

تعیین ژنوتیپ سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس جدا شده از بیماران مسلول با استفاده از تکنیک اسپولیگوتایپینگ

دکتر رشید رمضانزاده^۱، دکتر نور امیر مظفری^۲، دکتر پریسا فربنا^۳، دکتر فریده قاضی^۴

- ۱- استادیار گروه میکروبیشناسی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی کردستان (مؤلف مستوی) atrop_t@yahoo.com
۲- دانشیار گروه میکروبیشناسی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران- تهران
۳- استادیار گروه میکروبیشناسی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی- تهران
۴- استادیار گروه میکروبیشناسی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران- تهران

خلاصه

زمینه و هدف: هدف از این مطالعه بررسی فراوانی سویه‌های مختلف مایکوباکتریوم توبرکلوزیس جدا شده از بیماران مسلول با تکنیک اسپولیگوتایپینگ و ارزیابی ریسک فاکتورهای مربوطه می‌باشد.

روش بررسی: در این مطالعه مقطعی- تحلیلی، ۴۳۹ بیمار مراجعه کننده به بیمارستان مسیح دانشوری، مرکز آزمایشگاه رفانس سل کشوری، طی سالهای ۱۳۸۴-۱۳۸۳ مورد بررسی قرار گرفت. سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بعد از شناسایی و انجام آزمونهای آنتی‌بیوگرام با روش اسپولیگوتایپینگ تیپ‌بندی شدند و در نهایت با استفاده از تستهای *t* و chi-square مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها: اسپولیگوتایپینگ منتج به ایجاد ۱۴۰ طرح گردید که در ۹ فامیل طبقه‌بندی شدند. اکثریت الگوهای اسپولیگوتایپ بدست آمده ۸۷/۱٪ منحصر بفرد بوده و برای اولین بار در ایران گزارش می‌شود، در حالیکه مابقی ۱۲/۸٪ آنها مطابق با طرحهای موجود در بانک جهانی اسپولیگوتایپینگ بودند که از سایر نقاط دنیا نیز گزارش شده‌اند. همچنین غالبترين فامیل در این مطالعه متعلق به فامیل Haarlem می‌باشد. فقط ۶/۳٪ از سویه‌ها به فامیل بیجینگ تعلق داشتند و اکثریت سویه‌ها مربوط به زیر گروه غیربیجینگ بود. سویه‌های مقاوم به چند دارو بیشتر در گروه تکاملی ۱ دیده شد. در حالت کلی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی بالایی در سویه‌های جدا شده از بیماران افغانی دیده شد ($p < 0.001$).

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که سویه‌های مقاوم به چند دارو در باکتریهای جدا شده از بیماران افغانی ساکن در ایران خیلی بالا بود. بعلاوه، وجود فامیل بیجینگ در میان سویه‌های جدا شده از بیماران ایرانی بایستی جدی در نظر گرفته شود. همچنین مطالعات بیشتری برای روشن شدن اهمیت سایر فاکتورهای مهم در کنترل سل نیاز است.

کلید واژه‌ها: سل، مقاومت، آنتی‌بیوتیک، اسپولیگوتایپینگ، بیجینگ

وصول مقاله: ۸۴/۹/۲۱ اصلاح نهایی: ۸۴/۱۱/۵ پذیرش مقاله: ۸۴/۱۱/۸

مقدمه

على رغم اینکه از پنجاه سال گذشته داروهای ضد سلی قابل دسترس می‌باشند، هر سال ۱۰ میلیون مورد جدید به تعداد افراد آلوده اضافه می‌گردد (۲۰%). برای فهم بهتر فاکتورهایی که انتقال سل را در جامعه

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 می‌شود که یک سوم از جمعیت دنیا به باکتری مایکوباکتریوم توبرکلوزیس آلوده باشند.

فاصله انداز ۳۵ تا ۴۱ بازی جدا می‌شوند که متغیر می‌باشند و بررسی این لوکوس توسط اسپولیگوتایپینگ بر اساس این حقیقت است که توالی فاصله انداز مجزا منحصر بفرد می‌باشد و می‌تواند با الیگونوکلئوتید فاصله انداز سنتیک هیرید گردد که به غشاء متصل می‌شود. طرح هیریداسیون نشان می‌دهد که کدام الیگو نوکلئوتید فاصله انداز در کدام سویه وجود دارد. این روش را اصطلاحاً اسپولیگوتایپینگ (Spacer Oligotyping) می‌نامند. از این پلی‌مورفیسم برای تمایز سویه‌های کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس برای مطالعات اپیدمیولوژیکی و تمایز رده‌ها در بین کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس M. tuberculosis, M. bovis, M. microtii, M. (شامل canettii) استفاده می‌گردد. با این روش همچنین قادر به بررسی نحوه انتشار سویه‌های مختلف مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در جامعه، تشخیص عود یا عفونت مجدد، آلدگی آزمایشگاهی و شناسایی باکتری از روی نمونه بالینی بدون کشت خواهیم بود (۲۴). از این مطالعه برای شناسایی فامیلهای مختلف از جمله فامیل بیجینگ در سویه‌های بالینی جدا شده از بیماران مسلول در تهران و بررسی فاکتورهای دخیل در انتقال آنها انجام گرفت.

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی - تحلیلی ۴۳۹ بیمار مراجعه کننده به بیمارستان مسیح دانشوری، مرکز آزمایشگاه رفرانس سل کشوری، طی سالهای ۱۳۸۴-۱۳۸۳ مورد بررسی قرار گرفتند. روش‌های آزمایشگاهی تشخیص و تعیین حساسیت شامل مراحل زیر بود. از محیط Lowenstein Jensen (LJ) به عنوان محیط انتخابی برای جدا سازی اولیه سویه‌های

تحت تأثیر قرار می‌دهند و همچنین برای ارزیابی برنامه‌های کنترل منطقه‌ایی، شناسایی سویه‌ها می‌تواند به عنوان یک ابزار اساسی و مفید در تحقیقات اپیدمیولوژی مولکولی بکار رود. شناسایی سویه‌ها توسط تکنیکهای استاندارد مولکولی انجام می‌شود که برای مقایسه سویه‌ها بین آزمایشگاهها، مناطق، کشورها و قاره‌ها بکار می‌رود (۳). بعلاوه شناسایی سویه‌ها می‌تواند برای تعیین سویه‌های شایع و تمایز آنها از سویه‌های نامربوط اپیدمیولوژیکی مفید باشد. به نظر می‌رسد تمام سویه‌های درگیر در شیوع یک عفونت بصورت کلونال باشند (۴). M. tuberculosis فامیلهای کلونال مربوط به هم از توسط روشهای تیپ بندی مولکولی تعیین می‌گردد که ممکن است به ناحیه خاصی محدود شود یا در کل جهان منتشر شوند (۵). از نظر ژنتیکی این سویه‌ها شدیداً بهم مربوط بوده که تمایز آنها با تکنیکهای مورد استفاده مشکل می‌باشد (۶). لذا برای تعیین این سویه‌ها به تکنیکهای بسیار دقیق نیاز است. با ظهور تکنیکهای مولکولی، تحقیقات مربوط به سل ابزارهای جدید و قدرتمندی برای فهم بهتر خصوصیات فیلوژنتیک و انتقال M. tuberculosis پیدا کرد.

اخیراً از روش مولکولی اسپولیگوتایپینگ (Spoligotyping) برای تمایز سویه‌های مختلف استفاده می‌شود. اسپولیگوتایپینگ بر پایه PCR یک روش سریع و نسبتاً ارزان می‌باشد که به راحتی در آزمایشگاههای تشخیص طبی مجہز قابل انجام است. یک ناحیه اختصاصی (DR=Direct Repeat) در داخل ژنوم M. tuberculosis مرکب از تکرارهای مستقیم می‌باشد. لوکوس DR در ژنوم کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس شامل چندین DR جفت بازی محافظت شده است. این تکرارها توسط توالی

با استرپتاویدین نشاندار بصورت درخشنان (chemiluminescence) آشکار می‌گردد. سپس غشاء نیتروسلولز در مقابل فیلم حساس قرار داده می‌شود و پس از ظهرور فیلم نقاط سیاه نشان دهنده حضور نواحی فاصله انداز می‌باشد که می‌توان به صورت عددی نمایش داد. طرح الگوی هر سویه را می‌توان به صورت Octal Code در آورد و با اطلاعات موجود در بانک جهانی آسپولیگوتایپینگ مقایسه کرده و فامیلها و گروههای آنها را تعیین کرد (۹). در حالت کلی حساسیت این روش ۹۷٪ و ویژگی آن ۹۵٪ می‌باشد (۱۰).

یافته‌ها

از کل ۴۳۹ بیمار مراجعه کننده، ۳۴۶ (۷۹/۴٪) نفر ملیت ایرانی و ۹۳ (۲۱/۱٪) نفر ملیت افغان داشتند. میانگین سنی برای کل بیماران ۴۸/۳۰ سال بوده که برای بیماران ایرانی ۵۲/۰۳ سال و برای بیماران افغان ۳۵/۰۶ سال بود. مقاومت سویه‌های جدا شده نسبت به آنتیبیوتیکهای مورد استفاده در نمودار ۱ آورده شده است. چنانچه در نمودار ۲ دیده می‌شود مقاومت آنتیبیوتیکی در سویه‌های جدا شده از بیماران افغانی بیشتر از باکتریهای جدا شده از بیماران ایرانی است. اسمیر مستقیم برای بررسی باسیلهای اسید فست بر روی نمونه‌ها انجام شد که ۷۸/۵٪ از آنها مثبت بودند. بیشترین نمونه بالینی خلط بوده و پس از آن مایع بروننش و بیوپسی‌ها در رده دوم و سوم قرار داشت (جدول ۱). همچنین رابطه بین ملیت و جنسیت بیماران و وجود فامیل بیجینگ و غیربیجینگ در سویه‌های ایزوله شده در جدول ۱ ارائه شده است.

از کل سویه‌های مورد بررسی، DNA مناسب برای آسپولیگوتایپینگ از ۲۲۰ سویه بدست آمد که پس از

مايكوباكتریوم استفاده می‌گردد و برای شناسایی سویه‌ها از تستهای نیاسین، کاتالاز و احیاء نیترات استفاده گردد. تستهای حساسیت دارویی بوسیله روش نسبی غيرمستقیم (The proportion method) انجام شد که National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS 2002) به عنوان روش استاندارد پذیرفته شده است و دارای حساسیت و ویژگی بالایی می‌باشد (۸ و ۷). برای تعیین حساسیت از داروهای ایزونیازید، ریفامپین، استرپتومایسین و اتامبوتول به ترتیب با غلظتهاي $0.2 \mu\text{g}/\text{ml}$ LJ، $30 \mu\text{g}/\text{ml}$ LJ، $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ LJ و $15 \mu\text{g}/\text{ml}$ LJ استفاده گردد. حساسیت هر سویه با تعیین نسبت رشد باسیلهای مقاوم به یک دارو در مقایسه با رشد در محیط کنترل بدون آنتیبیوتیک با استفاده از معیارهای بین‌المللی تعیین شد. مقاومت هر سویه معادل رشد ۱٪ یا بیشتر سویه‌ها تعریف شد. نتایج بدست آمده با استفاده از تستهای t و chi-square مورد تجزیه تحلیل قرار گرفت و نرم افزار آماری SPSS win جهت آنالیز داده‌ها مورد استفاده قرار گرفت.

آسپولیگوتایپینگ سویه‌های مايكوباكتریوم توبرکلوزیس با استفاده از روش استاندارد انجام شد (۹). بطور خلاصه، اینکه نواحی فاصله انداز با استفاده از DRa (CCG AGA GGG GAC GGA) DRb (GGT TTT GGG TCTGAC و AAC) GAC) تکثیر یافتند که DRb در انتهای^۱ ۵ با بیوتین نشاندار شده است. DNA تکثیر یافته برای هیبریداسیون با ۴۳ ناحیه فاصله انداز تست می‌شود.

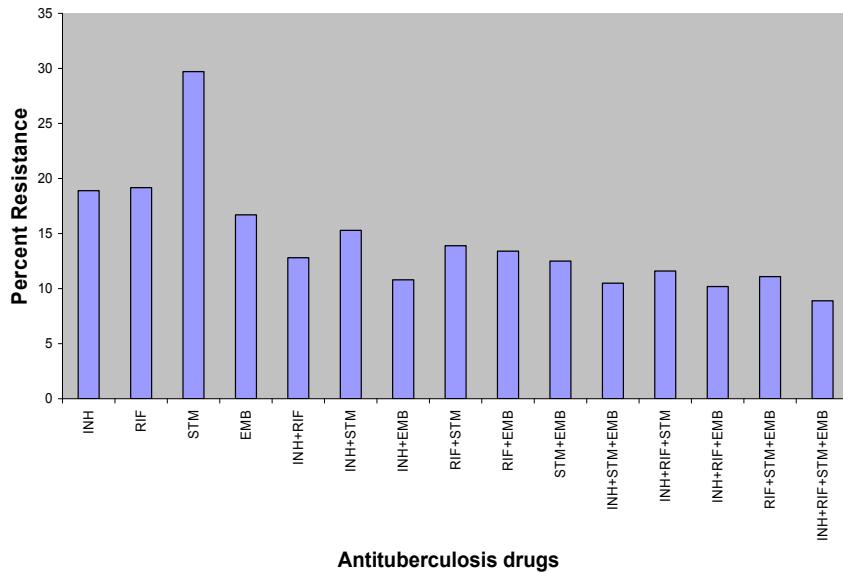
اولیگونوکلئوتیدهای سنتیک نواحی فاصله انداز به صورت خطوط موازی با پیوند کووالان به غشاء نایلونی متصل شده‌اند. قطعات متصل شده بعد از انکوباسیون

EAI با ۳۹ و ۳۱ عضو در رده دوم و سوم قرار دارند (نمودار ۴). همچنین ۶/۳٪ از سویه‌ها به فامیل بیجینگ تعلق داشت (جدول ۱). تعداد بیماران مربوط با هر طرح در نمودار ۳ نشان داده شده است. با در نظر گرفتن مقاومت نسبت به یک دارو، مقاومت بالا نسبت به استرپتومایسین دیده شد. در حالت ترکیبی نیز مقاومت به ترکیب ریفامپین و استرپتومایسین درصد بالایی نسبت به سایر ترکیبها مشاهده گردید.

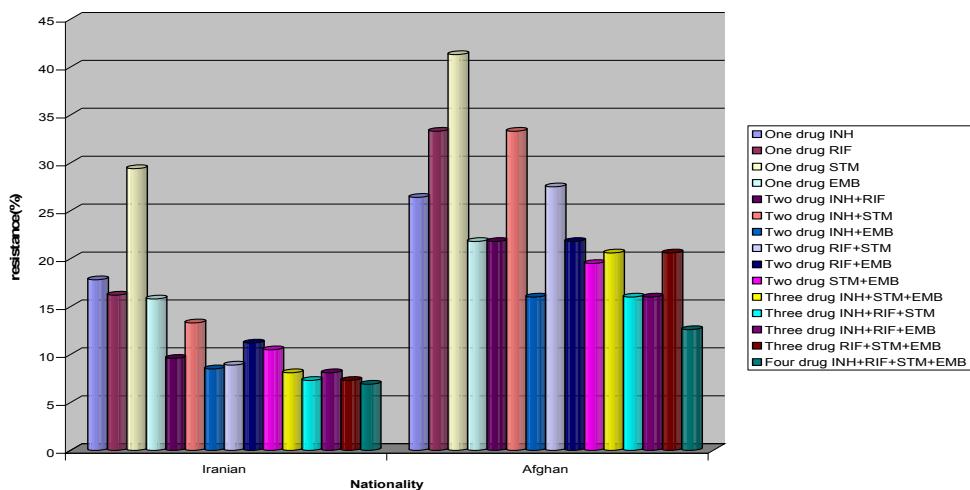
آنالیز ۱۴۰ نوع طرح اسپولیگوتایپ شناسایی شد که به سه گروه ژنتیکی تکاملی اصلی (I, II, and III) تعلق داشتند. اکثریت طرحها (۸۶٪) منحصر بفرد بوده و برای اولین بار گزارش شدند در حالیکه مابقی (۱۰٪) آنها مطابق با طرحهای موجود در بانک جهانی اسپولیگوتایپینگ بودند که از سایر نقاط دنیا نیز گزارش گردیده بودند. غالابترين فاميل در اين مطالعه متعلق به فاميل Haarlem مي باشد (جدول ۱). زير گروههای T و

جدول ۱: رابطه بين مليت و بررسی اسمیر مستقیم، جنس، متبع نمونه بالینی و فاميل بیجینگ ($P < 0.2$).

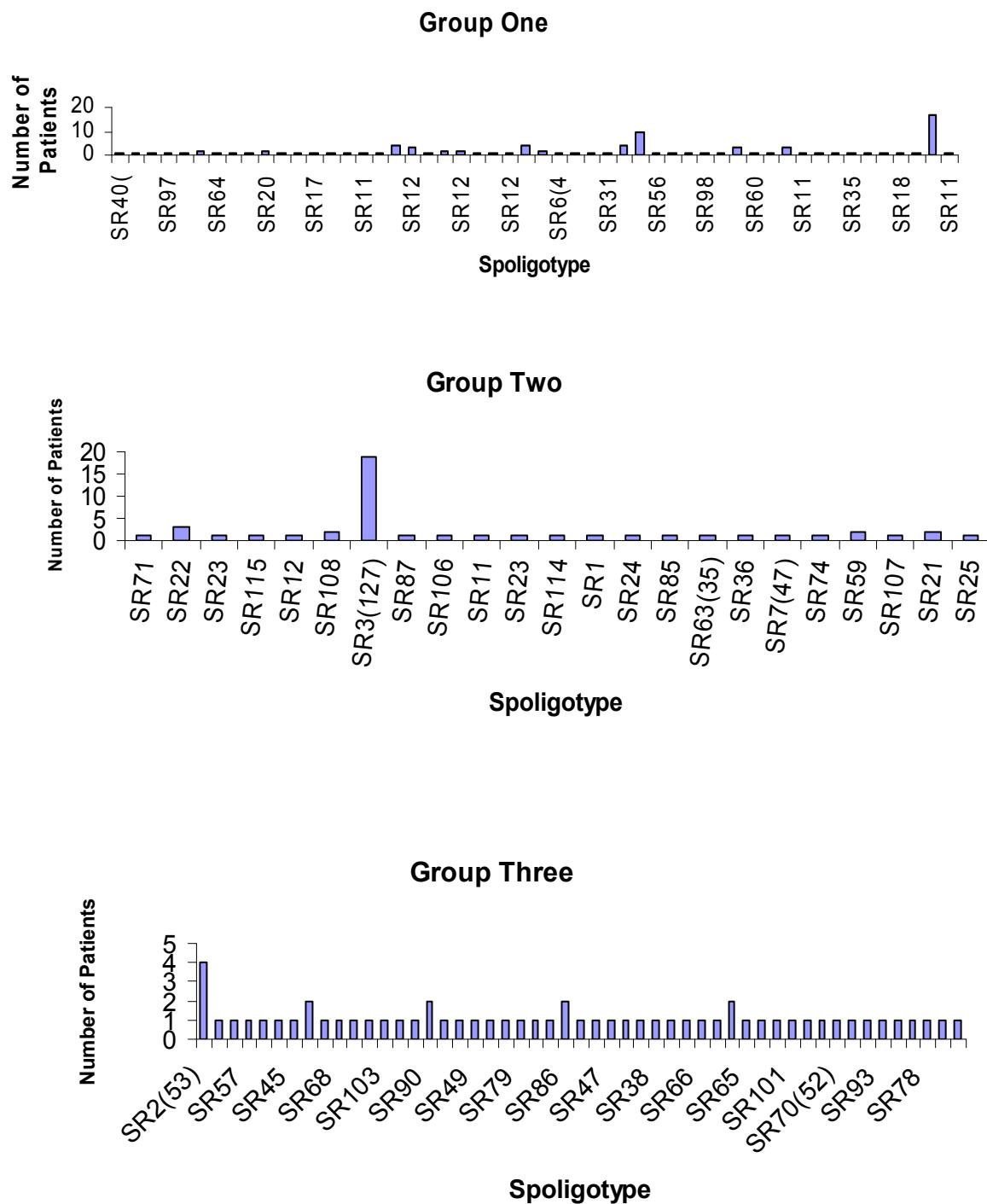
ملیت					
افغانی		ایرانی			
درصد	تعداد	درصد	تعداد		
۱۷	۷۵	۶۱/۵	۲۷۰	+	
۵	۲۲	۱۷/۳	۷۶	-	اسمیر
۱۷/۵	۷۷	۶۶/۲	۲۹۱	خلط	
۱/۶	۲	۵/۲	۲۳	برونش	
۲/۲	۱۰	۱/۹	۳	مایع جنب	
۰/۶	۲	۰/۶	۲	ادرار	نمونه بالینی
۰	۰	۰/۲	۱	گره لنفاوی	
۰/۶	۲	۲/۲	۱۰	بیوپسی	
۰	۰	۰/۲	۱	آبسه	
۰	۰	۱/۸	۸	شستشوی معده	
۰	۰	۱/۹	۷	BAL	
۱۵/۷	۶۹	۵۱	۲۲۴	مذکر	
۵/۴	۲۴	۲۷/۷	۱۲۲	مونث	جنس
۰	۰	۰/۲	۱	AFRI	
۲/۳	۵	۴	۱۲	Beijing	
۰/۲	۱	۱/۶	۷	CAS1	
۰/۹	۴	۶/۲	۲۷	EAI	
۴/۶	۲۰	۱۴/۶	۶۴	Haarlem	
۰	۰	۰/۲	۱	HaarlemI	فاميل
۰	۰	۰/۲	۱	LAM2	
۰/۲	۱	۰/۷	۳	T	
۱/۱	۵	۷/۱	۳۱	T1	
۰	۰	۰/۵	۲	T2	
۰/۹	۴	۰/۹	۲۶	Undefined	



نمودار ۱: الگوی مقاومت دارویی ۴۳۹ سویه M. tuberculosis جدا شده از بیماران مسلول



نمودار ۲: طرح شماتیک مقاومت آنتیبیوتیکی در دو گروه مورد مطالعه بر حسب ملیت



نمودار ۳: توزیع فراوانی طرح های اسپولیگوتایپیستگ جدای شده از بیماران مسلول

No. of patients	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	octal code	Clade
1	X	.	X	X	X	X	X	X	.	.	X	X	X	X	X	X	570071740030400	AFRI									
19	X	X	X	.	.	.	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	70377774003771	CAS1										
31	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	77777775410771	EAI											
75	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	77777775420771	Haarlem											
1	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	670000777760531	LAM2										
3	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	77777777423571	Manu											
39	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	707757177760771	T											
37	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	777777777777771	undefined											
14	X	X	X	X	X	X	X	X	3771	W-Beijing								

نمودار ۴: طرح شماتیک فامیلهای حاصل از بررسی ۲۲۰ طرح آسپولیگوتایپ جدا شده از سویه‌های مایکروکتریوم توبیر کلوزین

بحث

مشاهده شده در نوکلئوتیدهای 465 katG codon گروه ژنتیکی تکاملی از سویه‌های gyrA codon 95 به گروههای ۲ و ۳ قادر به هیریداسیون با فاصله اندازه‌ای متعلق M. tuberculosis به گروههای ۲ و ۳ قدرتند (۱۵). همچنین اخیراً این گروهها به چندین زیر گروه (فامیل) تقسیم شده‌اند (۱۶). لذا فامیلهای East- Central Asian (CAS)، W-Beijing و African-Indian (EAI) دارند در حالیکه فامیلهای european-low X Latino-American and Haarlem (H), banders و Familiel Mediterranean (LAM) اصلی ژنتیکی ۲ و ۳ می‌باشند. با اقتباس از بانک جهانی اطلاعات اسپولیگو تایپینگ و آنالیز طرح‌های این مطالعه، ۱۴۰ طرح اسپولیگو تایپ متعلق به این سه گروه ژنتیکی مشاهده شد (نمودار ۳). شایعترین اسپولیگو تایپهای بررسی شده در این مطالعه (127) SR3 متعلق به گروه اصلی ۲ و (1) SR19 و (26) SR15 متعلق به گروه اصلی ۱ بودند (نمودار ۳). همچنین ۲۲۰ طرح حاصله به ۷ زیر گروههای شرح داده شده تقسیم شده‌اند که ۳۴٪

در این مطالعه میزان مقاومت مشاهده شده به یک آنتی بیوتیک یا ترکیبی از دو یا سه آنتی بیوتیک بالاتر از گزارش قبلی از ایران می باشد (۱۱). مقاومت دارویی یک مشکل اساسی در درمان و کنترل سل می باشد و اضافه شدن سویه های مقاوم به چند دارو باعث تشیدی این معطل بهداشتی دنیا شده است. میانگین فرکانس کسب مقاومت چند دارویی (MDR-TB)، ۱۳٪ گزارش شده است (۱۲). این سویه ها قادر به انتقال به افراد آلدوده به ویروس ایدز در بیمارستانها و زندانها می باشد (۱۳). سویه های مایکروبیکتیریوم توبرکلوزیس جدا شده از بیماران افغانی سطح مقاومت دارویی بالاتری نسبت به سویه های جدا شده از بیماران ایرانی نشان دادند (نمودار ۲). اکثر باکتریهای جدا شده از بیماران ایرانی متعلق به گروه تکاملی ۲ بودند در حالیکه اکثریت سویه های جدا شده از بیماران افغانی به گروه ۱ تعلق داشتند (نمودار ۳) با در نظر گرفتن همراهی سویه های مقاوم به چند دارو با گروه ژنتیکی ۱ (۱۴) می توان استنباط کرد که غالب بودن گروه ۱ در ایزوله های افغانی مطابق با مقاومت بالای مشاهده شده می باشد. بر اساس پلی مورفیسم

(۲۱ و ۲۱). بنظر می‌رسد تکنیک اسپولیگوتایپینگ یک روش حساس و اختصاصی برای تعیین فامیل بیجینگ است که نتایج حاصله براحتی قابل مقایسه با نتایج مطالعات مختلف می‌باشد. همچنین از روش انگشت نگاری IS6110 برای بررسی این فامیل استفاده می‌شود که نتایج آن همخوانی نزدیکی با تکنیک اسپولیگوتایپینگ دارد (۲۲). چنانچه قبل از ذکر شد در این مطالعه ۶/۶٪ از سویه‌ها در زیر گروه بیجینگ قرار داشتند (نمودار ۳). میزان جدا سازی این فامیل در بسیاری از کشورهای آسیایی بیش از ۵۰٪ گزارش شده است (۱۵). این نتایج نشان می‌دهد که فامیل بیجینگ بومی ایران نبوده و از مرزهای شرقی بخصوص از طریق مهاجران افغانی وارد کشورمان شده است. معهداً، فاکتورهای مختلفی در انتشار فامیل بیجینگ دخالت دارند و بسیاری از این فاکتورها از ناحیه‌ای به ناحیه دیگری متفاوت می‌باشند. لذا، مطالعات بیشتری نیاز است که نقش تک تک این فاکتورها را بررسی نماید تا بتوان برنامه کنترل و درمان دقیقی برای ریشه‌کن کردن این بیماری ارائه داد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از همکاری معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ایران و مرکز رفراں سل کشوری واقع در بیمارستان مسیح دانشوری جهت فراهم آوری منابع مالی و همچنین از دکتر J. Kamerbeek بخاطر فرستادن پروتوكل استاندارد اسپولیگوتایپینگ و کارکنان آزمایشگاه رفراں سل کشوری بخاطر کمکهای آزمایشگاهی روتین در تشخیص این سویه‌ها، تشکر و قدردانی می‌گردد.

متعلق به فامیل Haarlem ۱۷/۱٪ متعلق به فامیل T، ۱۴٪ متعلق به فامیل EAI، ۸/۶٪ متعلق به فامیل CASI، ۶/۳٪ متعلق به فامیل W-Beijing و ۱/۳٪ متعلق به فامیل Manu بودند. تفاوت معنی داری در ملتیهای مختلف مشاهده نشد (جدول ۱). فردیناند و همکارانش (۱۷) گزارش کردند که ۲۳/۵٪ از ایزووله‌ها به فامیل EAI، ۹/۱٪ به فامیل CAS، ۴٪ به فامیل Beijing و ۲/۷٪ به فامیل Manu متعلق بودند. در یک مطالعه دیگر ۱۱/۷٪ به فامیل T، ۷/۳٪ به فامیل Haarlem و ۳/۲٪ به فامیل Beijing متعلق داشتند (۱۸). در مقایسه با دو مطالعه مذکور که اکثریت سویه‌ها به فامیلهای EAI و T تعلق داشتند. در این مطالعه اکثریت مشاهده شده متعلق به فامیل Haarlem بود که در گروه اصلی ۲ و ۳ قرار دارد. لذا چنین استنباط می‌شود که انتشار سویه‌های مختلف مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به صورت کلونال می‌باشد و برای هر منطقه اختصاصی بوده و احتمالاً انتشار آنها تحت تأثیر شرایط دیگر مانند شرایط جغرافیایی و سایر فاکتورها تغییر می‌یابد.

چنانچه ذکر شد فامیل بیجینگ در گروه ژنتیکی اصلی ۱ قرار دارد و همراهی این سویه‌ها با مقاومت دارویی از بسیاری از کشورهای دنیا گزارش شده است (۱۹). برای اولین بار سویه‌های مربوط به فامیل بیجینگ از چین گزارش گردید و هم اکنون در ۱۷ ناحیه اطراف پکن شایع می‌باشند. این سویه‌ها همچنین به کشورهای مجاور مانند مغولستان، تایلند، کره جنوبی و ویتنام منتشر شدند (۲۰). حتی مکانهای خیلی دور با این سویه‌ها آلوده شدند. از مکانهای آلوده به فامیل بیجینگ می‌توان از آفریقای جنوبی، کلمبیا و جزایر قناری نیز نام برد

References

1. Burgos MV, Pym AS. Molecular epidemiology of tuberculosis. *Eur Respir J Suppl* 2002; 36: 54s-65s.
2. Mazars E, Lesjean S, Banuls AL, Gilbert M, Vincent V, Gicquel B and et al. High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(4): 1901-6.
3. Kanduma E, McHugh TD, Gillespie SH. Molecular methods for *Mycobacterium tuberculosis* strain typing: a users guide. *J Appl Microbiol* 2003; 94(5): 781-91.
4. Supply P, Warren RM, Banuls AL, Lesjean S, Van Der Spuy GD, Lewis LA, et al. Linkage disequilibrium between minisatellite loci supports clonal evolution of *Mycobacterium tuberculosis* in a high tuberculosis incidence area. *Mol Microbiol* 2003; 47(2): 529-38.
5. Supply P, Lesjean S, Savine E, Kremer K, van Soolingen D, Locht C. Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. *J Clin Microbiol* 2001; 39(10): 3563-71.
6. 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* strains of the Beijing family: practical implications and evolutionary considerations. *J Clin Microbiol* 2004; 42(6): 2438-44.
7. Schaaf HS, Shean K, Donald PR. Culture confirmed multidrug resistant tuberculosis: diagnostic delay, clinical features, and outcome. *Arch Dis Child* 2003; 88(12): 1106-11.
8. Schwoebel V, Lambregts-van Weezenbeek CS, Moro ML, Drobniowski F, Hoffner SE, Raviglione MC. Standardization of antituberculosis drug resistance surveillance in Europe. Recommendations of a World Health Organization (WHO) and International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD) Working Group. *Eur Respir J* 2000; 16(2): 364-71.
9. Kremer K, van Soolingen D, Frothingham R, Haas WH, Hermans PW, Martin C and et al. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *J Clin Microbiol* 1999; 37(8): 2607-18.
10. Gori A, Bandera A, Marchetti G, Degli Esposti A, Catozzi L, Nardi GP and et al. Spoligotyping and *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerg Infect Dis* 2005; 11(8): 1242-8.
11. Mansoori SD AS, Mirabolhasani Z, Farnia P, Velayati A. The pattern of drug resistance among newly diagnosed and old cases of pulmonary tuberculosis in NRITLD. *Arch Iranian Med* 2003; 6(4): 255-260.
12. Youngchaiyud P, Iseman MD. Update treatment of multidrug-resistant tuberculosis. Introduction, discussion and summary. *Chemotherapy* 1999; 45 Suppl 2: 1-2, 41-5.
13. Iseman MD. Management of multidrug-resistant tuberculosis. *Chemotherapy* 1999; 45 Suppl 2: 3-11.
14. Toungoussova OS, Sandven P, Mariandyshev AO, Nizovtseva NI, Bjune G, Caugant DA. Spread of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains of the Beijing genotype in the Archangel Oblast, Russia. *J Clin Microbiol* 2002; 40(6): 1930-7.
15. Soini H, Pan X, Amin A, Graviss EA, Siddiqui A, Musser JM. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients in Houston, Texas, by spoligotyping. *J Clin Microbiol* 2000; 38(2): 669-76.
16. Seban M, Mokrousov I, Rastogi N, Sola C. A data-mining approach to spacer oligonucleotide typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Bioinformatics* 2002; 18(2): 235-43.
17. Ferdinand S, Sola C, Chanteau S, Ramarokoto H, Rasolonavalona T, Rasoloforazanamparany V and et al. A study of spoligotyping-defined *Mycobacterium tuberculosis* clades in relation to the origin of peopling and the demographic history in Madagascar. *Infect Genet Evol* 2005; 5(4): 340-8.
18. Lari N, Rindi L, Sola C, Bonanni D, Rastogi N, Tortoli E, et al. Genetic diversity, determined on the basis of katG463 and gyrA95 polymorphisms, Spoligotyping, and IS6110 typing, of mycobacterium tuberculosis complex isolates from Italy. *J Clin Microbiol* 2005; 43(4): 1617-24.

19. Glynn JR, Whiteley J, Bifani PJ, Kremer K, van Soolingen D. Worldwide occurrence of Beijing/W strains of *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review. *Emerg Infect Dis* 2002; 8(8): 843-9.
20. van Soolingen D, Qian L, de Haas PE, Douglas JT, Traore H, Portaels F, et al. Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of east Asia. *J Clin Microbiol* 1995; 33(12): 3234-8.
21. Palittapongarnpim P, Luangsook P, Tansuphaswadikul S, Chuchottaworn C, Prachaktam R, Sathapatayavongs B. Restriction fragment length polymorphism study of *Mycobacterium tuberculosis* in Thailand using IS6110 as probe. *Int J Tuberc Lung Dis* 1997; 1(4): 370-6.
22. Dale JW, Al-Ghusein H, Al-Hashmi S, Butcher P, Dickens AL, Drobniowski F, et al. Evolutionary relationships among strains of *mycobacterium tuberculosis* with few copies of IS6110. *J Bacteriol* 2003; 185(8): 2555-62.