.84] متعلق به ژنوتیپ Beijing بود. از هشت نمونه جدا شده ۵ نمونه مربوط به بیماران افغان و سه نمونه متعلق به بیماران ایرانی بود. از هشت بیمار مبتلا به ژنوتیپ Beijing دو بیمار مرد و شش بیمار زن بودند.

**استنتاج:** اگر چه نسبت فراوانی این ژنوتیپ در ایران پائین تر از سایر کشورهای آسیایی می‌باشد اما باید با اتخاذ سیاست‌های مناسب از افزایش شیوع آن در ایران جلوگیری نمود.

**واژه های کلیدی :** مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، ژنوتیپ Beijing، مشهد

### مقدمه

سوش‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس ژنوتیپ Beijing می‌باشد که در ارتباط با اپیدمی‌های مختلفی در سراسر دنیا در بین جوامع مختلف بوده است (۲). ژنوتیپ Beijing

بیماری سل خطرناکترین بیماری عفونی حال حاضر جهان است که عامل آن بیشترین میزان مرگ و میر را در بین بیماری‌های عفونی بوجود می‌آورد (۱). یک گروه از

\* مؤلف مسئول: کاشان کیلومتر ۵ جاده راوند- گروه میکروب شناسی و ایمنی شناسی

\*\* متخصص باکتری شناسی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی مشهد

\*\*\*\* متخصص باکتری شناسی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی کاشان

\* کارشناس ارشد میکروب شناسی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کاشان

\*\* متخصص باکتری شناسی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران

\*\*\*\* متخصص باکتری شناسی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی مشهد

\*\*\*\* متخصص باکتری شناسی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان

اپیدمیولوژیک، بیماری‌زایی و مقاومت چند دارویی و عدم اطلاع از وضعیت آن در منطقه، شیوع این ژنوتیپ در نمونه‌های کلینیکی جدا شده از بیماران مبتلا به سل در شهر مشهد از آبان ماه ۸۳ تا اردیبهشت ۸۴ تعیین گردید.

## مواد و روش‌ها

بیماران و باکتری‌های ایزوله شده:

این مطالعه توصیفی بر روی ۱۱۳ نمونه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از بیماران مبتلا به بیماری سل ریوی که به مراکز بهداشتی و بیمارستان‌های امام رضا (ع) و قائم (عج) شهر مشهد مراجعه کرده بودند، انجام گرفت و تمامی نمونه‌ها در بخش مایکوباکتریولوژی بیمارستان مسیح دانشوری تهران مورد بررسی قرار گرفتند. همه این نمونه‌ها بر روی محیط‌های لون اشتاین جانسن و 7H9 کشت شدند و از نظر ظاهر کلنی و همچنین تست‌های بیوشیمیایی استاندارد مایکوباکتریوم توبرکلوزیس تشخیص داده شدند.

### استخراج DNA و Spoligotyping:

استخراج DNA در این مطالعه با استفاده از روش استاندارد Cetyl-Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB) انجام گرفت (۱۳). DNA استخراج شده طی پروتکل استاندارد در بافر 1X TE (10mM Tris, 1mM EDTA) در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد تا انجام مراحل بعدی نگهداری شدند. Spoligotyping (۱۴) با تکثیر لوکوس DR با استفاده از پرایمرهای 5'-GGTTTTGGGTCTGACGAC-3' DRa و 5'-CCGAGAGGGGACGGAAAC-3' DRb آغاز گردید (۱۴). (در شکل شماره ۱ لوکوس DR و نواحی تکثیری مشاهده می‌شوند.) سپس محصولات PCR بر

مایکوباکتریوم توبرکلوزیس برای اولین بار در اطراف شهر پکن تشخیص داده شد و این ژنوتیپ در اواسط دهه ۱۹۵۰ میلادی تنها در کشورهای جنوب شرقی آسیا یافت می‌شد (۳). اما اخیراً این ژنوتیپ در ارتباط با بسیاری از همه‌گیری‌های بیماری سل در سراسر جهان از جمله آمریکا، آفریقای جنوبی، آلمان، جزایر قناری، روسیه و استونی تشخیص داده شده است و این Spoligotype شایع‌ترین Spoligotype در بین سویه‌های شناخته شده در سراسر جهان می‌باشد (۱ و ۴).

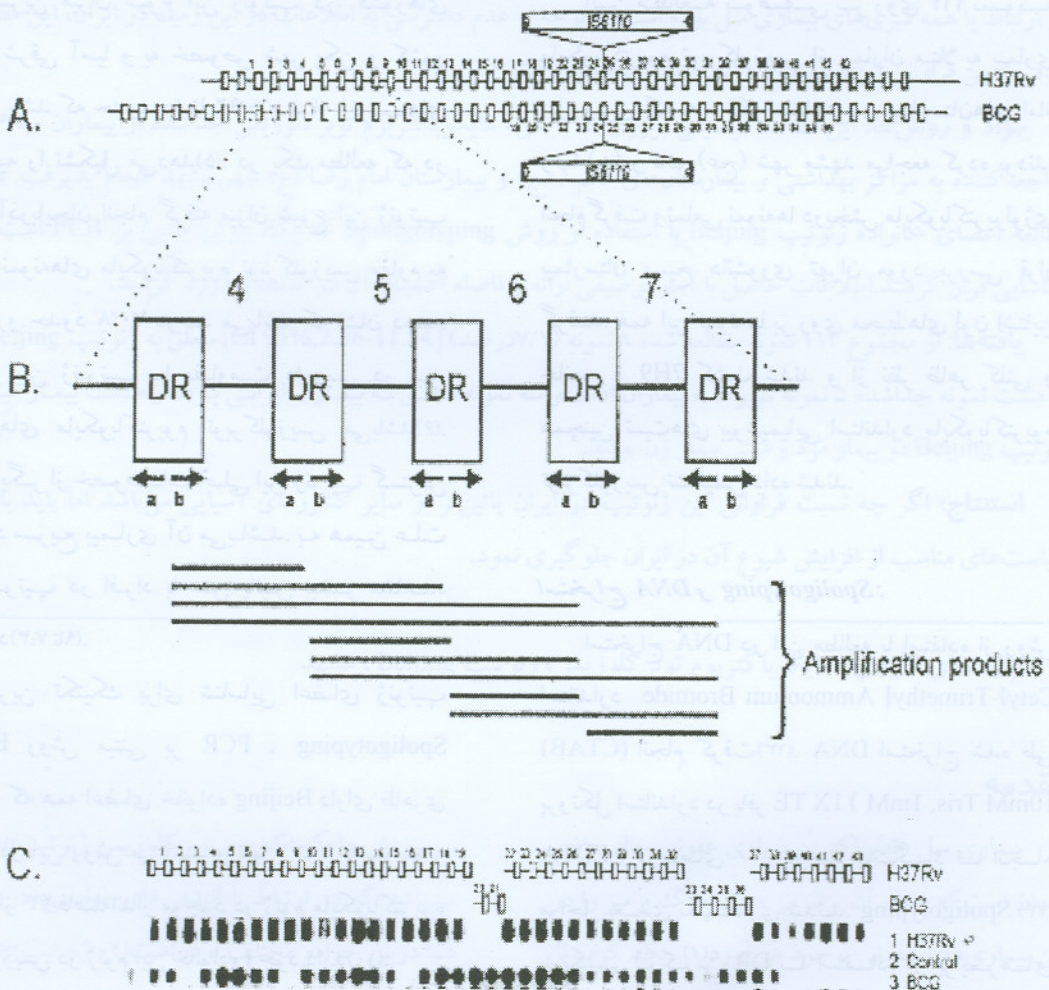
بیشترین میزان شیوع این ژنوتیپ در کشورهای جنوب شرقی آسیا و به خصوص شهر پکن و کشور چین می‌باشد که حدود ۸۰ تا ۹۲ درصد از ژنوتیپ‌های این ناحیه را تشکیل می‌دهد (۵). در یک مطالعه که در کشور آذربایجان انجام گرفته میزان شیوع این ژنوتیپ در بین نمونه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به چند دارو حدود ۷۰/۸ درصد می‌باشد که نشان دهنده ارتباط این ژنوتیپ با مقاومت دارویی در بین ژنوتیپ‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می‌باشد (۶). یکی دیگر از خصوصیات اصلی این ژنوتیپ گسترش و ایجاد سریع بیماری آن می‌باشد. به همین علت این ژنوتیپ در افراد با سن پایین بیشتر مشاهده می‌گردد (۳، ۷، ۹).

بهترین تکنیک برای شناسایی اعضای ژنوتیپ Beijing روش مبتنی بر PCR ، Spoligotyping می‌باشد که همه اعضای خانواده Beijing دارای ظاهری یکسان در این روش می‌باشند و تنها ۱ تا ۹ فاصله انداز انتهایی از ۴۳ فاصله‌انداز موجود در ژنوم مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در ژنوم این خانواده وجود دارد (۱۰).

با توجه به شیوع ۲۶ مورد در هر ۱۰۰ هزار نفر بیماری سل در استان خراسان (۱۱) مجاورت این استان با کشورهای افغانستان و پاکستان، هجوم بی‌رویه مهاجران به این استان و اهمیت ژنوتیپ Beijing از نقطه نظر

بر روی فیلم‌های (Amersham, Bukhhghkhj, UK) در اشعه X طی یک شبانه‌روز مجاورت ظاهر گردید. در تکنیک Spoligotyping از سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس H37Rv و BCG P3 که سویه‌های استاندارد هستند که دارای الگوی مشخص Spoligotype می‌باشند به عنوان کنترل استفاده گردید.

روی غشاء نایلونی آماده (Spoligotyping) (Isogene) (هلند) که اولیگونوکلئوتیدهای نواحی فاصله انداز بر روی آن ثابت شده‌اند، توسط دستگاه مینی بلاتر (Miniblotter45, Immunetics, Cambridge, MA) قرار گرفتند. سپس با استفاده از دستگاه هیبریدایزر در دمای ۴۲ درجه سانتیگراد همراه با محلول استریتایدین- پروکسیداز کونژوگه هیبریدزاسیون انجام گرفته و DNAهای هیبرید شده با استفاده از مایع تشخیص



شکل شماره ۱: A: B: لوکوس DR ونواحی تکثیر شده با اندازه های متفاوت، C: Spoligotyp های H37Rv و BCG به عنوان کنترل های انجام  
 اقتباس شده از [www.SID.ir](http://www.SID.ir)

## انجام تست حساسیت آنتی بیوتیکی:

تست آنتی بیوگرام بر اساس روش استاندارد با استفاده از داروهای ایزونیازید (۰/۲ و ۱ میلی گرم/ میلی لیتر)، ریفامپین (۱ میلی گرم/ میلی لیتر)، پیرازینامید (۵۰ میلی گرم/ میلی لیتر)، اتامبوتول (۵ و ۱۰ میلی گرم/ میلی لیتر) و استریتومايسين (۲ و ۱۰ میلی گرم/ میلی لیتر) در محیط لونشتاین جانسن انجام پذیرفت.

اطلاعات جهانی ثبت نشده‌اند. از Cluster ۱۷ مشاهده شده نیز ۸ Cluster در بانک اطلاعات جهانی ثبت نشده‌اند. باقی نمونه‌ها نمونه‌هایی بودند که در بانک اطلاعات جهانی حضور داشتند اما در این مطالعه تنها یک نمونه متعلق به آنها بود. این Spoligotype‌ها بر اساس کشوری که در آن جدا شده‌اند در جدول شماره ۲ آورده شده است.

## آنالیز داده ها:

الگوی حاصله از این ۱۱۳ نمونه بر روی فیلم‌های اشعه X استخراج گردید و الگوی Spoligo در نمونه‌های شهر مشهد با بانک اطلاعات جهانی Spoligotypها (SpolDB3) منتشر شده از سوی انستیتو پاستور Guadeloupe مقایسه گردید. در این مقایسه سویه‌هایی که قبلاً در بانک اطلاعات جهانی وجود داشتند با همان Shared type نام‌گذاری شدند و سویه‌هایی که تاکنون در بانک اطلاعات ثبت نشده‌اند با عنوان Not seen (دیده نشده) معرفی شدند. Spoligotype‌هایی که دارای بیش از یک عضو بودند را یک Cluster و آنهایی که تنها در یک سویه دیده شده Orphan معرفی گردید. اطلاعات به دست آمده با استفاده از آمار توصیفی آنالیز و فاصله اطمینان آن در جامعه برآورد گردید.

جدول شماره ۲: توزیع جغرافیایی Spoligotype های دیده شده در نمونه های شهر مشهد.

توزیع جغرافیایی	تعداد سویه ها	Share type
متروپولیتن، انگلستان، آمریکا، مالزی	۹	۱۰۰
در همه نقاط دنیا دیده شده است	۸	Beijing
استرالیا، اتریش، ایران، هلند، آمریکا	۳	۲۸۴
استرالیا (در بیماران هندی، انگلیسی، پاکستانی، سریلانکایی، میانمار)، آمریکا، هند، پاکستان	۲	۲۶
متروپولیتن، ایتالیا، هند، ویتنام	۲	۱۲۲
برزیل، اتریش	۱	۳۹۰
ایران، اتریش	۱	۵۹۹
انگلستان، ایران، هلند، سوئد، آمریکا	۱	۳۵۷
ایران، انگلستان، هلند، اتریش، متروپولیتن، سوئد، استرالیا (در بیمار افغان)، آمریکا	۱	۱۲۷
انگلستان، ایران	۱	۷۵۴
آمریکا، هلند، سوئد	۱	۷۷۷
انگلستان، استرالیا، هلند، پاکستان	۱	۳۸۱
متروپولیتن، انگلستان، هلند، ایران، سنگال، استرالیا (در بیمار ارتره ای)، آمریکا، گینه بیسائو	۲	۵۴

## یافته ها

از هشت نمونه ژنوتیپ Beijing جدا شده از بیماران شهر مشهد ۶ نمونه از زنان مسلول و ۲ نمونه از مردان جدا گردید. افراد مبتلا به این ژنوتیپ ۴ نفر افغان و ۴ نفر ایرانی بودند.

میانگین سن ابتلا به ژنوتیپ Beijing نیز در افراد مورد مطالعه پایین تر از میانگین سنی افراد مبتلا به سایر ژنوتیپ‌ها بود (۳۷/۵ سال نسبت به ۴۲/۵ سال).

مقاومت آنتی بیوتیکی در نمونه‌های ژنوتیپ Beijing در جدول شماره ۳ آورده شده است.

از مجموع این ۱۱۳ نمونه ۶۳ نمونه (۵۵/۷ درصد) در Cluster ۱۷ جداگانه قرار گرفتند. تمامی Spoligotype های مشاهده شده در این مطالعه در جدول شماره ۱ آورده شده است. از مجموع ۱۱۳ نمونه مطالعه شده ۸ نمونه متعلق به ژنوتیپ Beijing بود (۷/۰۸ درصد) [CI 95%, 2.36-11.84].

از مجموع ۱۱۳ نمونه جدا شده ۳۳ نمونه (۲۹/۲ درصد) هم نمونه‌های Orphan بودند که هنوز در بانک



جدول شماره ۳: مقاومت و حساسیت آنتی بیوتیکی ژنوتیپ‌های Beijing نسبت به داروهای ضد سل ردیف اول در نمونه های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس جدا شده از نمونه های کلینیکی شهر مشهد

بیرازینامید	انامبول	استرپتومایسین	ریفامپین	ایزونیازید	شماره ایزوله
S	S	R	S	S	۱۶۴۸
S	S	S	S	S	۱۶۶۱
S	R	R	R	R	۱۶۸۹
S	R	R	R	R	۱۶۵۷
S	S	R	S	R	۱۶۶۶
S	S	S	S	S	۱۶۷۱
S	S	S	S	S	۱۶۸۰
S	S	S	R	R	۸۵۸

S = حساس و R = مقاوم

## بحث

در این مطالعه فراوانی ژنوتیپ Beijing در شهر مشهد ۷/۱ درصد بود که تقریباً از سایر نقاط آسیا پایین تر می باشد. در بانک اطلاعات جهانی از مجموع ۱۳۰۰۸ سویه گزارش شده ۱۲۸۲ سویه (۱۱ درصد) متعلق به ژنوتیپ Beijing است که فراوان ترین ژنوتیپ در سراسر دنیا می باشد (۱).

در مطالعه Urvashi Balbir Singh در هندوستان میزان شیوع ژنوتیپ در دهلی ۸ درصد گزارش شده است (۱۴) و با توجه به این نکته که تعداد دیگری از ژنوتیپ های دیده شده در این مطالعه قبلاً در هندوستان مشاهده شده، از نظر اپیدمیولوژیک این نکته قابل تامل است.

در سایر مطالعات در اروپا میزان شیوع ژنوتیپ Beijing در کشورهای نزدیک آسیا مانند آذربایجان (۷۰/۸ درصد در نمونه های MDR-TB)، شمال غربی روسیه (۴۴/۵ درصد) و استونی (۲۹ درصد) گزارش شده است و میزان شیوع ۲۲/۵ درصد در مناطقی مانند جزایر قناری که مهاجرت از مناطق آسیایی به آنجا بالا می باشد، گزارش گردیده است (۱۵ و ۱۶). شیوع ژنوتیپ Beijing در سایر کشورهای اروپایی، دانمارک ۱ درصد

در افراد دانمارکی مسلول و ۳/۶ درصد در افراد خارجی مقیم دانمارک و فنلاند ۱/۱ درصد، پایین تر از سایر مناطق اروپایی گزارش شده است (۹ و ۱۰). شیوع ژنوتیپ Beijing در آفریقا با وجود بروز بالای بیماری سل، پائین است. در مطالعه Easterbrook در زیمبابوه از ۵۰۴ نمونه کار شده تنها ۴ نمونه به عنوان ژنوتیپ Beijing گزارش شده است (۷). بیشترین شیوع این ژنوتیپ در کشورهای آسیایی و به خصوص آسیای جنوب شرقی مشاهده گردیده است. شیوع این ژنوتیپ در چین (۹۰ درصد)، ویتنام (۵۳ درصد)، تایلند (۳۳/۳ درصد)، هنگ کنگ (۷۴ درصد)، مغولستان (۵۰ درصد) و اندونزی (۳۴ درصد) گزارش گردیده است (۵). در مطالعه ای که در بین سالهای ۱۹۹۵ تا ۱۹۹۹ میلادی انجام شده است نشان داده شده که در جزایر قناری این ژنوتیپ بر اثر مهاجرت های زیاد از یک شیوع پایین به ژنوتیپ غالب تبدیل شده است (۱۵).

در این مطالعه دامنه سنی ابتلاء به ژنوتیپ Beijing ۱۷ تا ۷۰ سال بود و ایجاد بیماری در افراد با سنین ۱۷، ۲۰ و ۲۴ سال در بین ۸ بیمار مبتلا به این ژنوتیپ، نشان دهنده اهمیت این ژنوتیپ در ایجاد بیماری در افراد با سنین پائین می باشد. در این مطالعه میزان شیوع در زنان بیش از مردان (۶ مورد زن در برابر ۲ مورد مرد) بود. در مطالعات مختلفی ارتباط بین این ژنوتیپ و ایجاد بیماری در افراد با سنین پائین نشان داده شده است. ژنوتیپ Beijing به علت انتقال فعال خود و ایجاد سریع تر بیماری دارای میانگین سنی ابتلاء پائین تری نسبت به سایر ژنوتیپ های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می باشد (۹ تا ۷). در این مطالعه نیز هر چند تعداد ژنوتیپ های Beijing مشاهده شده بالا نمی باشد اما در همین تعداد کم نیز میانگین سنی ابتلا به آن پایین تر از سایر ژنوتیپ ها می باشد.

در مطالعه گذشته نگری که روی نمونه های سال های ۱۹۵۶ تا ۱۹۹۰ میلادی شهر پکن انجام شده است ۶۵

اتخاذ سیاست‌های مناسب برای جلوگیری از انتشار این ژنوتیپ مهم از نظر بیماری‌زایی در کشور ضروری می‌باشد.

## سپاسگزاری

با تشکر از بخش پژوهشی بیمارستان مسیح دانشوری که هزینه‌های لازم برای انجام این پروژه را تأمین نمودند و همچنین پرسنل محترم بخش مایکوباکتریولوژی بیمارستان مسیح دانشوری که در انجام این پروژه کمک‌های بسیاری نمودند.

درصد نمونه‌ها متعلق به افراد زیر ۳۰ سال بوده و ۸۱ درصد از افراد مبتلا نیز مرد بوده‌اند (۳). اما در این مطالعه این خصوصیت به علت کم بودن تعداد نمونه‌های این ژنوتیپ مشاهده نشد.

با توجه به شیوع ۷/۱ درصد ژنوتیپ Beijing در شهر مشهد و این نکته که نیمی از این ژنوتیپ‌ها متعلق به بیماران افغانی مقیم مشهد بوده است و مهاجرت‌های بی‌رویه از مرزهای شرقی به ایران (با توجه شیوع بسیار بالای این بیماری در افغانستان و پاکستان و نبود اطلاعات کافی در مورد شیوع این ژنوتیپ در این کشورها)، لزوم

## فهرست منابع

1. Ingrid Filliol, Jeffrey R. Driscoll, Dick van Soolingen et al. Snapshot of moving and expanding clones of mycobacterium tuberculosis and their global distribution assessed by Spoligotyping in an international study. *J Clin Microbiol* 2003; (5): 1963-1970
2. Nguyen Thi Ngoctan, Hoang Thi kim Lien, et al. Mycobacterium tuberculosis Beijing Genotype and risk for treatment failure and relapse, Vietnam. *Emerg Infect Dis* 2003; 9(12): 1245-1250
3. Lishi Qian, Jan, D.A. Van Embden, Adri, G.M. Vander Zanden, et al. Retrospective analysis of the Beijing family of Mycobacterium tuberculosis in preserved lung tissues. *J Clin Microbiol* 2001; 37(2): 471-474.
4. Troels Lillebeak, Ase B. Andersen, Asger Dirksen, et al. Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype. *Emerg Infect Dis* 2003; 9(12): 1236-1241.
5. Glynn J.R, whiteley J, Bifani P.L, Kremer K, Van Soolingen D, Worldwide occurrence of Beijing /W strains of Mycobacterium tuberculosis asystematic review. *Emerg Infec Dis* 2002; 8: 843-848.
6. Gaby, E. Phyffer, Anni Strassle, Tamara van Gorkum, Multidrug resistant tuberculosis in Prison Inmates, Azerbaijan. *Research* 2001; 7(5): 345-349.
7. Philippa J. Easterbrook, Andrea Gibson, Shahed Murad et al. High rates of clustering of strainr Causing tuberculosis in Harare, Zimbabwe: a molecular epidemiological study. *J Clin Microbiol* 2004 Oct; p.4536-4544.
8. Nguyen Thi Ngoctan, Hoang Thi kim Lien, et al. Mycobacterium tuberculosis Beijing Genotype and risk for treatment failure and relapse, Vietnam. *Emerg Infect Dis* 2003; 9(12): 1245-1250.

9. Reinout Van Crevel, Ron H.H.Nelwan, Wilmadelenne, et al. Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype strains associated with fibrile response to treatment. *Emerg Infect Dis* 2001; 7(5): 841-845.
10. Kirsi Puustinen, Merja Marjamaki, NalinRastogi et al. Charactrization of Finnish Mycobacterium tuberculosis isolates by spohgotyping. *J Clin Microbiol* 2003; 4: 1525-1528.
11. اپیدمیولوژی بیماری سل در ایران و جهان - کنترل و سلامت وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی - ۱۳۸۲
12. Van Embden JDA, Cave MD, Crawford JT, et al. Strain identification of Mycobacterium tuberculosis by DNA fingerprinting: recommendation for a standardized methodology. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 406-409.
13. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, Van Agterveld M, Van Soolingen D, Kuijper S, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of Mycobacterium tuberculosis for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 907-14.
14. Urvashi Balbir Singh, Naya Suresh, N. Vijaya Bhanu et al. Predominant tuberculosis spoligotypes, Delhi, India. *Emerg Infect Dis* 2004; 10(6): 546-550.
15. Caminero J.A, Pena M.J, Emapos-Herrero M.I, et al. Epidemiological evidence of the spread of a mycobacterium tuberculosis strain of the Beijing genotype on Gran Canaria Island. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 1165-70.
16. Dale J.W, Brittain D, Cataldi A.A, Cousins D, Crawford J.T, et al. Soacer oligonucleotide typing of bacteria of the Mycobacterium tuberculosis complex: recommendation for standardised nomenclature. *Int J Tuberc Lung Dis* 2001; 5: 216-269.