مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی- مولکولی
دوره اول، شماره دوم، بهار 1390
Archive of SID

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

تایپینگ سوش های مایکوباکتریوم توبر کلوزیس جدا شده در بیماران شهر تهران با استفاده از Spoligotyping

سعید ذاکر بستان آباد[1]، اسماعیل جبارزاده*[2]، شاهین پور آذر[3]، مصطفی قلمی[4]

[1]استادیار، گروه میکروبیولوژی و بیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند، تهران- ایران
[2]استاد، بخش سل و تحقیقات ریوی، انستیتو پاستور ایران
[3]کارشناس ارشد، آزمایشگاه تشخیص مولکولی، مجتمع آزمایشگاهی مسعود، تهران - ایران
[4]کارشناس، آزمایشگاه سل، مجتمع آزمایشگاهی مسعود

چکیده

سابقه و هدف: اسپولیگو تایپینگ روشی بر اساس پلی مورفیسم لوکوس کروموزی DR (توالی تکراری مستقیم) 36جفت بازی که به یک یا دو توالی فاصله اندازه 35-41 جفت بازی متصل است می باشد.94 توالی فاصله اندازه مختلف بین DR شناسایی شده که تنها 43 توالی فاصله انداز به صورت معمول مورد استفاده قرار می گیرد. بر اساس وجود یا فقدان این توالی ها می توان سوش های مایکو باکتریوم توبرکلوزیس را از هم متمایز کرد. هدف از انجام مطاله شناسایی تایپ های منتشر سوش مایکوباکترم توبرکلوزیس در شهر تهران می باشد.

مواد و روش ها: کشت مثبت متعلق به 149 بیمار مبتلا به سل ریوی از نظر اسپولیگوتایپینگ مورد بررسی قرار گرفتند. جدا سازی اولیه سویه های مایکوباکتریوم با روش پتروف 4٪ و با استفاده از محیط Lowenstein Jensen انجام شد و برای شناسایی سویه ها از تست بیوشیمیایی افتراقی از قبیل: تست های نیاسین- فعالیت کاتالاز- احیاء نیترات استفاده شد. حساسیت دارویی در برابر ایزونیازید (0/2µg/m)، ریفامپین (40µg/ml). استرپتوماسیون (10 µg/m) و اتامبوتول (2µg/ml) به روش تناسبی انجام و سویه ها به سه گروه حساس، MDR و غیر MDR تقسیم بندی شده اند. سپس DNA از کلنی ها مثبت با روش کیت DNA technology استخراج گردید. قطعات مورد نظر با روش PCR تکثیر شده و پس از دناتوره کردن قطعه تکثیرشده هیبریداسیون با آنزیم استرپتاویدین پر اکسید از به روش line reverse blot انجام می گیرد. پس از اضافه کردن کمی لومینسانس و گذاشتن غشاء بر روی فیلم X-ray رادیولوژی می شود که به روش کیت Spoligotyping از شرکت هلندی انجام شد.

یافته ها: سویه ها به 9 دسته (CAS2, EAI2, EAI3, T1, T2, U, Haarlem, CAS2, CAS1, Beijing) متمایز شدند که بیشترین تعداد مربوط به سویه T-Haarlem (27٪) و کمترین تعداد مربوط به سویه (0/4٪) T2 می باشد. همچنین با روش تایپینگ دو سویه متعلق به مایکوباکتریوم بویس نیز شناسایی شد.

نتیجه گیری: این روش سریع ساده و دارای حساسیت بالا بود و در هربار انجام این روش تعداد 50 نمونه را می توان ازهم متمایز کرد.

کلمات کلیدی: Spoligotyping، مایکوباکترم توبرکلوزیس

مقدمه

تا اواخر دهه گذشته تنها شاخص های دردسترس برای مطالعه اپیدمیولوژی سل، پروفایل های حساسیت دارویی و تیپ بندی بر اساس فاژ بوده که استفاده از هر دو روش دارای محدودیت بود. پروفایل حساسیت دارویی سویه های مایکوباکتریوم به شدت ناپایدار هستند، چرا که سویه ها مکرراً مقاومت به داروهای ضد سل را در طول درمان کسب می کنند. ارزش نتایج فاژ تایپینگ برای ارتباط دادن به سل محدود است، چرا که تنها انواع محدودی ازفاژها می توانند در بین ایزوله های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس شناسایی شوند. در بیشتر مناطق منطقه جغرافیایی یک نوع فاژ دربین ایزوله های مایکوباکتریوم تو برکلوزیس غالب است که بر این اساس موارد مرتبط و غیر مرتبط می توانند از یکدیگر متمایز شوند (Kanduma et al., 2003). در سال های اخیرتعداد زیادی از روش های انگشت نگاری DNA برای تعیین انواع ایزوله های مایکوباکتریوم مطرح شدند. این روش ها به دو دسته تقسیم می شوند: روش هایی که پرو فایل انگشت نگاری تولید می کنند مانند RFLP -IS6110 و روش هایی

آدرس نویسنده مسئول: بخش سل و تحقیقات ریوی، انستیتو پاستور ایران
Email:E. jabbarzadeh@yahoo.com
تاریخ دریافت: 89/8/7
تاریخ پذیرش:89/12/21
www.SID.ir

Archive of SID

(Kanduma et al., 2003; Van Embden et al.,1993). روش RFLP -IS6110 درسال 1990 برای هدف اپیدمیولوژی مولکولی بیماری سل به کار برده شد. اساس RFLP مبنی بر وجود ترانسپوزون های IS6110 بوده که به طور اختصاصی در طول ژنوم کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به تعداد متنوع و در جایگاه های مختلف وجود دارد. تعداد و موقعیت این باندها در طول ژنوم گونه های مختلف مایکوباکتریوم تو برکلوزیس باعث الگوی انگشت نگاری ژنتیکی می شود و به عنوان راهکار مناسب برای تعیین گونه، مورد استفاده قرار می گیرد (Van Embden et al.,1993; Murray et al., 2002) و لیکن این روش نمی تواند گونه هایی که دارای تعداد کم یا یکسانی از نسخه های IS6110 را دارا می باشد، شناسایی کند (Burgos et al., 2002) به همین علت امروزه از روش دیگری مانند اسپولیگوتایپینگ استفاده می شود. روش اسپولیگوتایپینگ بر اساس پلی مرفیسم لوکوس کروموزومی DR (توالی تکراری مستقیم) می باشد . یک قطعه DR به همراه یک توالی فاصله انداز مجاورش را توالی تکراری متنوع مستقیم یا DVR می نامند، هنگامی که مناطق DR چندین سویه با یکدیگر مقایسه شدند، مشاهده شد که ترتیب توالی های فاصله اندازه تقریبا یکسان است، اما حذف و اضافه شدن توالی فاصله انداز و DR نیز ممکن است رخ دهد. این لوکوس ابتدا توسط Hermans و همکارانش شناسایی شد (Mostran et al., 2002; Hermans et al., 1991). در مایکوباکتریوم بوویس BCG هر کدام از DVR های حاوی یک توالی تکراری مستقیم 36 جفت بازی و یک توالی کوتاه غیر تکرار شونده با سایز مشابه 35-41 جفت باز که توالی فاصله انداز نامید می شوند، می باشد. 94 توالی فاصله انداز مختلف در بین DR ها شناسایی شده است، اما تنها 43 توالی فاصله انداز به صورت معمول مورد استفاده قرار می گیرد. محتمل ترین دلیل برای فقدان توالی های فاصله انداز، حذف آن ها می باشد که ممکن است که در یک یا چند توالی فاصله انداز صورت بگیرد که این امر در اثر مکانیسم های مختلف ژنتیکی از جمله نو ترکیب هومولوگ و جابجایی انجام می شود. تعداد کپی DR در مایکو باکتریوم بوویس 49 عدد می باشد. در سایر سویه های کمپلکس مایکو باکتریوم توبرکلوزیس تعداد لوکوس DR به صورت قابل ملاحظه ای متفاوت می باشد اکثریت سویه های مایکو باکتریوم توبرکلوزیس حاوی 1 یا تعداد بیشتری توالی IS6110 در ناحیه DR خود می باشند. بر خلاف DR، توالی های فاصله انداز معمولا در هر منطقه DR یک عدد وجود دارند، اما در بعضی مواقع ممکن است دو عدد دیده شود به صورتی که به وسیله یک یا چندین DR و سایر فاصله اندازها از یکدیگر جدا شوند (Sebban et al., 2021). در این مطالعه، از روش اسپو لیگو تایپینگ برای متمایز کردن سویه های مایکو باکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس که از مناطق مختلف شهر تهران جدا گردیده استفاده شد.

مواد و روش ها

در این مطالعه توصیفی – تحلیلی کشت مثبت متعلق به 149 بیمار مبتلا به سل ریوی مراجعه کننده به آزمایشگاه مایکو باکتریولوژی مجتمع آزمایشگاه مسعود و آزمایشگاه دکتر ضیا ظریفی از نظر اسپولیگوتایپینگ مورد بررسی قرار گرفتند (بین سال 89 -87). جدا سازی اولیه سویه های مایکو باکتریوم با روش پتروف 4٪ و با استفاده از محیط (Lowenstein-Jensen) انجام شد و برای شناسایی سویه ها از تست های بیو شیمیایی از قبیل:

تست های نیاسین، فعالیت کاتالاز، احیاء نیترات استفاده شد. حساسیت دارویی در برابر ایزو نیازید (0/2µg/ml) ریفامپین (µg/ml 40)، استرپتومایسین (10µg/ml)و اتامبوتول (2µg/ml) به روش تناسبی انجام و سویه ها به سه گرو ه حساس، Multi (MDR Drug Resistant) و غیر MDR تقسیم بندی شدند. سپس DNA از کلنی های مثبت با روش کیت DNA technology استخراج گردید. قطعات DR مورد نظر را با روش PCR و با استفاده از دو پرایمر

DRa: 5´-GGT TTT GGG TCT GAC GAC-3´ و

DRb: 5´-AGA GGG GAC GGA AAC CCG -3´

که انتهای 5´ پرایمر DRa با بیوتین نشاندار شده است، تکثیر یافتند. محصول PCR را در دمای 95^0C دناتوره کرده و سپس بر روی غشای نیترو سلولز انتقال داده و بعد از آن غشاء نیترو سلولز را با استفاده از آنزیم استرپتاویدین پراکسیداز هیبریداسیون line Reverse blot کرده که پر اکسید از موجود در استرپتاویدین واکنش را کاتالیز می کند که باعث نشر نور می شود که این نور توسط اتو رادیوگرافی ردیابی می شود. پس از هیبریداسیون، جهت ردیابی سیگنال های هیبرید شده مقدار ماده کمی لومینسانس (ECL) اضافه کرده و غشای هیدرو سلولزی را جهت ظهور بر روی فیلم حساس رادیوگرافی قرار داده می شود. پس از ظهور فیلم نقاط سیاه نشان دهنده حضور نواحی فاصله انداز می باشد که می توان به صورت عددی نمایش داد (Spoligotyping Kits). یک توالی فاصله انداز می تواند به صورت یک کد مثبت یا منفی بیان شود، بدین صورت که نتیجه مثبت، حضور توالی فاصله انداز و نتیجه منفی فقدان توالی فاصله انداز را نشان می دهد طرح الگوی هر سویه می توان به

www.SID.ir

Archive of SID

صورت OCTAL CODE در آورد و با اطلاعات موجود در بانک جهانی اسپولیگوتایپینگ مقایسه کرده و سویه های آن ها را مشخص کرد (Kremer et al.,1999).

یافته ها

149 بیمار مبتلا به سل ریوی که میانگین سن برای بیماران 20-75 سال بود، که برای تایپ استفاده شد. این بیماران با روش اسپولیگوتایپینگ به 9 سویه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس شناسایی شدند که شامل Beijing ،(25.2%) 1 CAS، (6/7%) 2CAS ،(5/5%) (27/7%)Haarlem ،(5%) U، (6/3%) T1،(0/4) T2 ، EAI2 (1/2%)، EAI3 (21/8%) می باشند. غالب ترین سویه در این مطالعه مطعلق به سویه Haarlem می باشد و همچنین سویه Beijing بیشترین مقاومت آنتی بیوتیکی (MDR) را از خود نشان داد و با توجه به این که تعداد سویه های EAI2 کم بود لیکن مقاومت آنتی بیوتیکی در این سویه مشاهده نشد (جدول 1).

بحث

یکی از روش های مولکولی که بر اساس PCR است اسپولیگوتایپینگ می باشد که برای تایپ کردن سویه ای مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بکار می رود. اسپولیگوتایپینگ به عنوان یک روش جایگزین جدا کردن سویه بر اساس برش آنزیمی، بخصوص در مواقعی که کسب نتایج سریعتر ضروری می باشد، بکار می رود، آنالیز آن بااستفاده از نرم افزار SSPE صورت می گیرد. این روش بخصوص قادر است سویه های کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس را درنمونه های کلینیکی ردیابی و تیپ بندی کند. این روش افتراق بیشتری نسبت به روش های مانند IS6110 RFLP در سویه هایی که تعداد نسخه های IS6110 آنها کمتر یا مساوی 5 کپی می باشد دار است، را دارد پس می توان گفت یک روش برتر برای تیپ بندی سویه های مایکوباکتریوم بوویس می باشد، زیرا این سویه ها اغلب حاوی یک یا دو کپی از IS6110 می باشد. بر اساس تحقیقات تکاملی انجام شده، سه گروه اصلی از مایکوباکتریوم تو برکلوزیس بر پایه پلی مورفیسم مشاهده شده در نوکلئوتیدهای katG465 و gyrA codon شناسایی شده است (Kart et al., 2001). باکتری های متعلق به گروه 2 و 3 قادر به هیبریداسیون با نو کلئو تی دهای فاصله انداز 33 و 36 نیستند (siaw et al.,, 2004). در این مطالعه غالب ترین سویه متعلق به سویه Haarlem می باشد که متعلق به گروه های اصلی ژنتیکی 2 و 3 می باشند. همچنین سویه های Beijing نسبت به گزارش مطالعه دیگر محققین افزایش یافته است (Frdinand et al., 2005). سویه های Beijing برای اولین بار در بیماران TB در ناحیه (پکن) چین شناسایی شد که در کشورهای آسیای شرقی از اواسط 1950 غالب ترین سویه بودند . اخیرا سویه بیجینگ به همراه چند شیوع در آمریکا ، افریقای جنوبی، آلمان، جزایر قناری، روسیه و استوانی وجود داشته است (Frdinand et al., 2005). امروزه سویه بیجینگ مایکوباکتریوم توبرکلوزیس توجه زیادی را در دنیا به خود معطوف کرده است چرا که در حالی که در مطالعه ای که توسط لاری و همکارانش انجام شد غالب ترین سویه متعلق به سویه T هم متعلق به گروه های ژنتیکی 2 و 3 می باشد (Lari et al., 2005). همچنین سویه های

جدول1- نتایج مقاومت آنتی بیوگرامی در سویه های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس

نتایج آنتی بیوگرام								
Name of Families	MDR		حساس		Non MDR		کل	
	Count	Row % N	Count	% Row N	Count	Row % N	Count	% Row N
پکن	1	20%	3	60%	1	20%	5	100.0%
CAS 1	2	8%	22	89%	2	8%	26	100.0%
CAS II	0	0%	10	100.0%	0	12.5%	10	100.0%
EA I2	0	0%.	3	100.0%	0	0%.	3	100.0%
EA I3	3	11%	24	83%	2	6%	29	100.0%
Haarlem (I(H4	0	0%	49	84.8%	7	10.6%	56	100.0%
T1	0	0%	11	100.0%	0	0%.	11	100.0%
T2	0	0%.	2	100.0%	0	0%.	2	100.0%
U	1	12%	8	88%	0	0%	9	100.0%

www.SID.ir

Archive of SID

Beijing نسبت به گزارش مطالعه دیگر محققین افزایش یافته است (Frdinand et al., 2005). سویه های Beijing برای اولین بار در بیماران TB در ناحیه (پکن) چین شناسایی شد که در کشورهای آسیای شرقی از اواسط 1950 غالب ترین سویه بودند. اخیرا سویه بیجینگ به همراه چند شیوع در آمریکا، افریقای ویژگی های پاتوژنیک مهمی از جمله داشتن ارتباط با مقاومت چند دارویی را دارا می باشد که این امر احتمالا بعلت وجود الل های مستعد جهش در ژن های mut T می باشد (Makrousor et al., 2004). مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقائم به چند دارو (MDR)، که تحت عنوان سویه مقاوم به دو داروی ضد سلی مهم یعنی ایزونیازید وریفامپین نامیده می شود، یک تهدید جدی برای کنترل سل می باشد . افرادی که با سویه های مقاوم به دارو آلوده می شوند درمان آن ها مشکل بوده و هزینه زیادی نیز می پردازند. که در این مطالعه 46% از سویه بیجینگ جدا شده به روش اسپولیگو تایپینگ MDR بودند.

نتیجه گیری

در آخر این مطالعه چنین نتیجه گیری می شود این روش برای تایپ و تمایز کردن سویه های کمپلکس مایکو باکتریوم و برای مطالعات اپیزمیولوژیکی و تمایز رده ها در بین کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس شامل: *M.africanumt* ،*M.tuberculosis*، *M.bovis*، *Mmicrotti*، *Mcanetti* استفاده می گردد این روش ساده، آسان، تکرار پذیر و دارای می توان برای نمونه های کشت منفی استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همکاری آزمایشگاه مایکوباکتریولوژی مجتمع آزمایشگاه مسعود و آزمایشگاه دکتر ضیا ظریفی جهت فراهم آوری منابع مالی و همچنین از پرسنل محترم آزمایشگاه مرجع وزرات بهداشت به خاطر کمک های فکر و آنالیزی تشکر و قدردانی می گردد.

www.SID.ir

Archive of SID

References:

1- kanduma E, Mchugh TD and Gillespie SH. Molecular methods for Mycobacterium tuberculosis strain typing: ausers guide. J Appl Microbiol, 2003; 14-19.

2- Van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, et al. strain identification of Mycobacterium tuberculosis by DNA fingerprinting: recommendation for a standardized methodology. J Clin Microbiol, 1993; 448 -492.

3- Murray M, Nardell E. Molecular epidemiology of tuberculosis : achievements and challenges to current Knowledge. Bull WHO, 2002 ; 80:477-482

4- Van Soolinngen, De Hass PE, Hermans PW. DNA fingerprinting of Mycobacterium tuberculosis, Methods Enzymol , 1994; 1337-1342.

5- Burgos M and Pym AS. Molecular epidemiology of tuberculosis. Eur Respir, 2002; 143-149.

6- Mostrom P, Grodon M, Sola C, Ridell M and Rastogi N. Method Used in the molecular epidemiology of tuberculosis. J Clin Microbiol, 2002; 191-197.

7- Hermans PW Van Soolingen D, Bik EM. Insertion element IS987 from Mycobacterium bovis BCG is located in a hot spot integration region for insertion elements in Mycobacterium tuberculosis complex strains. Infect Immune, 1991; 59: 2695-2707.

8- Sebban SL Mokrousov I, Raqstogi NA data mining approach to spacer Oligonucleotide typing of Mycobacterium tuberculosis. Bioinformatics, 2002; 18: 235-243.

9- Van Soolingen D. Molecular epidemiology of tuberculosis. J Int Medicine, 2001; 249:1-26.

10- Dale W, Brittain D Cataldi AA, Cousins D, Crawford T, Driscoll J, Heersma H and et al. Spacer oligonucleotide typing of bacteria of the Mycobacterium tuberculosis complex: recommendations for standardized nomenclature, 2001.

11-Kremer K, Van Soolingen D, Frothingham R, Haas WH, Hermans PW, Martin C and et al. Comparion of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of mycobacterium tuberculosis complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility.J Clin Microbiol, 1999; 37(8): 2607-18.

12- Sola C, Ferdinand S, Mammina C. Genetic diversity of Mycobacterium tuberculosis in Slcly based on spoligotyping and variable number of tandem DNA repeats and comparison with spoligotyping database for population based analysis. J Clin Microbiol, 2001; 8: 141-149.

13- Kart L, Altin R, Tor M, Gulmez I, Oymak SF. Atmaca HM, Erdem F, Antituberculosis drug resistance patterns in two regions of Turkey: a retrospective analysis. Annals Cilin Microbiol Antimicrob, 2002; 1(6).

14- Liaw YS, Hsueh PR, Yn CJ, Wang SK ,Yang PC, Luh KT. Drog resistance pattern of Mycobacterium tuberculosis in a university hospital in Taiwan. J Formos Med Assoc, 2004; 103(9): 671-7.

15- Iari N, Rindi L, Sola C, Bonanni D, Rastogi N, Tortoli E and et al. Genetic diversity, determined on the basis of katG463 and gyr A95 polymorphisms, Spoligotyping ,and IS 6110 typing ,of mycobacterium tuberculosis complex isolates from Italy. J Clin Microbiol, 2005;43(4):1617-24.

16- Ferdinand S, Sola C, Chanteau S, Ramarokoto H,Rasolonavalona T, Rasolonavalona T ,Rasolofo-

www.SID.ir

Archive of SID
Razanamparany V and et al. A study of spoligotyping – defined Mycobacterium tuberculosis clades in relation to the origin of peopling and the demographic history in Madagascar. Infect Genet Evol, 2005;5(4): 340-8.

17- Ferdinand S, Sola C, Verdol B Legrand E ,Goh K.S and et al. Refampin and Multidrug Resistant Tuberculosis in Russian Civilians and Prison Inmates: Dominance of the Beijing Strain Family .

18- Mokrousov I, Narvskaya O, Limeschenko E. Analysis of the allelic diversity of the mycobacterial interspersed repetitive units in Mycobacterium tuberculosis strain of the Beijing family :practical implications and evolutionary consideration, 2004.

www.SID.ir