تعیین سوش‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس جدا شده از بیماران در ایـران بـا روش Double Repititive Element - Polymerase Chain Reaction

غلامرضا ایراجیان*[1] (Ph.D)، محمد حسین کیوان امینه[2] (Ph.D)، سید علی فاضلی[3] (Ph.D)، محمد رضا مسجدی[4] (M.D)، علی اکبر ولایتی[4] (M.D)

۱ - دانشگاه علوم پزشکی سمنان، دانشکده پزشکی،بخش میکروبیولوژی

۲ - دانشگاه تهران، دانشکده دامپزشکی

۳ - دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده پزشکی

۴ - مرکز تحقیقات سل و بیماری‌های ریوی، تهران

خلاصه

سابقه و هدف: بیماری سل هر سال عامل مرگ ۳ میلیون نفر در جهان می‌باشد و در حال حاضر ۴ میلیون مورد فعال بیماری سل در دنیا وجود دارد. با توجه به ماهیت بیماری سل و مدت زمان مورد نیاز برای تشخیص مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (عامل بیماری سل)،اصلی‌ترین استراتژی برای محدود کردن انتشار این باکتری ردیابی افراد آلوده می‌باشد. تعیین سویه‌های جدا شده از افراد آلوده می‌تواند نقش مهمی در ردیابی منبع عفونت ایفا نماید.

مواد و روش‌ها: ۷۰ نمونه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس که از مرکز تحقیقات سل و بیماری‌های ریوی دریافت گردیده بود با روش DRE-PCR (Double repititive element - polymerase chain reaction) تعیین سویه شد. ابتدا DNA باکتری استخراج و سپس با روش PCR قطعه مورد نظر تکثیر شد و محصولات PCR الکتروفورز و باندهای حاصل مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: ۷۰ نمونه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس که مربوط به ۱۳ استان کشور و ۹ نفر مهاجر بود به ۱۴ گروه تقسیم شدند. در ۷۰ نمونه ۴۲ سویه تشخیص داده شد و میزان تنوع ۶۰ درصد می‌باشد که نزدیک یا مشابه سایر مطالعات است. ۳۱ عدد از الگوها (سویه‌ها) منحصر به فرد بوده و ۳۹ عدد از آنها در ۱۱ کلاستر قرار گرفتند که نتایج تقریباً مشابه با سایر مطالعات می‌باشد. ارتباط معنی داری بین الگوی خاص و محل سکونت، مهاجر بودن و مقاومت به ترکیبات ضد سلی مشاهده نشد.

نتیجه گیری: روش DRE-PCR به علت ساده بودن، کم هزینه بودن و سرعت زیاد یک روش مناسب برای تعیین سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در ایران می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، PCR، DRE-PCR

مقدمه

بیماری سل هنوز به عنوان یک مشکل جهانی باقی مانده است و محاسبات اخیر نشان می‌دهد که در بسیاری از کشورها برنامه‌های کنترلی در محدود کردن انتشار آن مؤثر نبوده است [۱۸]. سازمان بهداشت جهانی بیماری سل را یک اورژانس جهانی اعلام کرده است [۲۹]. تخمین زده می‌شود که ۱/۷ میلیارد نفر توسط مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (Mycobacterium

* نویسنده مسئول. تلفن: ۳۲۰۸۲ - ۰۲۳۱

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

(MT, tuberculosis) آلوده شده و این باکتری هر سال عامل مرگ ۳ میلیون نفر در جهان می‌باشد. هر سال ۸ - ۷/۵ میلیون مورد جدید در دنیا بروز کرده [۱۸] و حدود ۴۰ میلیون مورد فعال بیماری در جهان وجود دارد که اغلب موارد مربوط به کشورهای در حال توسعه و فقیر می‌باشد [۲۹]. در ایران طبق اطلاعات اداره کل پیشگیری و مبارزه با بیماری‌ها میزان بروز بیماری به طور متوسط ۲۱ مورد در هر ۱۰۰۰۰۰ نفر می‌باشد [۱]. عوامل کلیدی در کنترل بیماری سل، تشخیص سریع، درمان مناسب و ردیابی تماس برای جلوگیری از انتقال بیشتر بیماری می‌باشد [۱۴]. برای ردیابی نیاز به تعیین سویه‌های MT می‌باشد که با روش‌های رایج آزمایشگاهی امکان پذیر نبوده و با توجه به ماهیت بیماری سل این کار با روش‌های رایج اپیدمیولوژیکی مشکل و در بعضی موارد غیر ممکن است. لذا استفاده از تکنیک‌های مولکولی (DNA finger-printing) که در حال حاضر تنها روش تعیین سویه‌های MT می‌باشد اجتناب ناپذیر می‌باشد. تکنیک مولکولی می‌تواند در تشخیص راههای انتقال و تعیین میزان انتقال جدید در مقابل فعال شدن مجدد عفونت نیز مفید باشد [۲۷].

با توجه به وضعیت بیماری سل در ایران و پیش بینی بدبینانه جهانی نسبت به وضعیت سل در آینده نیاز مبرمی به استفاده از تکنیک‌های مولکولی برای تشخیص و تعیین سویه‌های MT در ایران احساس می‌شود. لذا هدف از این پژوهش پاسخگویی به بعضی از نیازهای موجود (تعیین سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس جدا شده از بیماران و ...) می‌باشد. تکنیک‌های مختلفی بر اساس استفاده از IS6110 (Inseretion sequence) و سایر شاخص‌های ژنتیکی برای تعیین سویه‌های MT وجود دارد که در این پژوهش از تکنیک DRE-PCR که از سایر تکنیک‌های مولکولی ساده‌تر و کم هزینه‌تر بوده و نتایج حاصل از آن قابل اعتماد می‌باشد استفاده شده است. به علاوه چون تعداد کپی IS6110 در سویه‌های جدا شده از بیماران آسیایی معمولاً کم می‌باشد [۲۹،۷۶]، این تکنیک، بر خلاف اکثر تکنیک‌های مولکولی مورد استفاده، قادر به تفکیک این سویه‌ها نیز می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه. تعداد ۷۰ نمونه MT تائید شده از آزمایشگاه مایکوباکتریولوژی مرکز تحقیقات سل و بیماری‌های ریوی (بیمارستان مسیح دانشوری) که در محیط کشت Lowenstein-Jensen (LJ)، کشت داده شده بودند، دریافت شد. برای این نمونه‌ها آزمایش تعیین حساسیت داروئی انجام شده بود. ضمناً دو نمونه مایکوباکتریوم غیر سلی (Mycobacterium other than tuberculosis, MOTT) به نام‌های M. Gordonae و M. Gadium نیز دریافت گردید.

استخراج DNA. در این روش یک کلنی میکرب را از محیط کشت LJ برداشته و در یک میلی‌لیتر از سرم فیزیولوژی استریل حل کرده تا سوسپانسیون تشکیل شود. سوسپانسیون مذکور را به مدت ۲۰ دقیقه در آب جوش قرار داده تا باسیل‌ها کشته شوند [۳]. سپس آن را با میکروسانتریفوژ به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰g سانتریفوژ کرده، به رسوب حاصل ۵۰۰ میکرولیتر بافر TE (50 mM Tris-HCl+ 10 mM EDTA, pH=7) حاوی 10 mg/ml لیزوزیم اضافه کرده، آن را مخلوط کرده و به مدت یک ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد قرار دادیم. سپس آن را سانتریفوژ کرده و رسوب حاصل را در ۵۰۰ میکرولیتر از بافر TE که حاوی ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر پروتئیناز K و یک درصد SDS (Sodium dodecyl sulfate) می‌باشد، حل کرده و مخلوط را به مدت ۳۰ دقیقه در ۶۵ درجه سانتیگراد قرار دادیم. سپس ۱۰ میکرولیتر از محلول ۳۰ درصد SDS به مخلوط اضافه کرده تا غلظت SDS به ۴ درصد برسد و مخلوط را به مدت یک ساعت در ۷۵ درجه سانتیگراد قرار دادیم. سپس مخلوط را از بن‌ماری خارج و به مدت ۱۴ ساعت در ۲۵-۲۰ درجه سانتیگراد قرار داده و سپس با روش فنل-کلروفرم، DNA را تخلیص و با استفاده از اتانول، آن را رسوب داده [۲، ۱۹] و رسوب را در ۱۰۰ میکرولیتر

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

از آب مقطر یخچال نگاهداری می‌کنیم. این مخلوط برای انجام PCR مورد استفاده قرار می‌گیرد.

روش انجام PCR. توالی آغازگرهای مورد نیاز از Gene Bank تحت شماره m ۹۵۴۹۰ گرفته شد [۹].این آغازگرها قطعه موجود بین IS6110 و PGRS (Polymorphic GC-rich repetitive sequence) را تکثیر می‌کنند که این قطعه در سویه‌های مختلف از نظر تعداد، وزن مولکولی و محل قرار گرفتن متفاوت بوده و این تفاوت اساس افتراق سویه‌های MT می‌باشد. آغازگرها توسط مرکز تحقیقات ملی مهندسی ژنتیک ایران سنتز گردید. غلظت، نوع ترکیبات، زمان‌های مورد نیاز و تعداد سیکل‌های PCR بر اساس کار Cindy [۹] و Motoro [۱۶] تعیین و با اندکی تغییر به شرح زیر مورد استفاده قرار گرفت.

حجم مخلوط PCR ۵۰ میکرولیتر بود که حاوی ۵ میکرولیتر بافر PCR (20 mM Trism-HCl, pH= ۸/۶ +50 mM KCl) از BM (Boehringer Mannheim) و ۲/۵ میکرولیتر MgCl2 (۵۰mM) و یک میکرولیتر از مخلوط دزکسی ریبونوکلوتید تری فسفات (dNTPs, BM) و ۳ میکرولیتر DMSO می‌باشد.

یک میکرولیتر از هر کدام از آغازگرها (۴ عدد آغازگر)، ۵ میکرولیتر از محلول DNA، یک میکرولیتر از محلول یک واحدی Tag Ploymerase (BM)، و ۲۸/۵ میکرولیتر آب مقطر می‌باشد. PCR به وسیله ترموسیکلر Genius انجام شد. برنامه آن عبارت است از ۱۰ دقیقه در ۹۵ درجه سانتیگراد و ۳۵ سیکل (هر سیکل شامل یک دقیقه در ۹۴ درجه سانتیگراد برای دناتوره شدن، ۲ دقیقه در ۵۶ درجه سانتیگراد برای اتصال آغازگرها و ۳ دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد برای سنتز DNA می‌باشد). محصولات PCR به وسیله آگارز ۲ درصد الکتروفورز گردید و سپس با اتیدیوم بروماید (Ethidium Bromide) رنگ آمیزی و با استفاده از UV-Transluminator رویت و به وسیلهٔ دوربین پولاروید از ژل‌ها عکس برداری گردید. مارکر DNA به کار رفته در این بررسی مارکر شماره ۱۴ (XIV) از شرکت BM می‌باشد.

روش آماری. از آزمون کای اسکوئر در سطح معنی‌دار ۵ درصد برای تجزیه و تحلیل استفاده شده است.

نتایج

۷۰ نمونه مورد بررسی مربوط به ۱۳ استان ایران بوده‌اند که ۹ نفر مهاجر نیز در میان آنها وجود دارد که تحت یک گروه جداگانه مورد بررسی قرار گرفتند. توزیع فراوانی نمونه‌ها در ۱۴ منطقه در جدول شماره ۱ مشخص می‌باشد.

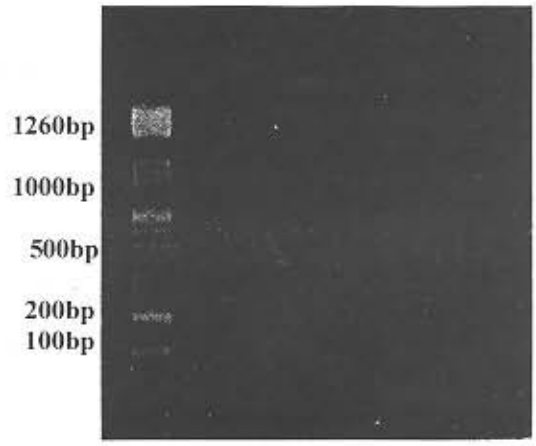
جدول ۱. فراوانی و درصد نمونه از هر استان

استان	تعداد	درصد
اردبیل	۱	۱/۴
اصفهان	۳	۴/۳
آذربایجان شرقی	۵	۷/۱
آذربایجان غربی	۳	۳۴
تهران	۹	۱۲/۹
سمنان	۲	۲/۹
سیستان و بلوچستان	۲	۲/۹
کرمانشاه	۳	۴/۳
گیلان	۷	۱۰
مازندران	۲	۲/۸
مرکزی	۱۱	۱۵/۷
مهاجران	۹	۱۲/۹
همدان	۱۰	۱۴/۳
جمع	۷۰	۱۰۰

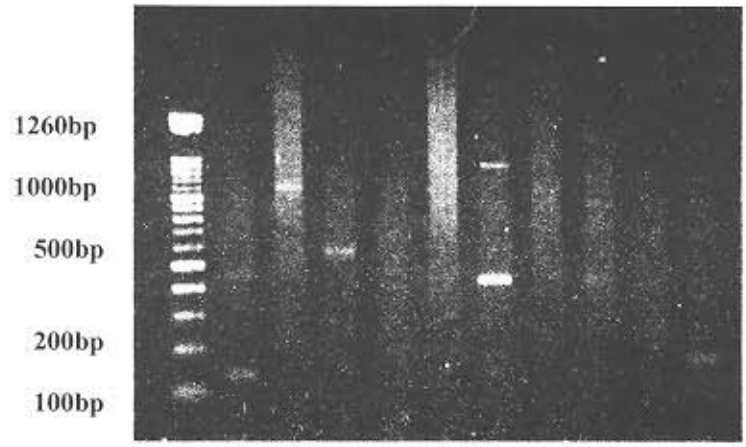
برخی از الگوهای الکترفورتیک قطعات DNA (سویه‌ها) حاصل از PCR ۷۰ نمونه در تصاویر شماره ۱ و ۲ نشان داده شده است. این الگوها ۶۱/۴ درصد یک باندی، ۱۸/۱۶ دو باندی، ۱۰ درصد ۳ باندی، ۸/۶ درصد ۴ باندی و ۱/۴ درصد ۶ باندی بوده‌اند.

در ۷۰ گونه، ۴۲ سویه تشخیص داده شد که ۳۱ الگو

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

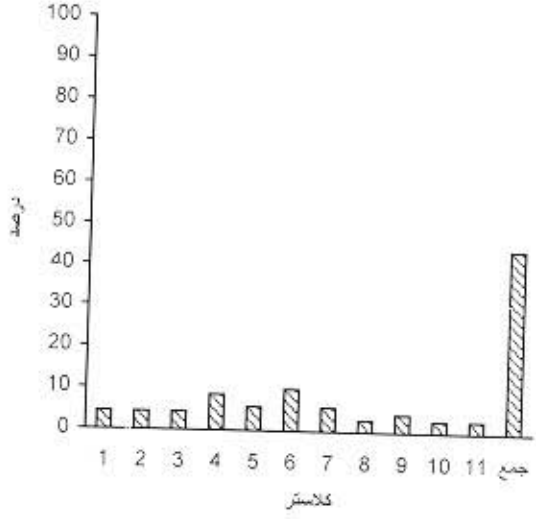


تصویر شماره ۱



تصویر شماره ۲

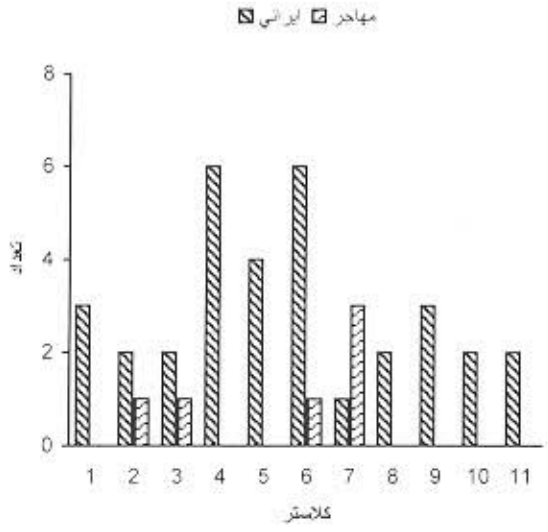
(۴۴/۳ درصد) منحصر به فرد و ۳۹ الگو (۵۵/۷ درصد) در ۱۱ کلاستر قرار گرفتند (نمودار ۱). میزان تنوع (نسبت سویه‌ها به کل نمونه‌ها) ۶۰ درصد می‌باشد.



نمودار ۱. توزیع نمونه‌ها در کلاسترها و الگوهای منحصر به فرد

کلاسترها دارای الگوهای ۱ و ۲ و ۴ باندی می‌باشند و بیشترین درصد در الگوهای یک باندی قرار گرفته‌اند. کلاسترها در مناطق مختلف پراکنده بودند و الگوی خاصی در ارتباط با منطقه خاص مشخص نشد. آزمون Chi-Square نیز این عدم ارتباط را نشان می‌دهد (PV=۰/۸).

۹ عدد از نمونه‌ها مربوط به مهاجران می‌باشد که ۶ عدد آنها در کلاسترها قرار گرفته و ۳ مورد الگوی منحصر به فرد دارند و مشخص گردید که از نظر آماری ارتباط معنی‌داری بین سویه‌های مربوط به مهاجران و کلاستر خاصی وجود ندارد (P = ۰/۱) (نمودار ۲).



نمودار ۲. توزیع کلاسترها به تفکیک تابعیت فرد

از نظر آماری ارتباط معنی‌داری بین مقاومت به چهار ترکیب ضد سلی ریفامپین، ایزونیازید، استرپتومایسین و اتامبوتول و قرار گرفتن در کلاستر خاصی وجود ندارد

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

(مقدارP به ترتیب ۰/۴، ۰/۳۵، ۰/۱ و ۰/۳۷ می‌باشد). توزیع نمونه‌های مقاوم به استرپتومایسین در کلاسترهای مختلف در جدول شماره ۲ نشان داده شده است. وضعیت حساسیت به ترکیبات ضد سلی دیگر نیز مشابه استرپتومایسین می‌باشد.

جدول ۲. توزیع سویه‌های مقاوم به استرپتومایسین در کلاسترهای مختلف

استرپتومایسین / کلاستر	حساس		مقاوم		نامشخص	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
۱	۳	۱۰۰				
۲	۳	۱۰۰				
۳	۲	۶۶/۷	۱	۳۳/۳		
۴	۵	۸۳/۵	۱	۱۶/۷		
۵	۳	۷۵			۱	۲۵
۶	۵	۷۱/۴	۲	۲۸/۶		
۷	۲	۵۰			۲	۵۰
۸	۲	۱۰۰				
۹	۲	۶۶/۶	۱	۳۳/۴		
۱۰	۱	۵۰	۱	۵۰		
۱۱			۲	۱۰۰		
جمع	۲۸		۸		۳	

بحث

پیش بینی شده است که میزان بروز کلی بیماری سل در جهان در سال‌های ۲۰۰۰ - ۱۹۹۰ میلادی ۳۶ درصد افزایش یابد [۸]. میزان مذکور اخیراً برای بعضی از کشورهای اروپای غربی و صنعتی افزایش یافته و ممکن است در آینده نزدیک باز هم میزان بروز افزایش بیشتری یابد [۲۴]. نظر به این که تشخیص قطعی MT با روش‌های آزمایشگاهی (کشت) به زمان زیادی نیاز دارد، و ردیابی افرادی که با انسان‌های آلوده تماس داشته‌اند، اصلی‌ترین استراتژی برای محدود کردن انتشار MT می‌باشد، لذا تعیین سویه‌های MT جدا شده از افراد آلوده می‌تواند یک نقش مهم در ردیابی عفونت ایفا نماید [۱۳]. برای تعیین سویه‌ها می‌توان از شاخص‌های ژنتیکی از قبیل IS6110 [۵،۹،۱۳،۱۷،۲۲، ۲۳، ۲۵]، PGRS [۶، ۹، ۱۷، ۱۸، ۲۱، ۲۳، ۲۴] و Dr (Direct repeat) [۱۱،۱۷،۱۸،۲۱، ۲۳، ۲۴] استفاده کرد. روش‌هایی که با استفاده از شاخص‌های فوق‌الذکر برای تعیین سویه‌های مورد استفاده قرار می‌گیرند شامل پروب DNA، DRE-PCR، RFLP-PCR (Restriction fraegment length polymorphism) و Spoligotyping می‌باشد.

روش DRE-PCR ساده و کم هزینه بوده و به زمان بسیار کمی برای کسب نتایج قابل تفسیر نیاز دارد و ارزش تحقیقاتی آن معادل با تکنیک RFLP است [۹، ۷، ۲۱، ۲۴]. برای انجام DRE-PCR به مقدار کمی باکتری نیاز بوده و این روش نیازی به هضم با RE (Restriction Enzyme) و انجام Southern Blot ندارد و با توجه به اینکه اغلب گزارش‌ها حاکی از این است که تعداد کپی IS6110 در اکثر سویه‌های آسیایی کم می‌باشد [۹، ۱۱، ۲۴، ۲۶، ۲۸]، این روش قادر به افتراق میان سویه‌های با تعداد کمی کپی IS6110 می‌باشد.

با توجه به این مسایل و نظر به اینکه روش‌های آزمایشگاهی برای تشخیص شاخص‌های ژنتیکی نیاز به ساده شدن دارند تا امکان دسترسی به آن برای آزمایشگاه‌های بالینی کشورهای صنعتی و در حال توسعه افزایش یابد [۹]، این روش برای تعیین سویه‌های MT در این بررسی انتخاب گردید.

در بررسی حاضر ۷۰ نمونه MT و دو نمونه MOTT مورد بررسی قرار گرفتند که نمونه‌های MOTT هیچ گونه باندی تشکیل ندادند. الگوهای حاصل از بررسی حاضر ۶۱/۴ درصد دارای یک باند، ۱۸/۶ درصد دارای دو باند، ۱۰ درصد ۳ باندی، ۸/۶ درصد ۴ باندی، و ۱/۴ درصد ۶ باندی بودند (تصاویر ۱ و ۲).

در بررسی انجام شده توسط Cindy و همکاران [۹] در آمریکا الگوهای بدست آمده با روش DRE-PCR دارای ۱/۶ باند بودند که مشابه نتایج مطالعه حاضر می‌باشند. در بررسی Sola و همکاران [۲۱] که در اسپانیا

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

و با روش DRE-PCR انجام شد میزان تنوع ۵۴/۳ درصد و تعداد باندها ۱/۳ عدد می‌باشد.

در بررسی حاضر میزان تنوع ۶۰ درصد می‌باشد. در مطالعه Cindy و همکاران [۹] و مطالعه Montoro [۱۱] در کوبا که دو روش RFLP و DRE - PCR به کار گرفته شد میزان تنوع ۷۶/۳ درصد می‌باشد. میانگین میزان تنوع با روش DRE-PCR، ۶۵/۵ درصد می‌باشد که نزدیک به نتایج این مطالعه می‌باشد. در مواردی که دو روش RFLP و DRE-PCR مورد استفاده قرار گرفتند، میزان تنوع حاصل از روش DRE-PCR به تنهایی بیشتر است [۴، ۱۱، ۲۱، ۲۲]. در بررسی حاضر ۳۱ الگو (۴۴/۳ درصد) منحصر به فرد و ۳۶ الگو (۵۵/۷ درصد) در ۱۱ کلاستر قرار گرفتند.

در مطالعه Cindy و همکاران [۹]، ۴۰ درصد الگوها منحصر به فرد و ۶۰ درصد در کلاستر قرار گرفتند. در مطالعه Montoro و همکاران [۱۱]، ۶۰ درصد الگوها منحصر به فرد و ۴۰ درصد در کلاستر قرار گرفتند. در مطالعهٔ Sola و همکاران [۲۰] در فرانسه ۵۴ درصد الگوها منحصر به فرد و ۴۶ درصد الگوها در ۱۰ کلاستر قرار گرفتند. بنابراین نتایج این مطالعه با سایر مطالعات نزدیک یا مشابه می‌باشد.

سویه‌های حاوی یک باند در کل سویه‌ها ۶۱/۴ درصد و در سویه‌های موجود در کلاستر ۸۹ درصد می‌باشد که بیشترین درصد را به خود اختصاص داده و از سایر مطالعات انجام شده نیز بیشتر می‌باشد. اگر فرض را بر این بگذاریم که هر باند معرف یک کپی از IS6110 می‌باشد مفهوم یافته‌های ما این است که اکثر سویه‌های موجود در مطالعه حاضر حاوی یک کپی از IS6110 می‌باشند و با این نظریه که سویه‌های آسیایی اکثراً دارای تعداد کم از IS6110 می‌باشند، مطابقت دارد. در بررسی حاضر کلاسترها در مناطق مختلف کشور پراکنده بوده و الگوی خاصی در ارتباط با منطقه‌ای خاص مشخص نشده است.

در مطالعه Chevrel-Dellagi و همکاران [۷] که در تونس انجام گردید و از نظر جمعیت مورد مطالعه شبیه به مطالعه حاضر می‌باشد (عدم ارتباط اپیدمیولوژیک بیماران) نیز الگوها در سراسر ناحیه مورد بررسی پراکنده بوده و ارتباطی میان نوع الگوها با منطقه‌ای خاص وجود نداشته است.

۹ عدد از نمونه‌ها مربوط به مهاجران می‌باشد و از نظر آماری ارتباط معنی‌داری میان الگوی مربوط به مهاجران و کلاستر خاصی وجود ندارد. با توجه به این که مهاجران افغانی سالیان زیادی است که وارد ایران شده‌اند و با مردم ایران زندگی می‌کنند، شباهت الگوی سویه‌های مربوط به آنها با الگوی سویه‌های بیماران ایرانی دور از انتظار نمی‌باشد.

در مطالعه حاضر از نظر آماری ارتباط معنی‌داری بین سویه‌های مقاوم به چهار داروی ضد سلی و حضور در کلاستر خاصی وجود ندارد. در سایر مطالعات نیز این عدم ارتباط مشاهده شده است [۴، ۷، ۲۵، ۲۸].

به طور کلی، روش DRE-PCR نسبت به سایر روش‌های مولکولی برای تعیین سویه‌های MT در ایران مناسب‌تر می‌باشد که دلایل این مزیت به شرح ذیل می‌باشد:

۱- ساده بودن، هزینه کم و سرعت زیاد روش DRE-PCR

۲ - در مطالعات مختلف مشخص شده که نتایج حاصل از آن معادل سایر روش‌ها می‌باشد و حتی در مواردی که تعداد کپی IS6110 یک عدد می‌باشد قدرت تفکیک بیشتری نسبت به سایر روش‌ها دارد.

تشکر و قدردانی

از معاونت محترم دانشگاه علوم پزشکی اصفهان که امکانات مالی این تحقیق را فراهم کرده است و از آقای دکتر کیومرث قاضی سعیدی و آقای دکتر مجید یاران که در انجام این پژوهش همکاری داشته و از سرکار خانم دکتر محمدی و خانم دکتر فرنیا که امکان دریافت نمونه‌ها را فراهم کردند کمال تشکر را دارم.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

منابع

[۱] سالک، س. اداره کل بیماری‌های واگیردار - ۱۳۷۶

[2] Becker, J.M., Caldwell-Guy, A., Zachgo, E.A., "Biotechnology: A laboratory course" USA, Academic Press, Inc. 1990. pp:203-207.

[3] Bemer-Melchior, P. and Drugeon, H.B., Inactivation of Mycobacterium tuberculosis for DNA typing analysis, J. Clin. Microbiol. 37 (1999) 2350-2351.

[4] Burger, M., Raskin, S., Brockelt, S.R., Amthor, B., Geiss, K. and Hass, W., DNA finger printing of Mycobacterium tuberculosis complex culture isolates collected in Brazil and Spotted onto Filter, J. Clin. Microbiol., 36 (1998) 573-579.

[5] Cave, M.D., Eisenach, K.D. and McDermott, P.F., IS6110 Conservation of sequence in the Mycobacterium tuberculosis complex and its utilizition in DNA finger printing, Mol. Cell Probe, 5(1991)73-80.

[6] Chave, F., Yang, Z., EL-Hajj, H., Alonson, M., Bukmah, W., Eisenach, K., Doranda, F., Bates, J. and Cave, D., Usefulness of the secondary probe PTBN12 in DNA finger printing of Mycobacterium tuberculosis, J. Clin. Microbiol., 34 (1996) 1118-1123.

[7] Chevrel-Dellagi, D., Abderrahman, A., Haltiti, R., Koubaji, H., Gicquuel, B. and Dellagi, K., Large scale DNA finger printing of Mycobacterium tuberculosis strains as a tool for epidemiological studies of tuberculosis, J. Clin. Microbiol., 31(1993) 4226-4450.

[8] Dolin, P.J., Raviglione, M.C. and Kochi, A., Global tuberculosis incidence and mortality during 1990-2000, Bull World Health Organ 72 (1994) 213-220.

[9] Friedman, C.R., Stoeckle, M.Y. and Rilley, L.W., Double repetitive element-PCR method for subtyping Mycobacterium tuberculosis clinical isolated, J. Clini. Microbiol., 33 (1995) 1383-1384.

[10] Goyal, M.S., Aunders, N.A., Van Embden, J.D.A., Young, D.B. and Shaw, R.J., Differentiation of Mycobacterium tuberculosis isolates by spoligotyping and IS6110 restriction fragment length polymorphism, J. Clin. Microbiol., 35 (1997) 647-651.

[11] Gutierrez, M.C., Vincent, V., Aubert, D., Bizet, J., Gaillot, O., Lebrun, L. and Pierre-Audigier, C., Molecular finger printing of Mycobacterium tuberculosis and risk factors for tuberculosis transmission in Paris, France and surrounding area, J. Clin. Micribiol., 36 (1998) 486-492.

[12] Hance, A.J.B., Grondchom, P.V. and Levy-Frebault, D., Detection and identification of Mycobacterium by amplification of mycobacterial, Mol Microbiol., 3 (1989) 843-849.

[13] Hermans, P.W.M., van Soolingen, D., Dale., J.W., Schuttema, A.J., MacAbam, R.A., Catty, D. and van Emdden, J.D.A., Insertion element IS686 from Mycobacterium tuberculosis: a useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis, J. Clin. Microbiol., 28(1990)2051-2058.

[14] Kamerbek, J., Schouls, L., kolk, A., van Agterveld, M., van Soolingen, D. and

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

van Embden, J., Simultaneous detection and strain differentiation of Mycobacterium tuberculosis for diagnosis and epidemiology, J. Clin. Microbiol., 35 (1997)907-944.

[15] Kremer, K., van Soolingen, D. and Frothingham, R., Comparison of methods on different molecular epidemilolgical markers for typing of Mycobacterium tuberculosis complex strains: Interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility, J. Clini. Microbiol., 37 (1999) 2607-2618.

[16] Montoro, E., Valdivia, J. and Cardoso Leao, S., Molecular finger printing of Mycobacterium tuberculosis isolates obtained in Havana Cuba by IS6110 restriction fragment length polymorphism analysis and by the double repetitive - element- PCR method, J. Clin. Microbiol., 36 (1988) 3099-3102.

[17] Neimark, H., Ali Baig, M. and Carleton, S., Direct identification and typing of Mycobacterium tuberculosis by PCR, J. Clin. Microbiol., 34 (1996) 2454-2459.

[18] Ross, B.C., Raios, K., Jockson, K. and Dwyer, B., Molecular cloning of a highly repeated DNA element from Mycobacterium tuberculosis and its use an epidemiological tool, J. Clin. Microbiol., 30 (1992) 942-946.

[19] Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Mariatis, T., "Molecular cloning: A laboratory manual." 2nd Edition, USA, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. pp:1313-3435.

[20] Sola, C., Horgen, L., Devallois, A. and Rastogi, N., Combined numerical analysis based on the molecular description of Mycobacteriun tuberculosis by four repetitve sequence-based DNA typing systems, Res. Microbiol., 149 (1998) 349-360.

[21] Sola, C., Hirgen, L., Maisetti, J., Devallois, A., Seng Goh, K. and Rastogi, N., Spoligotyping followed by double repetitive - element- PCR as rapid alternative to IS6110 finger printing for epidemiological studies of tuberculosis, J. Clin. Microbiol., 36 (1998) 1122-1124.

[22] Strassle, A., Putnik, J., Weber, R., Fehr-Merhof, A., Wust, J. and Pfyffer, G.E., Molecular epidemiology af mycobacterium tuberculosis isolated from patients in a human immunodeficiency virus cohort in Switzerland, J. Clin. Microbiol., 35 (1997) 374-378.

[23] Therry, D., Brisson Noel, A., Vincent-Levy, L., Ngugen, S., Guesdon, J.L. and Gicquel, B., Characterization of a mycobacterium tuberculosis inserion sequence,IS6110, and its application in diagnosis, J. Clin. Microbiol., 28 (1990) 2668-2673.

[24] Toraca, G., Offredo, C. and Simonet, M. The mycobacterium complex and its utilizition in DNA finger printing, Mol. Cell Probe, 5 (1991)73-80.

[25] Van Soolingen, D.M., Herman, P.W., de Haas, P.E., Soll, D.R. and Van Embden, J.D.A., Occurrance and stability of insertion sequence in mycobacterium tuberculosis complex strain: evaluation of an insertion sequence- dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis, J. Clin. Microbiol., 29 (1991) 2578-2586.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

[26] Van Soolingen, D.,de Haas, P.E. and Hermans, P.W.M., Comparison of various repetitive elements as genetic marker For strain differentiation and epidemiology of Mycobacterium tuberculosis, J. Clin. Microbiol., 31 (1993) 1987-1995.

[27] Warren, R., Richardson, M., Sampson, S., Hauman, J.H., Beyers, N., Donald, P.R. and Van Helden, P.D., Genotyping of Mycobacterium tuberculosis with additional markers enhances accuracy in epidemiological studies, J. Clin Microbiol., 34 (1996) 2219-2224.

[28] Yang, Z.H., Mtoni, I., Chonde, M., Mwasekaga, K., Fuursted, K., Askgard, D.S., Benedsen, J. de Haas, P.E., van Sooligen, D., van Embden, J.D. and Andersen, A.B., DNA finger printing and phenotyping of mycobacterium tuberculosis isolates from human immunodeficiency virus (HIV) seropositive and HIV - seronegative patients in Tanzania, J. Clin. Microbiol., 33 (1995) 1064-1069.

[29] Yang, Z.H., de Haas, P.E., Pew Vachmann, C.H., van Soolingen, D., van Embden, J.D.A. and Andersen, A.B., Molecular epidemiology of tuberculosis in Denmark in 1992, J. Clin, Microbiol., 33 (1995) 2077-2081

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

Molecular typing of Mycobacterium tuberculosis by using double repetitive element- polymerase chain reaction method

G.R. Irajian[*1] (Ph.D), M.H. Kayvan Amineh[2] (Ph.D), S.A. Fazeli[3] (Ph.D), A.A. Velayati[4](M.D), M.R. Masjedi[4] (M.D)

1 - Dept. of Microbiology, Faculty of Medicine, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

2 - Faculty of Veterinary Medicine, Tehran University, Tehran, Iran

3 - Dept. of Microbiology, Faculty of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

4 - National Research Institute of Tuberculosis and lung Disases, Tehran, Iran

Introduction. Tuberculosis is still a major worldwide health problem. It is responsible for the death of 3 million people each year. Epidemiological studies with techniques which allow differentiation of strains within the Mycobactrium tuberculosis (MT) are important to limit the dissemination of the disease. Therefore, there is a great need for an improved methods to subtype MT strains by a simple and rapid molecular finger-printing method by usinug double repetitive element-polymerase chain reaction (DRE-PCR) analysis, yields a unique, strain-specific pattern of bands.

Materials and Methods. MT was obtained from the national research institute of Tuberculosis and lung diseases. To perform DRE-PCR, the DNA molecules were extracted, then ampilicated with PCR. Amplication products were analyzed by gel electrophoresis on 2% agarose and generated patterns compared with together. Those patterns that identical for two or more strains among their 70 MT, were considered as cluster patterns.

Results. Fourty-two different patterns were observed in the 70 isolated cases and analyzed. The rate of diversity was 60%, which is the same (approved) as the other studies. Thirty-one (44.3%) of the specimens had unique pattern, and 39 (55.7%) of specimens had strains belonging to one of the 11 clusters. The patterns had 1-6 band them approved the other studies. There was no correlation found among the special patterns, resistance to antituberculosis agents, residance, migration, and Iranian patients. The results are the same as what is reported in the literature.

Conclusion. The data show the DRE-PCR method is the simplest and the fastest way to achieve molecular typing of MT in Iran.

Keywords: Mycobacterium tuberculosis; PCR; DRE-PCR

* Corresponding author. Fax: 0231-31551; Tel: 0231-32082

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]