

## بررسی تفرق ژنوتیپی سویه های مقاوم به اتامبوتول در ساب تایپ های مختلف مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با استفاده از Allele-Specific PCR و Spoligotyping

زهرا درخشانی نژاد<sup>۱\*</sup>، فاطمه مریم شیخ الاسلامی<sup>۲</sup>، پریسا فرنیا<sup>۲</sup>، زهرا دیلمی خیابانی<sup>۳</sup>، رشید رمضان زاده<sup>۴</sup>، مهدی کاظم پور<sup>۲</sup>، محمدرضا مسجدی<sup>۵</sup>، علی اکبر ولایتی<sup>۶</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی کارشناس ارشد، گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران. <sup>۲</sup> مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی، پژوهشکده سل و بیماری های ریوی، مرکز آموزشی، پژوهشی و درمانی سل و بیماری های ریوی دکتر مسیح دانشوری، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران. <sup>۳</sup> گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، زنجان، ایران. <sup>۴</sup> مرکز تحقیقات سلولی-مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران. <sup>۵</sup> مرکز تحقیقات بیماری های مزمن تنفسی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران. <sup>۶</sup> مرکز تحقیقات سل بالینی و اپیدمیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

\* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۲۱ ۲۷۱۲۲۲۵۹ فاکس: ۰۲۱ ۲۶۱۰۹۵۰۵ آدرس: E-mail: sh\_derakhshani@yahoo.com

### چکیده

**زمینه و هدف:** اتامبوتول یکی از ۴ داروی اصلی در درمان بیماری سل محسوب می گردد. شایع ترین موتاسیون مرتبط با این دارو معمولا در ژن embB کدون ۳۰۶ رخ می دهد. هدف از این مطالعه، تعیین مقاومت به اتامبوتول با استفاده از روش Allele-Specific PCR و Spoligotyping در سویه های مختلف مایکوباکتریوم توبرکلوزیس است.

**روش کار:** ۱۴۰ نمونه خلط از بیماران مشکوک به سل ریوی جمع آوری و با استفاده از روش پتروف، هضم و آلودگی زدایی گردید. سپس حساسیت دارویی به روش تناسبی و استخراج DNA روی ۱۰۶ مورد کشت مثبت به دست آمده انجام گردید. DNA های استخراج شده برای ارزیابی جهش در ژن embB کدون ۳۰۶ با استفاده از روش Allele-Specific PCR مورد بررسی قرار گرفتند. برای تعیین ساب تایپ ها از روش اسپولیگوتایپینگ استفاده شد.

**یافته ها:** از ۱۰۶ نمونه کشت مثبت، ۳۶ نمونه (۳۳/۹٪) توسط روش تناسبی مقاوم به اتامبوتول بودند. با استفاده از روش Allele-Specific PCR ۹۳ سویه حساس و ۱۳ سویه (۲۷/۶٪) مقاوم به اتامبوتول بودند که مقاومت دارویی این سویه ها، با روش تناسبی هم خوانی، حساسیت ۹۷ درصدی داشت. همچنین مشخص شد که موتاسیون در باز اول ۶۱/۵٪ و در باز سوم ۳۸/۵٪ بوده است. براساس روش اسپولیگوتایپینگ نمونه های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس شناسایی شد. از میان آنها ۳ خانواده Haarlem، CAS و T بیشترین درصد موتاسیون در ژن embB را به خود اختصاص دادند.

**نتیجه گیری:** برطبق نتایج به دست آمده، آن دسته از سویه هایی را که نتوانستیم با روش Allele-Specific PCR شناسایی کنیم می توان فرض کرد که یا موتاسیون در ژن های دیگری بجز embB رخ داده و یا مکانیسمی به غیر از موتاسیون باعث ایجاد مقاومت شده که باید مورد بررسی قرار گیرند.

**کلمات کلیدی:** مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، اتامبوتول، Allele-Specific PCR، Spoligotyping، embB306

پذیرش: ۹۰/۱۲/۱۶

دریافت: ۹۰/۵/۱۹

لطفاً به این مقاله به شکل زیر ارجاع دهید:

Derakhshani Nezhad Z, Sheikolslami FM, Farnia P, Deilami Khiabani Z, Ramazanzadeh R, Kazempoor M, Masjedi MR, Velayati AA. Identification and Genetic Diversity of Etambutol Resistant Strains of Mycobacterium Tuberculosis by Allelic-Specific PCR and Spoligotyping. J Ardabil Univ Med Sci. 2012; 12(3): 248-255 (Full Text in Persian)

## مقدمه

اتامبوتول یکی از داروهای ارزشمند خط اول در درمان بیماری سل است که در سال ۱۹۶۰ معرفی شد و اغلب به صورت ترکیب با ایزونیاژید، ریفامپین و پیرازینامید استفاده می‌شود و به عنوان یک داروی جایگزین برای استرپتومایسین است. مقاومت به اتامبوتول با مقاومت به سایر داروهای ضد سلی همراه است، بنابراین تشخیص زود هنگام مقاومت به این دارو نه تنها باعث کاهش خطرات ناشی از مصرف دارو می‌شود بلکه باعث تغییر رژیم دارویی به سمت داروهای دیگر می‌شود [۴-۱].

فعالیت اتامبوتول بر روی باسیل سل از نوع کشنده باکتری می‌باشد، این دارو بر روی آرایینوزیل ترانسفراز اثر کرده و مانع از سنتز لیپو آرایینومانان و آرایینوگالاکتان شده که نهایتاً منجر به تجمع میکولیک اسید و مرگ سلول می‌شود. در میکوباکتریوم توبرکلوزیس اپرون emb آرایینوزیل ترانسفرازهای مختلفی را کد می‌کند که شامل سه ژن مجاور هستند (embC, embA, embB) که این ژن ها ۶۵٪ با هم شباهت دارند [۶-۴]. موتاسیون در ژن embC و embA بسیار نادر است. موتاسیون در این دو ژن، ارتباط چندانی با مقاومت به اتامبوتول ندارد، ظاهراً آرایینوزیل ترانسفرازها در این دو ژن embC و embA، در ایجاد مقاومت به اتامبوتول کمتر دخیل‌اند [۷-۱۰].

بر طبق اکثر مطالعات موتاسیون در ژن embC در کدون های ۷۳۸ و ۴۰۶ و خیلی کمتر در کدون ۴۰۶ رخ می‌دهد [۱۱]. بر اساس مطالعه انجام شده توسط Plinke و همکاران در سال ۲۰۱۰، موتاسیون در ژن embA در کدون های ۵۳۹ و ۵۷۶ و ۴۶۸ رخ داده که قبلاً در هیچ کجا دیده نشده است [۱۲]. با توجه به این که اتامبوتول یکی از داروهای مهم در درمان بیماری سل است بنابراین هدف از این مطالعه تشخیص سویه های مقاوم به داروی اتامبوتول با

استفاده از روش مولکولی Allele-Specific PCR می‌باشد.

## روش کار

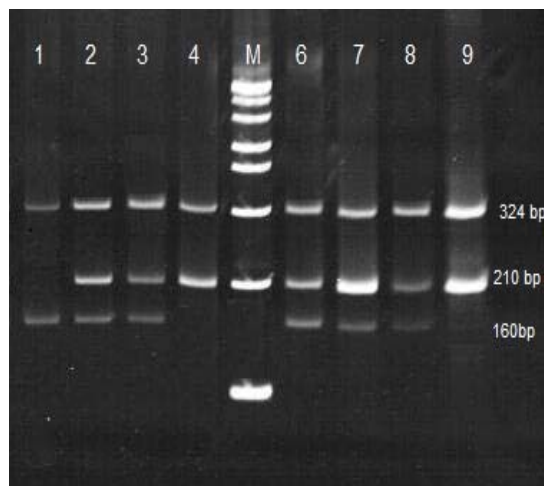
**سویه های باکتریایی و تست حساسیت:** این مطالعه از نوع توصیفی- تحلیلی بوده و در مرکز تحقیقات میکوباکتریولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، بیمارستان مسیح دانشوری تهران انجام شد. در ابتدا، ۱۴۰ نمونه خلط از بیماران مسلول با سابقه شکست درمان، مراجعه کننده به بیمارستان مسیح دانشوری طی سال‌های ۹۰-۸۹ جمع‌آوری گردید، که از میان آنها ۱۰۶ نمونه کشت مثبت جمع‌آوری و مورد بررسی قرار گرفت. باکتری های جدا شده براساس رنگ آمیزی اسید فست، شکل کلنی و تست نیاسین تعیین هویت شدند و برای تعیین حساسیت دارویی با روش تناسبی<sup>۱</sup>، رشد باکتری ها در محیط لونشتاین<sup>۲</sup> جانشون با دارو وبدون دارو تعیین گردید. محیط های کشت در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند و به صورت هفتگی مورد بررسی قرار گرفتند و در ۴ هفته و ۶ هفته بعد از کشت، نتیجه بررسی شد. معیار مقاومت، رشد ۱ درصدی برای هر چهار دارو در مقایسه با کنترل بود. غلظت داروهای خط ۱ در محیط کشت شامل: (ایزونیازید ۰/۲ μg/ml، ریفامپین ۴۰ μg/ml، اتامبوتول ۲ μg/ml، استرپتومایسین ۱۰ μg/ml) و برای داروهای خط ۲ شامل (کاپرومایسین ۱۰ μg/ml، آمیکاسین ۴ μg/ml، کانامایسین ۲۰ μg/ml، سیپروفلوکساسین ۲ μg/ml، سیکلوسرین ۳۰ μg/ml، افلوکساسین ۲ μg/ml، پارآمینوسالسیلیک ۵ μg/ml، اتیونامید ۲۰ μg/ml) بود (کلیه داروها از شرکت سیگما ۳ آمریکا تهیه شد) [۶]. نسبت تعداد باسیل‌های مقاوم به هر دارو به تعداد باسیل‌های زنده در ماده تلقیح شده، اگر از

<sup>۱</sup> Proportional Method

<sup>۲</sup> Lowenstein Jensen

<sup>۳</sup> Sigma

سه باند bp ۱۶۰، ۲۱۰، ۳۲۴ قابل مشاهده بود که سویه های حساس هر سه باند را داشتند در حالی که سویه های مقاوم به اتامبوتول دارای موتاسیون در باز اول ۲ باند bp ۲۱۰ و ۳۲۴ را داشتند و سویه های مقاوم به اتامبوتول دارای موتاسیون در باز سوم ۲ باند bp ۱۶۰ و ۳۲۴ را ایجاد کردند [۱۴] (شکل ۱).



شکل ۱. تصویر Allele-Specific PCR در نمونه های مقاوم به اتامبوتول. ستون ۵ مارکر مولکولی bp ۱۰۰، ستون های ۸ و ۳، ۷ فاقد موتاسیون در ژن embB، ستون ۶ سوش استاندارد H37RV، ستون های ۹ و ۴ دارای موتاسیون در باز اول، ستون ۱ دارای موتاسیون در باز سوم.

#### Spoligotyping

این روش برای تمایز گونه های مایکوباکتریوم کمپلکس استفاده می شود و همین طور سویه های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس را در نمونه های کلینیکی ردیابی و تیپ بندی می کند [۱۵]. قطعات DR<sup>۴</sup> مورد نظر با روش PCR و با استفاده از دو پرایمر 3'GGTTTTGGGTCTGACGAC 5' DRa و 3'CCGAGAGGGGACGGAAAC 5' DRb که با بیوتین نشان دار شده است، تکثیر یافتند [۱۷]. محصول PCR را در دمای ۹۹ درجه سانتی گراد دنانوره کرده سپس محصولات PCR بر روی غشاء نایلونی آماده Spoligotyping که الیگنوکلئوتیدهای نواحی فاصله انداز بر روی آن ثابت شده اند، توسط

حدی که نسبت بحرانی برای مقاومت نامیده می شود کمتر بود، باسیل نسبت به آن دارو حساس و اگر معادل آن حد و یا بیش تر بود سویه مقاوم تلقی می گردید. استخراج DNA از نمونه ها با روش N-استیل -N, N, N تری متیل آمونیوم بروماید (CTAB) انجام گردید [۱۷].

Allele-Specific PCR: این روش با استفاده از ۴ پرایمر emb306A, emb2R, emb1F, و emb306 برای شناسایی موتاسیون در باز اول و سوم انجام گردید توالی این پرایمرها که در مطالعات قبلی طراحی شده اند [۱۴] به شرح زیر است:

3'- GGGCGGGCTCAATTGCC -5' Emb1F  
3'- GCGCATCCACAGACTGGCGTC -5' Emb2R  
3'- GACGACGGCTACATCCTGGGCA -5' Emb306A  
3'- GGTCGGCGACTCGGGC -5' Emb306B

DNA استخراج شده به مقدار ۵ μl به مخلوط PCR (حجم نهایی ۲۵ μl) اضافه شد که دارای ۰.۳۲ pmol از پرایمر emb1F، ۰.۱۶ pmol از پرایمر emb2R، ۰.۱۲ pmol از emb306A، ۰.۴ pmol از پرایمر Taq، ۱.۵ mM MgCl<sub>2</sub>، ۴ U از آنزیم Taq، ۰/۴ mM dNTP، (شرکت کیاژن<sup>۱</sup> آلمان)، ۱۰ mM از Buffer X و ۱٪ از DMSO بود.

واکنش در ترمال سایکلر (استک<sup>۲</sup> ژاپن) به صورت: سیکل اول ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه جهت دناتوراسیون اولیه که توسط ۳۵ سیکل شامل ۹۴ درجه سانتی گراد سی ثانیه، ۶۵ درجه سانتی گراد چهل ثانیه و ۹۵ درجه سانتی گراد هفتاد و دو ثانیه ادامه یافته و سیکل آخر به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد جهت طویل سازی نهایی انجام گردید. در نهایت قطعات تکثیر یافته در ژل آکریل آمید ۸٪ الکتروفورز گردید و تعداد و اندازه قطعات به دست آمده از مقایسه با مارکر مولکولی (شرکت فرمنتاز<sup>۳</sup> آلمان) ۱۰۰ bp تعیین گردید. در این روش

<sup>۱</sup> Qiagen

<sup>۲</sup> Astec

<sup>۳</sup> Fermentas

<sup>۴</sup> Direct Repeat

Met→) می‌شود. تمام سویه‌های حساس به اتامبوتول ۳ باند ۱۶۰، ۲۱۰bp، ۳۲۴ را داشتند. کل نمونه‌ها بر طبق Spoligotyping شامل خانواده‌های (Beijing ۱۰؛ ۹/۴٪)، (Bovis ۲؛ ۱/۸٪)، (CAS ۲۴؛ ۰/۹٪)، (EAI ۱؛ ۲۵/۴٪)، (MANU ۵؛ ۴/۷٪)، (Haarlem ۵؛ ۴/۷٪)، (T ۲۷؛ ۲۵/۴٪) و (U ۲؛ ۱/۸٪) بودند که از میان این خانواده‌ها ۳ خانواده Haarlem و CAS بیشترین درصد موتاسیون در ژن embB را به خود اختصاص دادند.

بر طبق روش تناسبی ۳۶ سویه (۳۳/۹٪) و بر اساس روش Allele-Specific ۱۳ سویه (۲۷/۶٪) مقاوم به اتامبوتول یافت شدند. از ۱۳ نمونه‌ای که با روش Allele-Specific مقاوم یافت شدند ۱۱ مورد با روش تناسبی هم خوانی داشتند. می‌توان فرض کرد که احتمالاً یکی از دلایل تفاوت در نتایج حاصل از روش آنتی بیوگرام با روش مولکولی وقوع موتاسیون در ژن‌های دیگری بجز emb است و یا مکانیسمی به غیر از موتاسیون باعث ایجاد مقاومت شده است.

در این مطالعه ۷۰ نفر (۶۶٪) ملیت ایرانی و ۲ نفر (۱۱٪) ملیت افغانی، ۲ نفر (۰/۱٪) ملیت آذربایجانی، ۲ نفر (۰/۱٪) ملیت عراقی، ۲۰ نفر (۱۸٪) نیز ملیت غیر ایرانی (نا معلوم) داشتند.

مطابق با نتایج بدست آمده و استفاده از آزمون مربع کای، مقایسه بین روش Allele-Specific و روش تناسبی انجام شد. بین داده‌ها در روش Allele-Specific و روش تناسبی ارتباط معنی‌داری دیده شد ( $p < 0/05$ ). هم‌چنین بر اساس نتایج، حساسیت روش Allele-Specific ۳۱/۴٪ و اختصاصیت این روش ۹۷/۱٪ گزارش گردید.

جدول ۱. نتیجه مقاومت دارویی اتامبوتول با روش Allele-Specific

| PCR                      |       |
|--------------------------|-------|
| درصد موارد حساس به دارو  | ۷۲/۴٪ |
| درصد موارد مقاوم به دارو | ۲۷/۶٪ |

دستگاه مینی بلاتر منتقل می‌شوند سپس با استفاده از دستگاه هیبریدایزر در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد همراه با محلول استرپتاویدین-پروکسیداز کونژوگه هیبریداسیون انجام گرفته و DNA هیبرید شده با استفاده از مایع تشخیص القاء کننده لومینسانس (ECL) بر روی فیلم‌های اشعه X طی یک شبانه روز مجاورت ظاهر می‌گردد، پس از ظهور فیلم نقاط سیاه نشان دهنده حضور نواحی فاصله انداز بود [۱۶-۱۸]. توالی فاصله انداز می‌تواند به صورت یک کد منفی یا مثبت بیان شود، به این صورت که نتیجه مثبت حضور توالی فاصله انداز و نتیجه منفی فقدان توالی فاصله انداز را نشان می‌دهد، طرح الگوی هر سویه را با اطلاعات موجود در بانک جهانی اسپولیگوتایپینگ (SpolDB4) مقایسه کرده و سویه‌های آن مشخص گردید [۱۹،۲۰].

برای مقایسه داده‌ها و بررسی معنی‌دار بودن نتایج از نظر آماری، از آزمون مربع کای استفاده گردید و مقدار  $p < 0/05$  از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد. برای تجزیه و تحلیل اطلاعات نیز از نرم افزار آماری SPSS استفاده گردید.

## یافته‌ها

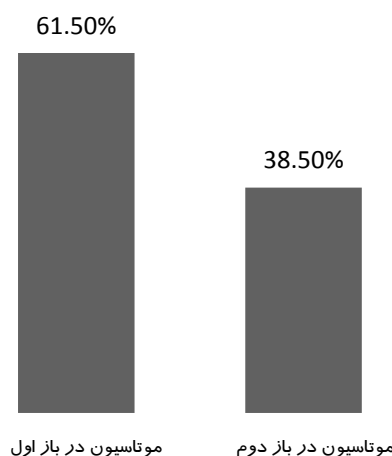
از کل تعداد نمونه‌ها بر طبق روش تناسبی، ۳۶ (۳۳/۹٪) نمونه مقاوم و ۷۰ نمونه حساس به اتامبوتول بودند که از این تعداد ۲۹ نمونه جزو دسته MDR، ۲ مورد مقاومت تک دارویی و ۴ مورد مقاومت دو دارویی داشتیم. با استفاده از روش Allele-Specific ۹۳ سویه حساس و ۱۳ سویه (۲۷/۶٪) مقاوم به داروی اتامبوتول بودند (جدول ۱). بر اساس این روش، ۸ سویه (۶۱/۵٪) موتاسیون در باز اول و ۵ سویه (۳۸/۵٪) موتاسیون در باز سوم را نشان دادند (نمودار ۱).

موتاسیون در باز اول باعث تبدیل متیونین به والین یا لوسین می‌شود (Leu یا Met→val) و موتاسیون در باز سوم باعث تبدیل متیونین به ایزولوسین (Ile

در تحقیقی که توسط ماکروسو<sup>۱</sup> و همکارانش در سال ۲۰۰۲ در روسیه انجام گرفت، موتاسیون در ژن embB کدون ۳۰۶ مورد بررسی قرار گرفت. این تحقیق بر روی ۳۴ نمونه انجام گرفت، که از کل تعداد نمونه‌ها ۱۰ نمونه حساس، و ۲۴ نمونه با روش Allele-Specific مقاوم گزارش شدند [۱۴]. در مطالعه حاضر از ۱۰۶ نمونه، ۱۳ مورد مقاوم یافت شد که در مقایسه با این مطالعه نتایج مشابهی یافت نشد. در تحقیق محمد اصغر زاده و همکاران که در سال ۱۳۸۶ صورت گرفت، مقاومت به اتامبوتول در سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس ۸/۳۳٪ با روش MAS-PCR<sup>۲</sup> گزارش گردید [۲۲].

در مطالعه حاضر درصد مقاومت به اتامبوتول با روش Allele-Specific، ۲۷/۶٪ می‌باشد پس در این مطالعه نسبت به تحقیق اصغر زاده تعداد نمونه‌های مقاوم بیش تری یافت شد. می‌توان گفت که روش Allele-Specific-PCR به نسبت MAS-PCR روش دقیق تری است، زیرا این روش مقاومت را فقط در یک آلل مورد بررسی قرار می‌دهد در حالی که روش MAS-PCR مقاومت را در چندین آلل مختلف بررسی می‌کند، بنابراین روش Allele-Specific PCR دقت بیشتری خواهد داشت.

نتایج به دست آمده از روش اسپولیگوتایپینگ مشخص کرد ۳ خانواده CAS, T, Haarlem بیش ترین درصد موتاسیون را نسبت به سایر خانواده‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس را داشتند به عبارتی می‌توان پیشنهاد کرد که این گسترش ساب تایپ‌ها بیشتر از سایر سویه‌ها می‌باشد و ممکن است که این سویه‌ها، سویه‌های غالب باشند. در تحقیق ولایتی و همکاران که در سال ۲۰۰۶ انجام گرفت، بیش‌ترین شیوع خانواده‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در میان بیماران ایرانی و افغانی بررسی شد، که شایع‌ترین الگوهای مربوط به اسپولیگوتایپینگ متعلق



نمودار ۱. فراوانی موتاسیون در باز اول و سوم در روش Allele-Specific

### بحث

اتامبوتول یکی از داروهای موثر در درمان بیماری سل است، بنابراین تشخیص سریع مقاومت به این دارو ضروری بوده، با توجه به این که در حالت عادی، حدوداً ۴۲ روز برای تشخیص قطعی مقاومت وقت نیاز است ولی با استفاده از روش‌های مولکولی در عرض ۶-۷ روز می‌توان مقاومت را تشخیص داد، بنابراین تشخیص سریع مقاومت دارویی مانع از تجویز نابجای دارو و همین‌طور استفاده از رژیم درمانی صحیح شده که از گسترش سویه‌های مقاوم جلوگیری به عمل می‌آید.

ژن embB آرایینوزیل ترانسفراز را کد می‌کند که پروتئین هدف اتامبوتول می‌باشد، بنابراین اتامبوتول بر روی آرایینوزیل ترانسفراز اثر کرده و مانع از سنتز لیپوآرایینومانان و آرایینوگلاکتان می‌شود و منجر به تجمع مایکولیک اسید و نهایتاً مرگ سلول می‌شود [۲۱].

در این مطالعه بر اساس بررسی بر روی ژن embB کدون ۳۰۶ با استفاده از روش Allele-Specific، ۹۳ سویه حساس و ۱۳ سویه (۲۷/۶٪) مقاوم به داروی اتامبوتول بودند، بنابر این تشخیص سریع مقاومت به این دارو از اهمیت فراوانی برخوردار است.

<sup>۱</sup> Mokrousov

<sup>۲</sup> Multiplex Allele Specific PCR

### نتیجه گیری

از ۳۳/۹٪ نمونه های مقاوم به روش تناسبی، ۲۷/۶٪ با روش Allele-Specific مقاوم تشخیص داده شد. روش Allele-Specific می تواند به عنوان یک روش مکمل در تشخیص موارد مقاوم به این دارو استفاده شود. می توان پیشنهاد کرد بررسی کدون های بیش تر و سایر عواملی که در بروز مقاومت دارویی دخیل هستند ضروری است.

### تشکر و قدردانی

این مقاله بخشی از پایان نامه تحت عنوان (بررسی موتاسیون های نقطه ای مقاومت به اتامبوتول در ساب تایپ های مختلف مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با استفاده از Allele-Specific PCR و PCR-RFLP و Spoligotyping می باشد که در مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی انجام گردید، لذا از کلیه کارکنان محترم مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی تشکر و قدردانی به عمل می آید.

به خانواده های (Beijing (۳/۲٪)، CAS (۲۰/۸٪)، EAI (۲۴٪)، Haarlem (۴/۴٪) و T (۲۰/۷٪) بودند. بر اساس این مطالعه خانواده های CAS و T، به عنوان Circulating Strain در تهران مطرح شدند [۲۳]. هم چنین در مطالعه انجام شده توسط امیر مظفری و همکاران بیشترین الگوی اسپولیگوتایپ مربوط به خانواده Haarlem بوده است [۲۴]. بر اساس مطالعه انجام شده توسط پلینگ و همکارانش (۲۰۱۰) نشان داده شد که موتانت ها در سویه های Beijing و CAS، Haarlem، بیشتر از بقیه بود [۱۳]. به طور کلی سویه های Beijing و CAS، Haarlem با مقاومت دارویی مرتبط هستند و چون در مطالعه حاضر هم این سویه ها مشاهده شده، لذا می توان این نتیجه را تأیید کرد که این سویه ها با مقاومت دارویی ارتباط دارند. با توجه به محدودیت زمانی، مسلماً تعداد نمونه های کمتر و همین طور تعداد ژن ها و کدون های کمتری مورد بررسی قرار گرفت، بنابراین در صورت وجود زمان کافی نتایج قابل اعتماد تری می توانستیم ارائه دهیم.

### References

- 1- Maddy JA, Suliny WJ, and Reynolds, RC. Glucosyltransferases as targets for inhibition of cell wall synthesis in *M. tuberculosis* and *M. avium*. Res Microbial. 1996 Jan-Feb; 147(1-2):106-112.
- 2- Mikusova k, Slyden RA, Besra GS, Brennan PJ. Biogenesis of mycobacterial cell wall and the site of action of ethambutol. Antimicrob Agents chemother. 1995 Nov; 39(11):2484-2489.
- 3- Alacide F, Pfyffer GE, Telenti A. Role of embB in natural and acquired resistance to ethambutol in mycobacteria. Antimicrob Agents chemother. 1997 Oct; 41(10):2270-3.
- 4- Telenti A, Philipp W, Sreevatsan S, Bernasconi C, Stockbauer KE, Wiele B, et al. The emb operon, a unique gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* involved in resistance to ethambutol. Nat Med. 1997 May; 3(2):567-70.
- 5- Sreevatsan S, Stockbauer KE, Pan X, Kreiswirth BN, Moghazeh SL, Jacobs WR, et al. Ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: critical role of embB mutations. Antimicrob Agents chemother. 1997 Aug; 41(8): 1677-1681.
- 6- Rieder HL, Chonde TM, Myking H, Urbanczik R, Laszlo A, Kim SJ, et al. The public health service national tuberculosis reference laboratory and the national laboratory network. IUATLD. 1998 Nov; 72-76.
- 7- Hosek J, Svastova P, Moravkova M, Pavlik I, Bartos M. Methods of mycobacterial DNA isolation from different biological material. Veterinarni Medicina . 2006 Apr; 51(5): 180-192.

- 8- Deng L, Mikusova K, Robuck KG, Scherman M, Brennan PJ, Mc Neil MR. Recognition of multiple effects of ethambutol on metabolism of mycobacterial cell envelope. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995 Mar; 39(3): 694-701.
- 9- Goude R, Amin AG, Chatterjee D, Parish T. The critical role of embC in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* 2008 Apr; 190(12): 4335-41.
- 10- Khoo KH, Douglas E, Azadi P, Namine JM, Besia GS, Mikusova K. Truncated structural variants of lipoarabinomannan in ethambutol drug-resistant strains of *Mycobacterium smegmatis*. Inhibition of arabinan biosynthesis by ethambutol. *J Biol Chem* 1996 Nov; 271(45): 271: 28682-90.
- 11- Mikusova K, Slayden RA, Besra GS, Brennan PJ. Biogenesis of the mycobacterial cell wall and the site of action of ethambutol. *Antimicrob Agents Chemother* 1995 Nov; 39(11): 2484-9.
- 12- Srivastava S, Ayyagari A, Dhole TN, Nyati KK, Dwivedi SK. emb nucleotide polymorphisms and the role of embB306 mutations in *Mycobacterium tuberculosis* resistance to ethambutol. *Int J Med Microbiol* 2009 Apr; 299(4): 269-80.
- 13- Plinke C, Cox HS, Zarkua N, Karimovich A, Brakers K, Diel R, et al. embCAB sequence variation among ethambutol-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates without embB306 mutation. *J Antimicrob Chemother*. 2010 Jul; 65(7): 1359-1367.
- 14- Mokrousov I, Narvskay O, Limeschenko E, Otten T, Vyshnerskiy B. Detection of ethambutol-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains by multiplex-allele specific PCR assay targeting embB306 mutations. *J Clin Microbiol*. 2002 May; 40(5): 1617-20.
- 15- Gori A, Bandera A, Marchetti G, Deqli E, Sposti A, Catozzi L. Spoligotyping and *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerg Infect Dis*. 2005 Aug; 11(8): 1242-8.
- 16- Farnia P, Mohammadi F, Masjedi MR, Velayati AA. Evaluation of tuberculosis transmission in Tehran: Using RFLP and spoligotyping methods. *J Infect*. 2004 Aug; 49(2): 94-101.
- 17- Urvashi BS, Naga S, Vijaya B, Jyoti A, Hema P, Sanjeev S. Predominant tuberculosis Spoligotypes, Delhi India. *Emerg Infect Dis*. 2004 Jun; 10(6): 1138-1142.
- 18- Ahmadi M, Farnia P, Tajedin E, Tabarsi P, Baghaei P, Masjedi MR, et al. *Mycobacterium Tuberculosis* Complex Strains Identification with Spoligotyping Method in Patients Attending to Masih Daneshvari Hospital. *J Zanzan Univ Med Sci*. 2010 Jul; 17(67): 23-33. (Full Text in Persian)
- 19- Dale JW, Brittain D, Cataldi AA. Spacer Oligonucleotide typing of bacteria of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: recommendations standardized nomenclature. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2001 Mar; 5(3): 216-9.
- 20- Van Sooligen D. Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. *J Inter Med*. 2001 Jan; 249(1): 1-26.
- 21- Ramaswamy S, Amin AG, Koksel S, Stager CE, Dou SJ, Sahly HE, et al. Molecular genetic analysis of nucleotide polymorphisms associated with ethambutol resistance in human isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob agents chemother*. 2000 Feb; 44(2) : 326-36.
- 22- Asgharzadeh M, Jahantabi A, Shahbabin K, Nahaii M, Rafi A. Ethambutol-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains identified by MAS-PCR method in comparison with proportion. *JMUMS*. 2008 Apr; 17(57): 50-56. (Full Text in Persian)
- 23- Velayati AA, Farnia P, Mirsaedi M, Masjedi MR. The most prevalent *Mycobacterium tuberculosis* superfamilies among Iranian and afghan TB cases. *Scand J Infect Dis* 2006 Sep; 38(6-7): 463-8. (Full Text in Persian)
- 24- Amirmozafari N, Ramezan zadeh R, Farnia P, Ghazi F. The frequency of Beijing genotype of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from tuberculosis patients. *J Iran Uni Med Sci*. 2005 Apr; 13(52): 7-16. (Full Text in Persian)

# Identification and Genetic Diversity of Ethambutol Resistant Strains of *Mycobacterium Tuberculosis* by Allelic-Specific PCR and Spoligotyping

Derakhshani Nezhad Z <sup>\*1</sup>, Sheikolslami F.M <sup>2</sup>, Farnia P <sup>2</sup>, Deilami Khiabani Z <sup>3</sup>,  
Ramazanzadeh R <sup>4</sup>, Kazempoor M <sup>2</sup>, Masjedi M. R <sup>5</sup>, Velayati A. A <sup>6</sup>

<sup>1</sup> MSc Student in Microbiology, Islamic Azad University, Zanjan Branch, Faculty of Medical and Sciences, Statistics and Mathematics Department, Mycobacteriology Research Centre (MRC), Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

<sup>2</sup> Mycobacteriology Research Centre, NRITLD, Masih Daneshvari Hospital, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

<sup>3</sup> Dept of Cellular and Molecular Biology, Islamic Azad University of Zanjan. Zanjan, Iran.

<sup>4</sup> Cellular and Molecular Research Center, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran.

<sup>5</sup> Chronic Respiratory Disease Research Center, NRITLD, Masih Daneshvari Hospital, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

<sup>6</sup> Clinical Tuberculosis and Epidemiology Research Center, NRITLD, Masih Daneshvari Hospital, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

\* Corresponding Author. Tel: +982127122259 Fax: +982126109505 E-mail: sh\_derakhshani@yahoo.com

Received: 9 August 2011 Accepted: 6 March 2012

## ABSTRACT

**Background & Objectives:** Ethambutol is one of the four main drugs in treatment of tuberculosis. The most common mutation associated with this drug resistance usually occurs in codon 306 of *embB*. The aim of this study was to detect ethambutol resistance using Allele-Specific PCR and Spoligotyping in various subtypes of *Mycobacterium tuberculosis*.

**Methods:** 140 sputum specimens were collected from suspected TB patients. They were digested and decontaminated using Pettrof method before culturing them on LJ medium. Drug susceptibility testing was performed on 106 culture positive specimens using proportional method. DNA was extracted from the isolated organisms and subsequently subjected to Allele-Specific PCR to detect any mutation in *embB*306. Spoligotyping was then used to determine the subtypes.

**Results:** Out of 106 cultures positive samples, 36 samples (33.9%) showed resistance to ethambutol using proportional method. Allele-Specific PCR assay identified 93 as sensitive and 13 (27.6%) as resistant strains. The results of PCR were in agreement with result of proportional method. The PCR method revealed that 61.5% of mutation occurred in the first and 38.5% in third nucleotides. Spoligotyping differentiated *Mycobacterium tuberculosis* strains into Beijing (10; 9.4%), Bovis (2; 1.8%), CAS (24; 22.6%), EAI (1; 0.9%), Haarlem (27; 25.4%), LAM (5; 4.7%), Manu (5; 4.7%), T (27; 25.4%) and U (2; 1.8%) families. The high frequency of mutation in *embB* gene was belonged to Haarlem, CAS and T subfamilies.

**Conclusion:** Based on results current study, mutations in the genes other than *embB* might have occurred in the resistant strains that gave negative result in Allele-Specific PCR assay. Therefore other mechanisms of resistance to this antibiotic should be investigated.

**Key Words:** Allele-Specific PCR; Spoligotyping; *Mycobacterium tuberculosis*; Ethambutol; EmbB306