مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی سمنان- جلد ۱۱، شماره ۱ (پیاپی ۳۳)، پائیز ۱۳۸۸

استفاده از سه روش مولکولی متفاوت در شناسایی الگوی ژنتیکی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس ژنوتایپ بیجینگ

الهه تاج‌الدین [۱*] (M.Sc) ، پریسا فرنیا [۲] (Ph.D)، محمد کارگر [۱] (Ph.D)، جمیله نوروزی [۳] (Ph.D)، مجتبی احمدی [۲] (B.Sc)، مهدی کاظم‌پور دیزچی [۲] (M.Sc)، محمدرضا مسجدی [۴] (M.D)، علی‌اکبر ولایتی [۴] (M.D)

۱- *دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم*

۲- *مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی، پژوهشکده سل و بیماریهای ریوی، دارآباد، تهران*

۳- *دانشگاه علوم پزشکی ایران*

۴- *دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی، مرکز تحقیقات سل و بیماری‌های ریوی*

چکیده

سابقه و هدف: سویه بیجینگ بیش از ۱/۴ مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در سرتاسر جهان را تشکیل می‌دهد. این سویه ویژگی‌های مهمی از جمله داشتن ارتباط با مقاومت چند دارویی دارا می‌باشد. هدف از این مطالعه شناسایی الگوی ژنتیکی سویه‌های بیجینگ (Beijing) با استفاده از روش‌های اسپولیگوتایپینگ، تایپینگ variable number tandem repeat (VNTR) و RFLP-IS6110 می‌باشد.

مواد و روش‌ها: سویه کشت مثبت ۲۳۸ مسلول ریوی (سال ۱۳۸۷-۱۳۸۶) با استفاده از روش اسپولیگوتایپینگ تعیین شد. سپس سویه‌های بیجینگ جدا شده به روش RFLP و VNTR مورد بررسی قرار گرفتند. آنالیز داده‌های RFLP با استفاده از نرم‌افزار Gel campair صورت گرفت و داده‌های اسپولیگوتایپینگ پس از مقایسه با اطلاعات موجود در بانک جهانی اسپولیگوتایپینگ (SPOLDB4) آنالیز شدند. با روش VNTR تنوع آللی ۹ لوکوس (QUB3232، QUB 11b، ETR-F، ETR-E، ETR-D، ETR-C، ETR-B، ETR-A، MPTR-A) در سویه‌های بیجینگ بررسی شد. با استفاده از آزمون Hunter Gaston Index (HGI) تنوع اللی هر یک از لوکوس‌ها در سویه‌های بیجینگ محاسبه گردید.

یافته‌ها: روش اسپولیگوتایپینگ، ۸ گونه مایکو باکتریوم توبر کلوزیس (EA12, EA13, T, U, Haarlem CAS 2, CAS 1, Beijing) را شناسایی کرد. با ا ستفاده از روش VNTR typing ، لوکوس QUB 3232 به عنوان لوکوس بسیار افتراق‌دهنده (HGI ≥ 0.6) و لوکوس‌های ETR-F، ETR-E و QUB 11b به عنوان لوکوس‌های افتراق‌دهنده متوسط (HGI ≥ 0.4-0.6) و سایر لوکوس‌ها به عنوان ضعیف‌ترین لوکوس افتراق‌دهنده در سویه‌های بیجینگ ، شناسایی شدند. در روش VNTR typing، ۱۰ سویه (۷۷٪) و در روش RFLP، ۱۳سویه از ۱۳ سویه بیجینگ (۱۰۰٪) الگوی متفاوت از خود نشان دادند.

نتیجه‌گیری: تنوع در الگوی ژنتیکی نشان‌دهنده فعال شدن مجدد (reactivation) در جمعیت مورد بررسی می‌باشد. به دلیل هزینه بالا و اتلاف وقت در روش RFLP، می‌توان از روش VNTR typing همراه با اسپولیگوتایپینگ برای مطالعات اپیدمیولوژی مولکولی سل استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: اسپولیگوتایپینگ، VNTR typing، RFLP، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، ژنوتایپ بیجینگ

مقدمه

سل یکی از معضلات اصلی جهان بوده و هر سال ۳ میلیون نفر جان خود را به علت این بیماری از دست می‌دهند. تخمین زده شده است که یک سوم از جمعیت دنیا به باکتری مایکوباکتریوم توبرکلوزیس آلوده هستند [۱]. یک گروه از این سویه‌ها تحت عنوان ژنوتایپ بیجینگ شناسائی شده، که

* نویسنده مسئول، تلفن: ۲۰۱۰۹۵۰۵-۰۲۱ نمابر: ۲۰۱۰۹۵۰۵ - ۰۲۱

Email: Elahe_tajedin@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۸۸/۳/۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۶/۱۷

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

بیش‌تر از ۱/۴ موارد توبرکلوزیس در سرتاسر جهان را تشکیل می‌دهند [۲]. مایکوباکتریوم توبرکلوزیس ژنوتایپ بیجینگ برای اولین بار در بیماران TB در ناحیه بیجینگ (پکن) چین شناسائی شد. از سال ۱۹۹۵ در کشورهای آسیای شرقی ژنوتایپ بیجینگ رایج گردیده است. اخیراً اپیدمی ژنوتایپ بیجینگ در آمریکا، آفریقای جنوبی، آلمان، جزایر قناری، روسیه، تایلند و کره جنوبی گزارش شده است [۳]. سویه بیجینگ دارای ویژگی‌های پاتوژنیک مهمی از جمله ارتباط با مقاومت چند دارویی، عدم پاسخ به درمان، قدرت سریع انتشار و انتقال در جوامع و قدرت تکثیر بالا در ماکروفاژهای انسانی را دارا می‌باشد. مقاومت چند دارویی آن احتمالاً به‌علت وجود آلل‌های مستعد جهش در ژن‌های mut T می‌باشد [۴]. مقاومت چند دارویی (MDR) این سویه، که تحت عنوان سویه مقاوم به دو داروی ضد سلی مهم یعنی ایزونیازید و ریفامپین نامیده می‌شود، یک تهدید جدی برای کنترل سل می‌باشد [۵]. امروزه برای تشخیص و شناسایی سریع سویه بیجینگ از روش‌های تایپینگ مولکولی بهره‌گیری می‌شود. این روش‌ها به چند دسته تقسیم می‌شوند:

۱- روش‌هایی که پروفایل انگشت‌نگاری تولید می‌کنند مانند RFLP - IS6110 [۲].

۲- روش‌هایی که اساس آن PCR می‌باشند مانند اسپولیگوتایپینگ و variable number tandem repeat (VNTR) typing [۱،۲].

۳- مالتیپلکس PCR [۶].

استفاده از این روش‌ها این امکان را به ما می‌دهد که انتقال اخیر و فعال شدن مجدد (Reactivation) در بیماران مبتلا از هم متمایز کنیم. بطور کلی بازفعالی به دو دلیل عدم درمان مناسب و یا عفونت مجدد (عفونت با سویه دیگری از مایکوباکتریوم) ممکن است رخ داده باشد [۷]. در این مطالعه برای بررسی فاکتورهای دخیل در انتقال سویه‌های بیجینگ و شناسایی اپیدمیولوژی مولکولی این سویه، از روش‌های اسپولیگوتایپینگ، تایپینگ VNTR و RFLP-IS6110 استفاده شد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه توصیفی– تحلیلی، ۲۳۸ بیمار مسلول مراجعه‌کننده به مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی (پژوهشکده سل و بیماری‌های ریوی، دارآباد ، تهران) بین سال ۸۷-۸۶ مورد بررسی قرار گرفتند. جداسازی اولیه سویه‌های مایکوباکتریوم با روش پتروف ۴٪ و با استفاده از محیط Lowenstein Jensen (LJ) انجام شد و جهت شناسایی سویه‌ها از تست‌های بیوشیمیایی از قبیل، تست‌های نیاسین، فعالیت کاتالاز، احیاء نیترات استفاده شد. حساسیت دارویی در برابر ایزونیازید (0.2µg/ml)، ریفامپین (40µg/ml)، استرپتومایسین (10µg/m) و اتامبوتول (2µg/ml) به روش تناسبی صورت گرفت و سویه‌ها به سه گروه حساس (حساس به داروهای فوق)، MDR (مقاومت دو دارویی ایزونیازید و ریفامپین) و غیرMDR (مقاومت تک دارویی یا دو دارویی غیر از ایزونیازید و ریفامپین) تقسیم‌بندی شدند [۸].

DNA از کلنی‌های مثبت با روش N- استیل N، N، N- تری‌متیل آمونیوم بروماید استخراج گردید [۹]. مایکوباکتریوم توبرکلوزیس ژنوتایپ بیجینگ با روش اسپولیگوتایپینگ جداسازی گردید. سپس با انجام روش‌های تایپینگ VNTR و RFLP-IS6110 الگوهای ژنتیکی این ژنوتایپ بررسی گردید.

اسپولیگوتایپینگ. قطعات DR مورد نظر را با روش PCR و با استفاده از دو پرایمر DRa:5'- GGT TTT GGG TCT GAC GAC- 3' وDRb:5'- CCG AGA GGG GAC GGA AAC - 3 ' که انتهای '۵ پرایمر DRa با بیوتین نشان‌دار شده است، تکثیر یافتند. محصول PCR را در دمای ۹۹ ºC دناتوره کرده و بعد از انتقال بر روی غشای نیتروسلولز هیبریداسیون Line Reverse Blot انجام شد. سپس جهت ردیابی سیگنال‌های هیبرید شده مقداری ماده کمی لومینسانس (ECL)اضافه شد و غشا ی نیتروسلولزی را جهت ظهور بر روی فیلم حساس رادیوگرافی قرار گرفت. پس از ظهور فیلم نقاط سیاه نشان‌دهنده حضور نواحی فاصله انداز می‌باشد [۱۰]. توالی فاصله انداز می‌تواند به صورت یک کد مثبت یا

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

منفی بیان شود، بدین صورت که نتیجه مثبت، حضور توالی فاصله‌انداز و نتیجه منفی فقدان توالی فاصله‌انداز را نشان می‌دهد (شکل ۱). بدین ترتیب طرح الگوی هر سویه به صورت یکOCTAL CODE در آورده شد و با اطلاعات موجود در بانک جهانی اسپولیگوتایپینگ (SPOLDB4) مقایسه شد و سویه‌های آن‌ها مشخص گردید [۱۲،۱۱].

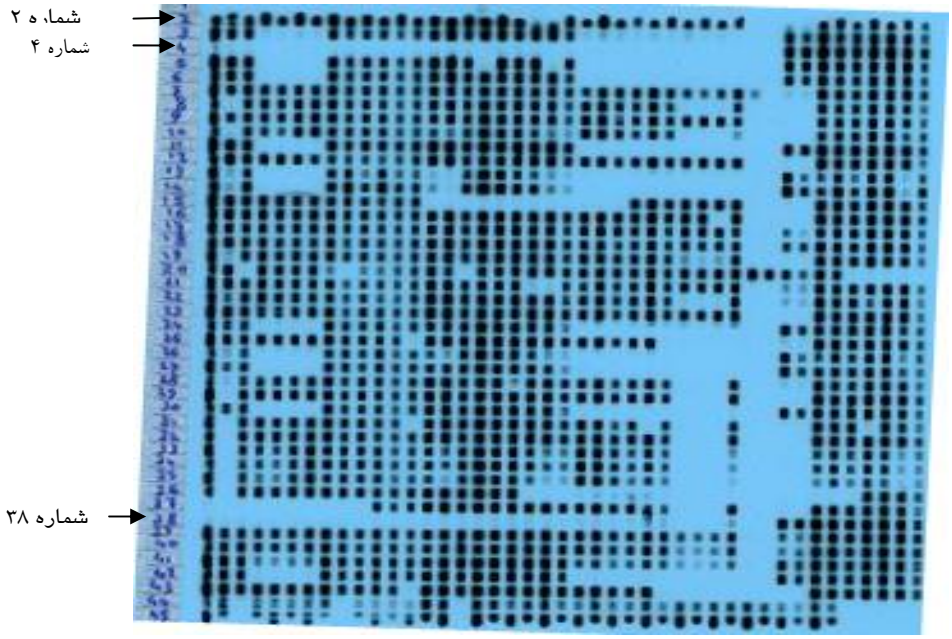
تایپینگ VNTR . برای انجام PCR از پرایمرهای مربوطه استفاده شد (جدول۱). سیکل PCR مورد استفاده برای همه لوکوس‌ها به‌صورت زیر بوده مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴ ºC و سپس ۳۰ سیکل شامل: ۹۴ ºC به مدت ۳۰ ثانیه و ۵۳ ºC– ۶۵ به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ ºC به مدت ۱۰ دقیقه. محصولات PCR بدست آمده را روی ژل ۱–۲٪ الکتروفورز شدند. تعداد دقیق توالی تکرارشونده پشت سرهم برای هر سویه به وسیله اندازه محصول PCR بر روی ژل تعیین شد و با استفاده از پروتوکل استاندارد آنالیز گردید [۱۳].

آزمون Hunter Gaston Index (HGI) برای تنوع اللی هر یک از پرایمرها در سویه‌های بیجینگ استفاده گردید.

$$D = 1 - \left[\frac{1}{N(N-1)}\sum_{j=1}^{s} nj,(nj-1)\right]$$

در این فرمول D شاخص عددی افتراق، N مجموع سویه‌های موجود در روش تایپینگ مورد استفاده، S تعداد کل متفاوت سویه‌ها و nj تعداد سویه‌های متعلق به تیپ j می‌باشد [۲]. در این بررسی، فرمول با استفاده از نرم‌افزار Direct Stats محاسبه گردید.

RFLP-IS6110. DNA استخراج شده به وسیله آنزیم برش دهنده PVUII قطعه IS6110 را می‌شکند (5'...GAC/GTC... 3' و 5'...CAG/CTG...3') و هضم شد. سپس قطعات تولید شده بر روی ژل آگارز از یکدیگر جدا شدند برای مشاهده قطعات حاوی IS6110، پروب نشان‌دار شده با پراکسید از حاوی DNA مکمل توالی IS6110 به بافر هیبریداسیون اضافه شد و بر روی غشاء نیتروسلولزی ریخته شد. قطعات تولید شده توسط آنزیم PVUII که با پروب IS6110 هیبرید شدند، به‌وسیله واکنش کمی لومینسانس مشخص شدند و الگوی RFLP به وسیله فیلم حساس به نور ردیابی شد آنالیز آن با استفاده از نرم‌افزار Gel campair انجام شد [۱۴].



شکل۱. سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس جدا شده با روش اسپولیگوتایپینگH37Rv . شماره۲)سویه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس . H37Rv شماره(۳۸و۴) سویه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بیجینگ

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

جدول۱ .توالی پرایمرهای مورد استفاده در تایپینگVNTR

Locus name	Sequence of primers(5-3)	No. and size of Repeat units in H37Rv (bp)*	Size of PCR Products in H37Rv (bp)
MPTR-A	GGTTACCACTTCGATGCGTCTGCC AGCCGCCGAAACCCATC	(16×15)	۳۴۳
ETR-A	AAATCGGTCCCATCACCTTCTTAT CGAAGCTGGGGTCGCCCGCGATTT	(3×75)+23	۴۲۰
ETR-B	GCGAACACCAGGACAGCATCATG GGCATGCCGGTGATCGAGTGG	(3×57)+8	۲۹۲
ETR-C	GTGATGCGCTGCAGAACCTGCAG GGCGTCTTGACCTCCACGAGCT	(4×58)-21	۲۷۶
ETR-D	CAGGTCACAACGAGAGGAAGAGC GCGGATCGGCCAGCGACTCCTC	(3×77)+7	۳۱۰
ETR-E	CTTCGGCGTCGAAGAGAGCCTC CGGAACGCTGGTCACCACCTAAG	(3×53)-1	۲۲۴
ETR-F	CTCGGTGATGGTCCGGCCGGTCAC GGAAGTGCTCGACAACGCCATGCC	(3×79)-13	۴۷۶
QUB11b	CGTAAGGGGGATGCGGGAAATAGG CGAAGTGATGGTGGCAT	(69×5)+9	۴۱۱
QUB3232	CAGACCCGGCGTCATCAAC CCAAGGGCGGCATTGTGTT	(56×3)+50	۵۹۰

نتایج

وضعیت بیماران: از ۲۳۸ بیمار مبتلا به سل ریوی، ۱۷۹ نفر (۷۵٪) ملیت ایرانی ۵۹ نفر (۲۵٪) ملیت افغانی داشتند. ۱۳۲ بیمار (۵۵٪) مرد و ۱۰۵ بیمار (۴۴٪) زن بودند. دامنه سنی برای بیماران ۱۰– ۸۸ سال بود. نتایج آنتی‌بیوگرام بدین صورت بود که: ۱۸۰ بیمار حساس (دارو به ۷۵/۶٪)، ۲۸ بیمار MDR (۱۱/۸٪) و ۳۰ بیمار غیر MDR (۱۲/۶٪) بودند (جدول۲).

جدول۲. نتایج آنتی بیوگرام ۲۳۸ بیمارمبتلا به سل ریوی

نتایج آنتی بیوگرام		تعداد	درصد
MDR		28	11.9%
حساس		180	75.6%
مقاوم به اتامبوتول	MDR غیر	5	2.1%
مقاوم به ریفامپین		2	.84%
مقاوم به استرپتومایسین		3	1.3%
مقاوم به ایزونیازید		9	3.8%
مقاوم به پیرازینامید		7	3.0%
مقاوم به پیرازینامید و ریفامپین		1	.4 %
مقاوم به استرپتومایسین و اتامبوتول		1	.4 %
مقاوم به ریفامپین و اتامبوتول		1	.4 %
مقاوم به استرپتومایسین و ایزونیازید		1	.4 %

تایپینگ مولکولی سوش‌های جداشده با استفاده از اسپولیگوتایپینگ: در این بیماران با روش اسپولیگوتایپینگ ۸ گونه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس شناسایی شدند که شامل: Haarlem(27.7%) CAS1 (25.2%) EAI3 (21.8%) CAS 2 (6.7%) T1(6.3%) Beijing (5.5%)، (1.2%) EAI2 (5%)U، (0.4) T2 می‌باشند (شکل۱). تست‌های آماری (Chi-Square و Fisher-Exact test) نشان دادند که مقاومت آنتی‌بیوتیکی بین همه سویه‌های جدا شده به روش اسپولیگوتایپینگ تفاوت آماری معنی‌داری داشت (p≤۰,۰۵) (جدول ۳).

تایپینگ مولکولی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس ژنوتایپ بیجینگ با استفاده از تایپینگ VNTR: از کل نمونه‌های با ژنوتایپ بیجینگ ۷۷٪ دارای الگوی تایپینگ VNTR کامل و ۲۳٪ الگوی VNTR typing ناقص داشتند (الگوی ناقص بدین معنی است که در بعضی از لوکوس‌های مورد نظر، محصول PCR به‌دست نیامده است). فراوان‌ترین پروفایل عددی برای لوکوس‌های MPTR-A، ETR-A، ETR-B، ETR-C، ETR-D، ETR-E، ETR-F، QUB11b و QUB3232 در سویه‌های بیجینگ به ترتیب: ۶۴۲۴۳۵۳۶۹ (۲۳٪) می‌باشد (جدول۴).

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

جدول ۳. الگوی مقاومت دارویی در سویه های جدا شده

نتایج آنتی بیوتیکی								
سویه های جدا شده	MDR		حساس		Non MDR		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	۱۳	٪۷/۲	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

*x^2 =۳/۳۱ d.f=۱۸ p-value=./.۳۴

جدول ۴. نتایج مربوط به پروفایل های عددی ۹ لوکوس VNTR در سویه های بیجینگ

VNTR	QUB3232	QUB11b	ETR-F	ETR-E	ETR-D	ETR-C	ETR-B	ETR-A	MPTR-A
۶۳۲۴۰۵۰۰۳	۳	۰	۰	۵	۰	۴	۲	۳	۶
۶۴۱۴۳۴۳۶۹	۹	۶	۳	۴	۳	۴	۱	۴	۶
۶۴۲۴۳۳۳۶۹	۹	۶	۳	۳	۳	۴	۲	۴	۶
۵۳۲۴۳۳۲۲۷	۷	۲	۲	۳	۳	۴	۲	۳	۵
۶۴۲۲۳۵۳۲۶	۶	۲	۳	۵	۳	۲	۲	۴	۶
۶۴۲۴۳۵۳۶۹	۹	۶	۳	۵	۳	۴	۲	۴	۶
۶۴۲۴۳۵۳۶۶	۶	۶	۳	۵	۳	۴	۲	۴	۶
۶۴۲۴۳۵۳۶۵	۵	۶	۳	۵	۳	۴	۲	۴	۶
۶۴۲۴۳۵۳۶۹	۹	۶	۳	۵	۳	۴	۲	۴	۶
۶۰۲۴۳۵۳۶۹	۹	۶	۳	۵	۳	۴	۲	۰	۶
۶۴۲۴۳۵۳۶۹	۹	۶	۳	۵	۳	۴	۲	۴	۶
۶۳۲۲۳۰۲۱۳	۳	۱	۲	۰	۳	۲	۲	۳	۶
۶۴۲۴۳۵۱۶۰	۰	۶	۱	۵	۳	۴	۲	۴	۶

بر اساس شاخص افتراق کل سویه‌ها، لوکوس QUB3232 به‌عنوان لوکوس بسیار افتراق‌دهنده (HGI ≥ 0.6) و لوکوس‌هایQUB11b ETR-F, ETR-E, به‌عنوان لوکوس‌های افتراق‌دهنده متوسط(HGI ≥ 0.4-0.6) و لوکوس , ETR-A ETR-D, MPTR-A , ETR-C ,ETR- B به‌عنوان ضعیف‌ترین لوکوس افتراق‌دهنده شناسایی شدند (HGI=0).

لوکوس QUB3232 دارای بیش‌ترین قدرت تمایز در بین ژنوتایپ بیجینگ می‌باشد (جدول۵).

تایپینگ مولکولی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس ژنوتایپ بیجینگ با استفاده از RFLP-IS6110: روش RFLP-IS6110 که پروفایل اختصاصی‌تری تولید می‌کند برای مقایسه بین نمونه‌های با ژنوتایپ بیجینگ مورد استفاده قرار گرفت. در این روش ۱۳ ژنوتایپ بیجینگ دارای الگوی انگشت‌نگاری

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

متفاوت از هم بودند و تعداد نسخه‌های IS6110 آن ۶- ۱۲ بودند.

جدول۵. :نتایج مربوط به تنوع اللی (HGI)،هریک از لوکوس هادر سویه های بیجینگ

Locuse	(HGI) Beijing	cluster
MPTR-A	۰	۲
ETR-A	۰	۲
ETR-B	۰	۲
ETR-C	۰	۲
ETR-D	۰	۱
ETR-E	./۴۴	۳
ETR-F	./۴۳	۳
QUB11b	./۴۴	۳
QUB3232	./۷۴	۵

بحث و نتیجه‌گیری

ژنوتایپ بیجینگ مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از سال ۱۹۹۵ در کشورهای آسیای شرقی رایج گردیده است. در مطالعه حاضر از بین ۲۳۸سویه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به روش اسپولیگوتایپینگ، ۱۳ سویه بیجینگ (۵/۵٪) شناسایی گردید و همچنین این ژنوتایپ بیش‌ترین مقاومت به دو آنتی‌بیوتیک ایزونیازید و ریفامپین (MDR) (۲۱/۴٪) از خود نشان دادند. در مطالعه‌ای که درودچی و همکارانش در شیراز (۱۹۹۵-۱۹۹۶) انجام دادند، ۱۰٪ سویه بیجینگ گزارش گردید [۱۵]. مطالعه اپیدمیولوژی فرنیا و همکارانش (۲۰۰۵) نشان داد، ۲۰/۵٪ از سویه‌های جدا شده در ایران از نوع بیجینگ بودند [۱۶]. در اکثر مطالعات انجام شده در ایران درصد بیش‌تری از سویه‌های بیجینگ، بیماران افغانی بودند [۱۶،۱۵]. احتمال می‌رود این امر به علت مهاجرت افراد از اتحادیه شوروی سابق به اروپا از طریق مرز افغانستان باشد که منجر به انتشار و شیوع سویه‌های بیجینگ مقاوم به دارو در افغانستان شده است [۱۷].

هم‌چنین در مطالعه ما درصد بیش‌تری (۵۴٪) از سویه‌های بیجینگ بیماران افغانی بودند. هم‌چنین در مطالعه‌ای که توسط Mokrousov (۲۰۰۳-۱۹۹۷) در روسیه انجام شد از ۳۵۴ سویه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس ۵۵٪ سویه بیجینگ به روش اسپولیگوتایپینگ جداسازی گردید [۱۸]. در مطالعه مشابه‌ای که توسط Nikolayevskyy و همکارانش (۲۰۰۶) در روسیه صورت گرفت از تعداد ۱۸۷ سویه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، ۶۹٪ سویه بیجینگ بودند [۱۹]. همان‌گونه که مشاهده می‌شود که فراوانی این ژنوتایپ در این کشور رو به افزایش بوده است. هم‌چنین در تایلند (۱۹۹۹- ۲۰۰۰) سویه‌های بیجینگ ۴۴٪ گزارش شد [۲۰]. یافته‌های فوق بیانگر این مطلب است که این سویه در تایلند و روسیه شایع و فراوان است. مطالعه Yekoyamaو همکارانش (۲۰۰۳) در ژاپن نشانگر میزان بالای شیوع سویه بیجینگ در این کشور است[۲۱]. Kam و همکارا نش در هنگ‌کنگ از ۳۵۵ سویه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، ۶۸/۵٪ سویه بیجینگ به روش اسپولیگوتایپینگ جدا کردند که پس از انجام تست‌های دارویی، ۷۰٪ سویه‌های بیجینگ را با مقاومت چند دارویی گزارش کردند [۲۲]. از آن‌جایی که هنک‌کنگ در مجاورت چین قرار گرفته احتمال انتقال این ژنوتایپ از طریق مهاجرت افراد وجود دارد.

بر اساس تحقیقات انجام شده، سه گروه اصلی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بر پایه پلی‌مرفیسم مشاهده شده در نوکلئوتیدهای katG463 و gyrA codon95 شناسایی شده است. باکتری‌های متعلق به گروه ۲و۳ قادر به هیبریداسیون با نوکلئوتیدهای فاصله‌انداز ۳۳ تا ۳۶ نیستند [۲۳]. گروه ۱ قدیمی‌ترند. احتمالا گروه ۲و۳ از ایجاد تغییرات و موتاسیون‌هایی گروه ۱ به وجود آمده اند [۲۳]. ژنوتایپ بیجینگ فاقد توالی‌های فاصله‌انداز ۱-۳۴ است و دارای توالی‌های فاصله‌انداز ۳۵-۴۳ است، یعنی حاوی تنها ۹ فاصله‌انداز آخری، از ۴۳ فاصله‌انداز را دارا می‌باشند. پس می‌توان گفت به گروه ژنتیکی ۱ تعلق دارد. یکی از لوکوس‌های مورد استفاده در روش تایپینگ VNTR،

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

QUB3232 است، اندازه محصول PCR آن ۵۹۰ جفت باز و دارای ۳ توالی تکراری پشت سر هم می‌باشد، که در این مطالعه لوکوس مورد بحث در سویه‌های بیجینگ دارای ۳، ۹، ۷، ۶، ۵ پروفایل یعنی دارای دو، سه، چهار و شش Insertion می‌باشد. بنابراین این لوکوس با HGI ≥ 0.6 به‌عنوان افتراق‌دهنده‌ترین لوکوس بین سویه‌های بیجینگ شناسایی شد. مطالعه‌ای که Kam و همکارانش (۲۰۰۶) انجام دادند، لوکوس‌های QUB11b، QUB11a و Qub3232 را افتراق‌دهنده‌ترین لوکوس‌ها بین سویه‌های بیجینگ و غیر بیجینگ گزارش کردند [۱].

در عمده مطالعات روی سویه‌های بیجینگ از لوکوس MIRU (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units) استفاده شده است در حالی‌که در مطالعه حاضر از لوکوس‌های (QUB و ETR) استفاده گردید. در مطالعه ما بیش‌ترین پروفایل عددی (۲۳٪) سویه‌های بیجینگ ۶۴۲۴۳۵۳۶۹ به‌دست آمد. در مطالعه Kiristin و همکارانش در سال ۲۰۰۱، لوکوس QUB11b را افتراق‌دهنده‌ترین لوکوس در بین سویه‌های بیجینگ معرفی کردند [۲]. در مطالعه فوق تنوع اللی سویه‌های بیجینگ از ۰ تا ۰/۶۱۸ متناوب بود [۲] در صورتی‌که در مطالعه ما تنوع اللی در سویه‌های بیجینگ از ۰ تا۰/۷۴ تناوب داشت. مطالعه‌ای که Allison و همکارانش (۱۹۹۶– ۱۹۹۸) انجام دادند ویژگی و حساسیت VNTR را ۵۶٪ و ۵۲٪ گزارش کردند [۷]. در حالی‌که در این مطالعه حساسیت VNTR (۵۸٪) بیش‌تر از اسپولیگوتایپینگ و کم‌تر از RFLP گزارش شد. در مطالعه انجام شده با استفاده از روش اسپولیگوتایپینگ سویه بیجینگ الگوی یکسانی از خود نشان دادند در حالی‌که همین سویه‌ها در روش VNTR (۲۳٪) [۳]. الگوی مشابه از خود بروز دادند. در روش RFLP هر ۱۳ (۱۰۰٪) سویه بیجینگ الگوی متفاوت IS6110 داشتند. تنوع در الگوی ژنتیکی نشان‌دهنده فعال شدن مجدد در جمعیت مورد بررسی می‌باشد.

به طور کلی، با توجه به این‌که در این بررسی حساسیت روش IS6110-RFLP بسیار بیش‌تر از روش‌های اسپولیگوتایپینگ و VNTR بود، ولی به دلیل هزینه بالا و اتلاف وقت در روش RFLP، می‌توان از روش VNTR هم‌راه با اسپولیگوتایپینگ برای مطالعات اپیدمیولوژی مولکولی سل استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همکاری مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی (پژوهشکده سل و بیماریهای ریوی، دارآباد، تهران) جهت فراهم آوری منابع مالی و همچنین از پرسنل مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی به خاطر کمک‌های آزمایشگاهی تشکر وقدردانی می‌گردد.

منابع

[1] Kam KM, Yip CW, Tse LW, Leug kl, Wong KL, Ko WM. and Wong WS. Optimization of variable number tandem repeat typing set for diferentianting Mycobacterium tuberculosis in the Beijing family. FEMS Microbiol Lett 2006; 256: 258-265.

[2] Kremer K, Au BK, Yip PC, Skuce R, Supply P, Kam KM. and van Soolingen D. Use of variable-Number Tandem –Repead typing to Differentiate Mycobacterim tuberculosis Beijing Family Isolates from Hong Kong and comparison with IS6110 Restriction Fragment Lengh Polymorphism typing and spoligotyping. J Clin Microbiol 2005; 43: 314-320.

[3] Anh DD, Borgdorff MW, Van LN, Lan NT, van Gorkom T, Kremer K. and van Soolingen D. Mycobacterium tuberculosis Beijing Genotype Emerging in Vietnam. Emerg Infect Dis 2000; 6: 302-305.

[4] Mokrousov I, Narvskaya O, Limeschenko E, Vyazovaya A, Otten T. and Vyshnevskiy B. Analysis of the allelic diversity of the mycobacterial interspersed repetitive units in Mycobacterium tuberculosis strains of the Beijing family: practical implications and evolutionary considerations. J Clin Microbiol 2004; 42: 2438-2444.

[5] Drobniewski F, Balabanova Y, Ruddy M, Weldon L, Jeltkova K, Brown T. and et al. Refampin and Multidrug-Resistant Tuberculosis in Russian Civilians and Prison Inmates: Dominance of the Beijing Strain Family. Emerg Infect Dis 2002; 8: 1320-1326.

[6] Sun JR, Lee SY, Dou HY. and Lu JJ. Using a multiplex polymerase chain reaction for the identification of Beijing strains of Mycobacterium tuberculosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2009; 28: 105-107.

[7] Scott AN, Menzies D, Tannenbaum TN, Thibert L, Kozak R, Joseph L. and et al. Sensitivities and specificities of spoligotyping and mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing methods for studying molecular epidemiology of tuberculosis. J Clin Microbiol 2005; 43: 89-94.

[8] Ramazanzadeh R, Amirmozafari N, Farnia P. and Ghazi F. Genotyping of Mycobacterium tuberculosis isolate from TB patients with spoligotyping. J Kurdistan Uni Med Sci. 2006; 11: 50-59. (Persion)

[9] Amaro A, Duarte E, Amado A, Ferronha H. and Botelho A. Comparison of three DNA extraction methods for Mycobacterium bovis, Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium avium subsp. avium. Lett Appl Microbiol 2008; 47: 8-11.

[10] Farnia P, Mohammadi F, Masjedi MR, Varnerot A, Zarifi AZ, Tabatabee J. and et al. Evaluation of tuberculosis transmission in Tehran; using RFLP and spoligotyping. J Infect 2004; 49: 94-101.

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

[11] Dale JW, Brittain D, Cataldi AA, Cousins D, Crawford JT, Driscoll J. and et al. Spacer oligonucleotide typing of bacteria of the Mycobacterium tuberculosis complex: recommendations for standardised nomenclature. Int J Tuberc Lung Dis 2001; 5: 216-219.

[12] Van Soolingen D. Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. J Inter Med 2001; 249: 1-26.

[13] Frothingham R, Meeker O. and Connell W. Genetic diversity in the Mycobacterium tuberculosis complex based on variable number of tandem DNA Repeats. Microbiology 1998; 144: 1189-1196.

[14] Narayanan S. Molecular epidemiology of tuberculosis. Indian J Med Res 2004; 120: 233-247.

[15] Doroutchi M, Kremer K, Basiri EA, Kadivar MR, Van Soolingen D. and Ghaderi AA. IS6110-RFLP and spoligotyping of mycobacterium tuberculosis isolate in Iran. Scand Infect Dis 2002; 32: 663-668.

[16] Farnia P, Masjedi MR, Mirsaeidi M, Mohammadi F, Jallaledin-Ghanavi, Vincent V. and et al. Prevalence of Haarlem I and Beijing types of Mycobacterium tuberculosis strains in Iranian and Afghan MDR-TB patients. J Infect 2006; 53: 331-336.

[17] European Concerted Action on New Generation Genetic Markers and Techniques for the Epidemiology and Control of Tuberculosis. Beijing/W genotype Mycobacterium tuberculosis and drug resistance. Emerg Infect Dis 2006; 12: 736-743.

[18] Mokrousov I, Narvskaya O, Limeschenko E, Vyazovaya A, Otten T. and Vyshnevskiy B. Analysis of the Allelic Diversity of the Mycobacterial Interspersed Repetitive Units in Mycobacterium tuberculosis Strains of the Beijing Family: Practical Implications and Evolutionary Considerations. J Clin Microbiol 2004; 42: 2438-2444.

[19] Nikolayevskyy V, Gopaul K, Balabanova Y, Brown T, Fedorin I. and Drobniewski F. Differentiation of tuberculosis strains in a population with mainly Beijing-family strains. Emerg Infect Dis 2006; 12: 1406-1413.

[20] Prodinger WM, Bunyaratvej P, Prachaktam R, and Pavlic M. Mycobacterium tuberculosis Isolates of Beijing Genotype in Thailand. Emerg Infect Dis 2001; 7: 483-484.

[21] Yokoyama E, Kishida K. and Ichinohe S. Improved molecular epidemiological analysis of Mycobacterium tuberculosis strains using multi-locus variable number of tandem repeats typing. Jpn J Infect Dis 2007; 60: 235-236.

[22] Kam KM, Yip CW, Tse LW, Wong KL, Lam TK, Kremer K. and et al. Utility of Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit Typing for Differentiating Multidrug-Resistant Mycobacterium tuberculosis Isolates of the Beijing Family. J Clin Microbiol 2005; 43: 306-313.

[23] Gutierrez MC, Ahmed N, Willery E, Narayanan S, Hasnain SE, Chauhan DS. and et al. Predominance of Ancestral Lineages of Mycobacterium tuberculosis in India. Emerg Infect Dis 2006; 12: 1367-1374.

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

Identification of mycobacterium tuberculosis beijing genotype using three different molecular methods

Elahe Tajeddin (M.Sc)[*1], Parissa Farnia (Ph.D)[2], Mohammad Kargar (Ph.D)[1], Jamileh Noroozi (Ph.D)[3], Mojtaba Ahmadi (B.Sc)[2], Mehdi Kazempour (M.Sc)[2], Mohammadreza Masjedi (M.D)[4], Aliakbar Velayati (M.D)[4]

1 - Jahrom Azad University of Medical Sciences, Jahrom, Iran

2 - Mycobacteriology Research Center (MRC), National Research Institute Of Tuberculosis and Lung Disease (NRITLD), Shahid Beheshti University Medical Campus, Tehran, Iran

3 - Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

4 - The Research Center of TB and Lung Diseases, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received: 27 May 2009 Accepted: 8 Sep 2009)

Introduction: Beijing strains constitute more than 1/4 of Mycobacterium tuberculosis (MT) genotypes. Beijing genotype is considered an important genotype because of its reasonable characteristics such as association with multi-drugs resistance TB. The aim of this study was to identify the genetic pattern of MT Beijing genotype using spoligotyping, variable number tandem repeat (VNTR) typing and RFLP-IS6110 methods.

Materials ands Methods: 238 MT culture positive specimens (2007-2008) were genotyped by spoligotyping. Thereafter, the isolated Beijing genotype was subjected to VNTR typing and RFLP analysis. The results of Spoligotyping were analyzed using SPOLDB4 database. VNTR typing was used to identify alleles diversity in 9 locus (MPTR-A, ETR-A, ETR-B, ETR-C, ETR-D, ETR-E, ETR-F, QUB11B, QUB3232) of the isolated Beijing strains. The allelic diversity of VNTR was measured using Hunter Gaston Index (HGI).

Results: The spoligotyping of MT isolates revealed the following 8 patterns: Haarlem (27.7%), CAS1 (25.2%), EAI3 (21.8%), CAS2 (6.7%), T1 (6.3%), Beijing (5.5%), U (5%), T (0.4), EAI2 (1.2%). By VNTR typing, the QUB3232 locus was identified as the most distinctive (HGI≥0.6); ETR-F, ETR-E and QUB11b loci; as median distinctive loci (HGI≥0.4-0.6) and other loci as the weakest distinctive locus for Beijing families.The Beijing strains demonstrated diverse patterns in RFLP, 13/13(100%) and VNTR 10/13(77%).

Conclusion: The ariety of genetic patterns revealed the reactivation in the studied population. As RFLP method is a time consuming and costly effective method, VNTR and spoligotyping method can be used as alternative methods for molecular epidemiology of MT.

Keywords: Spoligotyping, VNTR typing, RFLP, Mycobacterium tuberculosis, Beijing genotype

* Corresponding author. Fax: +98 21 20109505; Tel: +98 21 20109505
Elahe_tajedin@yahoo.com

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