مجله‌ی علمی، پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی زنجان
دوره‌ی ۱۷، شماره‌ی ۶۷، تابستان ۱۳۸۸، صفحات ۲۳ تا ۳۲

تشخیص سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس با استفاده از روش اسپولیگوتایپینگ در بیماران مراجعه کننده به بیمارستان مسیح دانشوری

مجتبی احمدی[۱]، دکتر پریسا فرنیا[۲]، الهه تاج‌الدین[۳]، دکتر پیام طبرسی[۴]، دکتر پروانه بقایی[۵]، دکتر محمدرضا مسجدی[۶]، دکتر علی‌اکبر ولایتی[۷]

نویسنده‌ی مسئول: تهران، مرکزتحقیقات مایکوباکتریولوژی، پژوهشکده‌ی سل و بیماری‌های ریوی elahe_tajedin@yahoo.com

دریافت: ۸۷/۹/۱۳ پذیرش: ۸۸/۴/۲۴

چکیده

زمینه و هدف: *هدف از این مقاله شناسایی و تمایز الگوی ژنتیکی سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس بیماران مسلول با استفاده از پلی‌مرفیسم DR(Direct Repeat) با روش اسپولیگوتایپینگ می‌باشد.*

روش بررسی: *کشت مثبت متلعق به ۲۳۸ بیمارمبتلا به سل ریوی از نظر اسپولیگوتایپینگ مورد بررسی قرار گرفت. جداسازی اولیه‌ی سویه‌های مایکوباکتریوم باروش پتروف ۴ درصد و با استفاده از محیط جنسون Lowenstein Jensen (LJ) انجام شد و برای شناسایی سویه‌ها از آزمایشات بیوشیمیایی از قبیل، نیاسین، فعالیت کاتالاز، احیای نیترات استفاده شد. حساسیت دارویی در برابر ایزونیازید (۰/۲ میکروگرم در میلی‌لیتر)، ریفامپین (۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، استرپتومایسین (۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) و اتامبوتول (۲میکروگرم در میلی‌لیتر) به روش تناسبی انجام و سویه‌ها به سه گروه حساس، MDR و غیر MDR تقسیم‌بندی شدند. سپس DNA از کلنی‌های مثبت با روش CTAB استخراج گردید. قطعات مورد نظر با روش PCR تکثیر شده و پس از دناتوره کردن قطعه‌ی تکثیر شده، عمل هیبریداسیون با آنزیم استرپتاویدین پر اکسیداز به روش Line Reverse Blot صورت گرفت. با اضافه کردن مقداری لومینسانس و قرار دادن غشاء بر روی فیلم X-ray ، رادیوگرافی انجام گردید..*

یافته‌ها: *سویه‌ها به ۹ دسته (Beijing , Haarlem , U , T1,T2 , EAI2 EAI3 ,CAS1,CAS2) متمایز شدند، که بیشترین تعداد مربوط به سویه‌ی Haarlem (۲۷ درصد، ۶۶/۲۳۸) و CAS1 (۲۵ درصد، ۶۰/۲۳۸) می‌باشد. همچنین با این روش دو سویه‌ی متعلق به مایکوباکتریوم بویس شناسایی شد.*

نتیجه‌گیری: *این روش سریع، ساده و دارای حساسیت بالا برای تمایز سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکوزیس و مطالعات اپیدمیولوژی می‌باشد.*

واژگان‌کلیدی: مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس، اسپولیگوتایپینگ، بیماران سلی

۱- کارشناس میکروبیولوژی، پژوهشگر مرکزتحقیقات مایکوباکتریولوژی، پژوهشکده‌ی سل و بیماری‌های ریوی، تهران

۲- دکترای تخصصی میکروب‌شناسی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی، مرکزتحقیقات مایکوباکتریولوژی، پژوهشکده‌ی سل و بیماری‌های ریوی

۳- دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی جهرم

۴- متخصص عفونی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی وخدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی، مرکز تحقیقات سل و بیماری‌های ریوی

۵- پزشک مرکز تحقیقات سل و بیماری‌های ریوی، تهران

۶- فوق تخصص ریه، استاد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، مرکز تحقیقات سل و بیماری‌های ریوی

۷- فوق تخصص عفونی اطفال، استاد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، مرکز تحقیقات سل و بیماری‌های ریوی

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

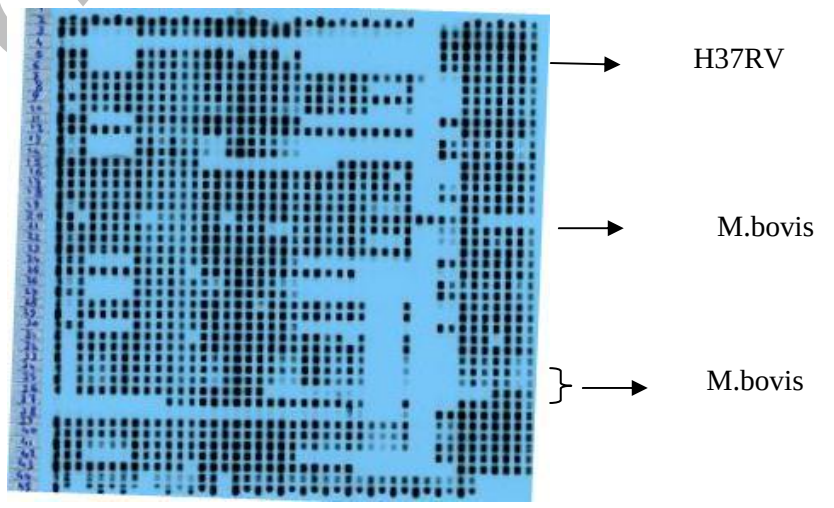
اپیدمیولوژی در تعیین بروز و میزان شیوع سل نقش به‌سزایی دارد. به همین علت امروزه اپیدمیولوژی سل اهمیت ویژه‌ای را در مطالعات کنترلی بیماری‌های عفونی پیدا کرده است. علاوه بر آن، برای پیدا کردن ارتباط بین سل و سایر فاکتورهای دخیل در آن، منشاء عفونت باید ردیابی شود. برای مشخص‌کردن منشاء عفونت و جلوگیری از انتشار آن شناسایی سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس می‌تواند موثر باشد (۱). در گذشته، تنها شاخص‌های در دسترس برای مطالعه‌ی اپیدمیولوژی سل، پروفایل‌های حساسیت دارویی و تیپ بندی بر اساس فاژ بوده که استفاده از هر دو روش دارای محدودیت بود. پروفایل حساسیت دارویی سویه‌های مایکوباکتریوم به شدت ناپایدار هستند، چرا که سویه‌ها مکررا مقاومت به داروهای ضد سل را در طول درمان کسب می‌کنند (۲). ارزش نتایج فاژتایپینگ برای ارتباط دادن به سل محدود است چرا که تنها تعداد محدودی از فاژها می‌توانند در بین سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس شناسایی شوند (۲). درسال‌های اخیر تعداد زیادی از روش‌های انگشت‌نگاری DNA برای تعیین گونه‌ی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس مطرح شدند. این روش‌ها به دو دسته‌ی عمده تقسیم می‌شوند. روش‌هایی که پروفایل انگشت‌نگاری تولید می‌کنند، مانند RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism) - IS6110 و روش‌هایی که اساس آن PCR می‌باشند، مانند اسپولیگوتایپینگ و VNTR (Variable Number Tandem Repeat) (۳). روش RFLP - IS6110 در سال ۱۹۹۰ برای هدف اپیدمیولوژی مولکولی بیماری سل به کار برده شد. اساس RFLP مبنی بر وجود ترانسپوزون‌های IS6110 بوده که به طور اختصاصی در طول ژنوم کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به تعداد متنوع و در جایگاه‌های مختلف وجود دارد. تعداد و موقعیت این باندها در طول ژنوم گونه‌های مختلف مایکوباکتریوم توبرکلوزیس باعث الگوی انگشت‌نگاری ژنتیکی می‌شود و به عنوان وسیله‌ای مناسب برای تعیین گونه، مورد استفاده قرار می‌گیرد. این روش نمی‌تواند گونه‌هایی که دارای تعداد کم یا یکسانی از نسخه‌های IS6110 می‌باشد را شناسایی کند (۴و۵). به همین علت امروزه از روش دیگری مانند اسپولیگوتایپینگ (که توسط کمبربیک (Kamerbeek) و همکارانش ابداع شد) برای تمایز گونه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس استفاده می‌شود. این روش سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس را در نمونه‌های کلینیکی ردیابی و تیپ بندی می‌کند (۶). این روش براساس پلی‌مرفیسم‌لوکوس DR (Direct Repeat) در ژنوم مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس (۳۶ جفت باز) که به یک یا دو توالی فاصله‌انداز غیر تکرای (۳۵تا۴۱ جفت باز) متصل است، می‌باشد. این لوکوس ابتدا توسط هرمن (Hermans) و همکارانش شناسایی شد. یک قطعه‌ی DR به همراه یک توالی فاصله‌انداز مجاورش را DVR (Direct Variable Repeat) می‌نامند. اکثر سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس حاوی یک یا تعداد بیشتری توالی IS6110 در ناحیه‌ی DR خود می‌باشند (۷). ۹۴ توالی فاصله انداز مختلف در بین DRها شناسایی شده است، اما تنها ۴۳ توالی فاصله انداز به صورت معمول مورد استفاده قرار می‌گیرد. دلیل فقدان توالی فاصله اندازها، حذف یک یا چند توالی فاصله انداز به‌علت مکانیسم‌های مختلف ژنتیکی از جمله نوترکیب همولوگ و جابجایی می‌باشد. تعداد کپی DR در مایکوباکتریوم بوویس، ۴۹ عدد می‌باشد. در سایر سویه‌های کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس تعداد لوکوس DR به صورت قابل ملاحظه‌ایی متفاوت می‌باشد. در بررسی لوکوس DR چندین سویه با یکدیگر، مشاهده شده است که ترتیب توالی‌های فاصله انداز تقریبا یکسان بوده است، اما حذف و اضافه شدن توالی فاصله انداز و DR نیز ممکن است

Archive of SID
www.SID.ir

رخ دهد. این امر دلیل برشناسایی گونه‌های مختلف مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس می‌باشد (۹و۸). در این مطالعه از روش اسپولیگوتایپینگ برای شناسایی و تمایز گونه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس استفاده گردید.

روش بررسی

در این مطالعه‌ی توصیفی– تحلیلی، کشت مثبت متعلق به ۲۳۸ بیمار مبتلا به سل ریوی مراجعه کننده به مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی (پژوهشکده‌ی سل و بیماری‌های ریوی دارآباد تهران) در بین سال‌های ۸۷–۸۶ از نظر اسپولیگوتایپینگ مورد بررسی قرار گرفتند. جداسازی اولیه‌ی سویه‌های مایکوباکتریوم باروش پتروف ۴ درصد و با استفاده از محیط جنسون [Lowenstein Jensen (LJ)] انجام شد و برای شناسایی سویه‌ها از آزمایشات بیوشیمیایی از قبیل، آزمایش نیاسین، فعالیت کاتالاز و احیای نیترات استفاده شد. حساسیت دارویی در برابر ایزونیازید (۰/۲میکروگرم در میلی‌لیتر)، ریفامپین (۴۰میکروگرم در میلی‌لیتر)، استرپتومایسین (۱۰میکروگرم در میلی‌لیتر) و اتامبوتول (۲میکروگرم در میلی‌لیتر) به روش تناسبی انجام وسویه‌ها به سه گروه حساس، MDR و غیرMDR تقسیم‌بندی شدند (۱۰). سپس DNA از کلنی‌های مثبت باروش N استیل N , N , N– تری متیل آمونیوم برومایید (CTAB) 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'- CCG AGA GGG GAC GGA AAC - 3 ' که انتهای '5 پرایمر DRa با بیوتین نشاندار شده است، تکثیر یافتند. محصول PCR را در دمای ۹۹ درجه‌ی سانتی‌گراد دناتوره کرده و بعد از انتقال بر روی غشای نیتروسلولز، هیبریداسیون Line Reverse Blot با آنزیم استرپتاویدین پراکسیداز صورت گرفت. پراکسیداز موجود در استرپتاویدین واکنشی را کاتالیز کرد که باعث نشر نور گردید که این نور توسط اتورادیوگرافی ردیابی گردید. پس از هیبریداسیون، جهت ردیابی سیگنال‌های هیبرید شده مقداری ماده‌ی لومینسانس (ECL) اضافه و غشای نیتروسلولزی را جهت ظهور بر روی فیلم حساس رادیوگرافی قرار داده شد. پس از ظهور فیلم نقاط سیاه نشان دهنده‌ی حضور نواحی فاصله انداز بود (۱۱). توالی فاصله انداز می‌تواند به صورت یک کد مثبت یا منفی بیان شود، بدین صورت که نتیجه‌ی مثبت، حضور توالی فاصله انداز و نتیجه‌ی منفی فقدان توالی فاصله انداز را نشان می‌دهد (شکل ۱).



شکل ۱: عکس رادیوگرافی اسپولیگوتایپینگ

Archive of SID
www.SID.ir

طرح الگوی هر سویه را به‌صورت OCTAL CODE در آورده، با اطلاعات موجود در بانک جهانی اسپولیگوتایپینگ (SPOLDB4) مقایسه کرده، سویه‌های آنها مشخص گردید (۱۳و۱۲). تست‌های آماری کای‌دو و فیشر برای توزیع جنسی، سنی و آنتی‌بیوتیکی بین سویه‌های ایرانی و افغانی استفاده گردید.

Name of Families	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43
Beijing	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	x	x	x	x	x	x	x	x	x
CAS1	x	x	x	.	.	.	.	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	x	x	x	x	x	x	x	x	x
CASII	x	x	x	.	.	.	.	.	.	.	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	x	x	x	x	x	x	x	x	x
EAI3	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	.	.	x	.	.	.	.	x	.	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Haarlem I(H4)	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	.	.	.	x	.	.	.	.	x	x	x	x	x	x	x
T1	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	.	.	.	.	x	x	x	x	x	x	x
T2	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	.	.	.	.	x	x	x	.	x	x	x
U	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	x	x	x	x	x

شکل ۲: طرح شماتیک فامیل‌های حاصل از بررسی ۲۳۸ طرح اسپولیگوتیپ جدا شده از سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس

یافته‌ها

از ۲۳۸بیمارمبتلا به سل ریوی، ۱۷۹ نفر (۷۵ درصد) ملیت ایرانی که ۷۴ نفر (۴۲ درصد) زن و ۱۰۴ نفر (۵۸ درصد) مرد و ۵۹ نفر (۲۵ درصد) ملیت افغانی که ۳۱ نفر (۵۳ درصد) زن و ۲۸ نفر (۴۷ درصد) مرد بودند. رنج سنی برای بیماران ۱۰تا ۸۸ سال بود. این بیماران با روش اسپولیگوتایپینگ به ۹ سویه‌ی مایکو باکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس شناسایی شدند که شامل
(۲۷/۷ درصد، ۶۶/۲۳۸) Haarlem, (۲۵/۲ درصد، ۶۰/۲۳۸) CAS ۱ (۲۱/۸ درصد، ۵۲/۲۳۸) EAI3 (۵/۸ درصد، ۱۴/۲۳۸) CAS ۲ (۶/۳ درصد، ۱۵/۲۳۸) T1 (۵/۵ درصد، ۱۳/۲۳۸) Beijing (۵ درصد، ۱۲/۲۳۸) U (۱/۲ درصد، ۳/۲۳۸) EAI2 (۰/۴ درصد، ۱/۲۳۸) T2 می‌باشد (شکل ۲و۱). همچنین با این روش تایپینگ دو سویه‌ی متعلق به مایکوباکتریوم بویس شناسایی شد. گروه‌بندی CAS 1 و CAS 2زیر گروه‌های ژنوتیپ EAI2،CAS وEAI زیر گروه‌های ژنوتیپ EAI3 و همچنین T2 وT1 زیر گروه‌های ژنوتیپ T می‌باشند. غالب‌ترین سویه در این مطالعه متعلق به ژنوتیپ هارلم و CAS1 می‌باشند. مقایسه‌ی کلی بین بیماران نشان داد که در بیماران ایرانی و افغانی بیشترین درصد سویه‌های جدا شده به روش اسپولیگوتایپینگ به ترتیب: مایکوباکتریوم توبرکلوزیس ژنوتیپ Haarlem (۲۹/۱ درصد) و CAS1 (۲۸/۸ درصد) بودند (جدول ۱).

همچنین در بین سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس جدا شده به روش اسپولیگوتایپینگ سویه‌ی EAI3 بیشترین درصد مقاومت آنتی‌بیوتیکی (MDR) را نشان داد. با وجود پایین بودن تعداد سویه‌ی بیجینگ جدا شده، این سویه دارای بالاترین تعداد MDR بود. با توجه به این که تعداد سویه‌های EAI2 کم بود لیکن مقاومت آنتی‌بیوتیکی در این سویه مشاهده نشد (جدول ۲).

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱: نتایج سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس جدا شده به روش اسپولیگوتایپینگ در بیماران ایرانی و افغانی

سویه های جدا شده	ملیت					
	ایرانی		افغانی		کل	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
Beijing	۶	٪ ۳/۴	۷	٪ ۱۱/۹	۱۳	٪ ۵/۵
CAS1	۴۳	٪ ۲۴	۱۷	٪ ۲۸/۸	۶۰	٪ ۲۵/۲۱
CASII	۱۲	٪۶/۷	۲	٪ ۳/۴	۱۴	٪ ۵/۸
EAI2	۲	٪ ۱/۱	۱	٪ ۱/۷	۳	٪ ۱/۲۶
EAI3	۳۷	٪ ۲۰/۷	۱۵	٪ ۲۵/۴	۵۲	٪ ۲۱/۸۴
Haarlem I	۵۲	٪ ۲۹/۱	۱۴	٪ ۲۳/۷	۶۶	٪ ۲۷/۷۳
T1	۱۵	٪ ۸/۴	.	.	۱۵	٪ ۶/۳۰
T2	۱	٪ ./۶	.	.	۱	٪ ۰/۴۲
U	۹	٪ ۵	۳	٪ ۵/۸	۱۲	٪ ۵/۰۴
M.bovis	۲	٪ ۱/۱	.	.	۲	٪ ./۸۴
Total	۱۷۹	٪ ۱۰۰	۵۹	٪ ۱۰۰	۲۳۸	٪ ۱۰۰

جدول ۲: نتایج مقاومت آنتی‌بیوگرامی در سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس جدا شده به روش اسپولیگوتایپینگ

سویه‌ای جدا شده	نتایج آنتی بیوگرام							
	مقاوم به دارو		حساس		غیرمقاوم به دارو		کل	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
Beijing	۶	٪ ۲۱/۴	۴	٪ ۲/۲۲	۳	٪ ۱۰	۱۳	٪ ۵/۵
CAS1	۶	٪ ۲۱/۴	۴۲	٪ ۲۳/۳۳	۱۲	٪ ۴۰	۶۰	٪ ۲۵/۲۱
CASII	۱	٪ ۳/۵۷	۱۱	٪۶/۱	۲	٪ ۶/۶۶	۱۶	٪ ۶/۷۲
EAI2	۰	.	۳	٪ ۱/۶۶	۰	۰	۳	٪ ۱/۲۶
EAI3	۸	٪ ۲۸/۵۷	۳۹	٪ ۲۱/۶۶	۵	٪ ۱۶/۶۶	۵۲	٪ ۲۱/۸۴
Haarlem I	۳	٪ ۱۰/۷۱	۵۶	٪ ۳۱/۱۱	۷	٪ ۲۳/۳۳	۶۶	٪ ۲۷/۷۳
T1	۲	٪ ۷/۱۴	۱۳	٪ ۷/۲۲	۰	۰	۱۵	٪ ۶/۳۰
T2	۰	۰	۱	٪ ۰/۵۵	۰	۰	۱	٪ ۰/۴۲
U	۲	٪ ۷/۱۴	۹	٪ ۵	۱	٪ ۳/۳۳	۱۲	٪ ۵/۰۴
M.bovis	۰	۰	۲	٪ ۱/۱	۰	.	.	.
Total	۲۸	٪ ۱۰۰	۱۸۰	٪ ۱۰۰	۳۰	٪ ۱۰۰	۲۳۸	٪ ۱۰۰

Archive of SID

www.SID.ir

و همچنین مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بیماران افغانی بیشتر از ایرانی بود (P=۰/۰۰۰۱). تست‌های آماری کای‌دو و فیشر نشان داد که توزیع جنسی و سنی بین سویه‌های ایرانی و افغانی تفاوت آماری معنی‌داری نداشت (P≤ ۰/۰۵) ولی توزیع آنتی‌بیوگرام بین این سویه‌ها تفاوت آماری معناداری داشت (P≤ ۰/۰۵).

بحث

اسپولیگوتایپینگ به عنوان یک روش جایگزین تایپینگ بخصوص در مواقعی که کسب نتایج سریع‌تر ضروری می‌باشد، بکار می‌رود. این روش، افتراق بیشتری نسبت به روش‌هایی مانند RFLP–IS6110 درسویه‌هایی که تعداد نسخه‌های IS6110 آنها کمتر یا مساوی ۵ کپی می‌باشد، را دارد. پس می‌توان گفت یک روش برتر برای تیپ‌بندی سویه‌های مایکوباکتریوم بوویس می‌باشد. زیرا این سویه‌ها اغلب حاوی یک یا دو کپی از IS6110 می‌باشد (۱۴). در این مطالعه دو سویه‌ی مایکوباکتریوم بویس جدا شدند. بر اساس تحقیقات تکاملی انجام شده، سه گروه اصلی از مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بر پایه‌ی پلی‌مرفیسم مشاهده شده در نوکلئوتیدهای katG463 و gyrA codon95 شناسایی شده است. باکتری‌های متعلق به گروه ۲و۳ قادر به هیبریداسیون با نوکلئوتیدهای فاصله انداز ۳۳تا ۳۶ نیستند (۱۶و۱۵). در بررسی انجام شده غالب‌ترین سویه شامل سویه هارلم و CAS1 بودند. ژنوتیپ CAS1 فاقد توالی‌های فاصله انداز ۷،۴،۵،۶و۲۳ –۳۴ است و دارای توالی‌های فاصله انداز ۱تا۳ و ۸تا۲۲ ،۳۵تا۴۳ می‌باشد. پس این سویه جزء گروه‌های اصلی ۱ می‌باشد. ژنوتیپ هارلم فاقد توالی‌های فاصله انداز ۲۹ تا۳۱ و۳۳تا۳۶ است و دارای توالی‌های فاصله انداز ۱تا ۲۸، ۳۲ و ۳۷تا۴۳ است. پس این سویه جزء گروه‌های اصلی ژنتیکی۲ و۳ می‌باشد. ژنوتیپ هارلم اولین بار در هلند و کشورهای اروپای شمالی و سویه‌ی CAS در هند مشاهده شد (۱۷).

مطالعه‌ای که توسط آشوا در پاکستان به روش اسپولیگوتایپینگ صورت گرفت سویه‌ی CAS1 را بعنوان غالب‌ترین سویه گزارش کرد (۱۸). این سویه متعلق به گروه اصلی ژنتیکی ۱ می‌باشد، در حالی که در بررسی حاضر این سویه ۲۵ درصد گزارش شد. این احتمال وجود دارد که انتقال این ژنوتیپ از طریق مهاجرت افراد بوجود آمده است. مطالعه‌ای مشابه توسط زوزیو در ترکیه انجام گرفت LAM7-TUR با روش اسپولیگوتایپینگ غالب‌ترین سویه‌ی گزارش بود (۱۹) با این تفاوت که در بررسی ما این سویه مشاهده نشد. مطالعه‌ای که در ایران توسط رمضان‌زاده و همکارانش انجام شد، غالب‌ترین سویه را هارلم گزارش نمود (۲۰). در حالی‌که در مطالعه‌ی نجف‌زاده و همکارانش (۲۱) و مطالعه‌ی فرنیا و همکارانش (۲۲) سویه‌ی EAI (به ترتیب ۴۷/۸ درصد و ۲۴ درصد) بعنوان فراوان‌ترین سویه گزارش شد، در این مطالعه فراوانی سویه‌ی EAI و T به ترتیب ۲۳ درصد و ۶/۷ درصد به‌دست آمد. هر دو این سویه‌ها جزء گروه‌های اصلی ۲و۳ می‌باشند. سویه‌ی EAI در جنوب شرقی آسیا، هند و آفریقای شرقی وجود دارد و سویه‌ی T در آفریقا بیشترین شیوع را دارد (۱۷). سویه‌ی بیجینگ سویه‌ی دیگری است که در این مطالعه به فراوانی ۵/۵ درصد مشاهده شد که جزء گروه‌های اصلی ژنتیکی ۱ می‌باشند. سویه‌ی بیجینگ در مطالعه‌ی قبلی ایران ۲۰/۵ درصد گزارش شد (۱۹). سویه‌های بیجینگ برای اولین بار در بیماران TB در ناحیه‌ی پکن چین شناسایی شد که در کشورهای آسیای شرقی در اواسط ۱۹۵۰ غالب‌ترین سویه بودند. اخیراً سویه‌ی بیجینگ به همراه چند شیوع در آمریکا، آفریقای جنوبی، آلمان، جزایر قناری، روسیه، و استوانی، وجودداشته است (۲۳). امروزه سویه‌ی بیجینگ مایکوباکتریوم توبرکلوزیس توجه زیادی را در دنیا به خود معطوف کرده است، چرا که ویژگی‌های بیماری‌زایی مهمی از جمله داشتن ارتباط با مقاومت چند دارویی را دارا می‌باشد که این امر احتمالا به‌علت وجود الل‌های مستعد جهش در

Archive of SID
www.SID.ir

ژن‌های mut T می‌باشد (۲۴). مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به چند دارو (MDR)، که تحت عنوان سویه‌ی مقاوم به دو داروی ضد سلی مهم یعنی ایزونیازید وریفامپین نامیده می‌شود، یک تهدید جدی برای کنترل سل می‌باشد. افرادی که با سویه‌های مقاوم به دارو آلوده می‌شوند، سیر درمانی مشکلی دارند، در ضمن، هزینه زیادی نیز می‌پردازند. که در این مطالعه ۴۶ درصد از سویه‌ی بیجینگ جدا شده به روش اسپولیگو تایپینگ، MDR بودند.

نتیجه‌گیری

در خاتمه می‌توان نتیجه گرفت که روش اسپوگیلوتایپینگ برای تمایز سویه‌های کمپلکس مایکوباکتریوم *M.africanum* (*M.tuberculosis* ، *M.bovis* ، *M.microtti* ، *M.canetti*) و نیز مطالعات اپیدمیولوژیکی قابل استفاده است. این روش همچنین برای نمونه‌های کشت منفی استفاده می‌گردد. این روش ساده، آسان، تکرارپذیر و دارای حساسیت بالا می‌باشد و در هر بار انجام این روش، می‌توان تعداد ۴۳نمونه را از هم متمایز کرد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از همکاری مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی، آزمایشگاه رفرانس سل کشوری واقع در بیمارستان مسیح دانشوری جهت فراهم آوری منابع مالی و همچنین از پرسنل آزمایشگاه رفرانس سل کشوری به خاطر کمک‌های آزمایشگاهی روتین تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

1- Narayanan S. Molecular epidemiology of tuberculosis, Review Article, 2004.

2- Kanduma E, McHugh TD and Gillespie SH. Molecular methods for Mycobacterium tuberculosis strain typing :a users guide , *J Appl Microbiol*. 2003; 94: 781-91.

3- Valcheva V, Mokrousov I, Rastogi N, Narvskaya O, Markova N. Molecular Characterization of Mycobacterium tuberculosis isolates from different regions of Bulgaria. *J Clin Microbiol*. 2008; 46: 1014-8.

4- Murray M, Nardell E. Molecular epidemiology of tuberculosis: achievements and challenges to current knowledge. *Bull WHO*. 2002; 80: 477-82.

5- AL-Hajoj SA, Zozio T, Al-Rabiah F, et al. Viquar M, et al. First insight into the population structure of Mycobacterium tuberculosis in Saudi Arabia. *J Clin Microbiol*. 2007; 45: 2467-73.

6- Gori A, Bandera A, Marchetti G, et al. Spoligotyping and Mycobacterium tuberculosis. *Emerg Infect Dis*. 2005; 11: 1242-8.

7- Hermans PW, Van Soolingen D, Bik EM, de Haas PE, Dale JW, Van Embden JD. 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: 2695-707.

8- Mostrom P, Gordon M, Sola C, Ridell M, Rastogi N. Method used in the molecular epidemiology of tuberculosis. *J clin Microbiol Infect*. 2002; 8: 694-704.

9- Sebban M, Mokrousov I, Rastogi N, Sola C. A data- mining approach to spacer oligonucleotide typing of Mycobacterium

Archive of SID
www.SID.ir

tuberculosis. *Bioinformatics.* 2002; 18: 235-43.
10- Farnia P, Varahram M, Doraghi M, et al. Druge susceptibility test againt mycobacterium tuberculosis. Mycobacteriology Research Center (MRC), National Research Institute Of Tuberculosis and Lung Disease (NRITLD): Tehran; 2007.
11- Farnia P, Mohammadi F, Masjedi MR, et al. Evaluation of tuberculosis transmission in Tehran: using RFLP and spoligotyping methods. *J Infect.* 2004; 49: 94-101.
12- Dale JW, Brittain D, Cataldi AA, et al. Spacer oligonucleotide typing of bacteria of the Mycobacterium tuberculosis complex: recommendations for standardised nomenclature. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2001; 5: 216-9.
13- Van Soolingen D.Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. *J Inter Med.* 2001; 249: 1-26.
14- Sola C, Ferdinand S, Mammina C, Nastasi A, Rastogi N. Genetic diversity of Mycobacterium tuberculosis in Sicily based on spoligotyping and variable number of tandem DNA repeats and comparison with spoligotyping database for population based analysis. *J Clin Microbiol.* 2001; 39: 1559-65.
15- Gutierrez MC, Ahmed N, Willery E, et al. Predominance of ancestral Lineages of Mycobacterium tuberculosis in India. *Emerg Infect Dis.* 2006; 12:1367-74.
16- Milans SJ, Hauge KA, Kurepina NE, et al. Expanded Geographical Distribution of the N Family of Mycobacterium tuberculosis Strains within the United States. *J clin microbial.* 2004; 42: 1064-8.
17- Duchene V, Ferdinand S, Filliol I, Guegan JF, Rastogi N, Sola C, et al. Phylogenetic reconstruction of Mycobacterium tuberculosis within four settings of the Caribbean region: tree comparative analyse and first appraisal on their phylogeography. *Infect Genet Evol.* 2004; 4: 5-14.
18- Ali A, Hasan Z, Tanveer M, et al. Characterization of Mycobacterium tuberculosis Central Asian Astrain 1 using mycobacterial interspersed repetitive unite genotyping, *BMC Microbiol.* 2007; 7: 76.
19- Zozio T, Allix C, Gunal S, et al. Genotyping of Mycobacterium tuberculosis clinical in two cities of Turkey: description of a new family of genotypes that is phylogeographically specific for Asia Minor. *BMC Microbiol.* 2005; 5: 44.
20- Ramazanzadeh R, Amirmozafari N, Farnia P, Ghazi F. Genotyping of Mycobacterium tuberculosis isolate from TB patients with spoligotyping. *J Kurdistan uni Med sci.* 2006; 11:50-9.
21- Najafizadeh K, Ghorbani F, Farnia P, Shiehmorteza M, Jamali M. Spoligotyping of Mycobacterium tuberculosis in anthracotic bronchitis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2008; 12: 962-6.
22- Farnia P, Masjedi MR, Mirsaeidi M, et al. Prevalence of Haarlem I and Beijing types of Mycobacterium tuberculosis strains in Iranian and Afghan MDR-TB patients, *J Infect.* 2006; 53: 331-6.

Archive of SID

www.SID.ir

23- Drobniewski F, Balabanoua Y, Ruddy M, et al. Refampin and multidrug- resistant tuberculosis in Russian civilians and Prison Inmates:Dominance of the Beijing Strain Family. *Emerg Infect Dis.* 2002; 8: 1320-6.

24- Mokrousov I, Narvskaya O, Limeschenko E, Vyazovaya A, Otten T, Vyshnevskiy B. Analysis of the allelic diversity of the mycobacterial interspersed repetitive units in Mycobacterium tuberculosis strain of the Beijing family: practical implications and evolutionary consideration. *J Clin Microbiol.* 2004; 42: 2438-44.

Archive of SID

www.SID.ir

Mycobacterium Tuberculosis Complex Strains Identification with Spoligotyping Method in Patients Attending to Masih Daneshvari Hospital

Ahmadi M[1], Farnia P[1], Tajedin E[1], Tabarsi P[1], Baghaei P[1], Masjedi M[1], Velayati A[1]

[1]Mycobacteriology Research Center (MRC), National Research Institute of Tuberculosis and Lung Disease (NRITLD), Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Corresponding Author: Tajedin E, Mycobacteriology Research Center (MRC), National Research Institute of Tuberculosis and Lung Disease (NRITLD), Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Email: elahe_tajedin@yahoo.com

Received: 3 Dec 2008 **Accepted:** 15 Jul 2009

***Background and Objective*:** Spoligotyping is a method based on 36bp Direct Repeat (DR) chromosomal loci polymorphism which is connected to one or two 35-41 bp spacer sequences. There are 94 different intra DR spacer sequences which are identified so far and only 43 of them are used as usual. Mycobacterium tuberculosis complex strains can be identified based on lacking or having these sequences.

Materials and Methods: Spoligotyping test was carried out on 238 TB smear positive patients. Primary separation of mycobacterium strains was done through Petrof 4% method and Lowenstein Jensen (LJ) media. Biochemical tests such as Niacin test/Catalase activity/Nitrate reduction were done in order to identify the strains. Drug sensitivity to INH (0.2Mg/ml)/ RIF (40Mg/ml)/ STM (10Mg/ml) and ETBl (2Mg/ml) identified by proportional method and according to that, the strains were divided into three groups: sensitive, multi drug resistance (MDR) and non MDR. Then DNA was extracted by CTAB method from the positive colonies. Sequences were amplified by PCR and after denaturizing, hybridization with Streptavidine peroxidase enzyme was performed by Line reverse blot method. Radiography was done after adding the Luminoscense and membrane onto the X-ray films.

Results: Serotypes were divided into 9 groups (Beijing/ CAS1/ Haarlem / U/ T2/ T1/ EAI3/ EAI2 and CAS2). Most of the strains were from Haarlem (27%) and CAS1 (25%) groups. Two strains were also identified in this method that belonged to Mycobacterium bovis.

Conclusion: Spoligotyping method is an easy, rapid and sensitive test in order to identify Mycobacterium tuberculosis complex strains**.**

Keywords: Spoligotyping, Mycobacterium Tuberculosis, TB patients

Archive of SID

www.SID.ir