ORIGINAL ARTICLE

Mycobacterium Tuberculosis Genotyping Using MIRU-VNTR Typing

Taher Azimi[1],
Aref Shariati[1],
Fatemeh Fallah[2],
Abbas Ali Imani Fooladi[3],
Ali Hashemi[4],
Hossein Goudarzi[2],
Mohammad Javad Nasiri[5]

[1] MSc Student in Microbiology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[2] Professor, Department of Microbilogy, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[3] Professor, Apphied Microbiology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[4] Assistant Proffesor, Deparment of Microbiology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[5] Assistant Professor, Infectious Diseases and Tropical Medicine Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received Jan 11, 2016 Accepted April 23, 2017)

Abstract

Background and purpose: Tuberculosis is among the leading causes of death from infectious diseases in the world. According to World Health Organization (WHO), the estimated rate of TB in Iran was 21 per 100,000 populations in 2015. The present study was designed to evaluate the genetic diversity and transmission dynamics of *Mycobacterium tuberculosis* in Tehran, Iran.

Materials and methods: A total of 80 isolates of *Mycobacterium tuberculosis* was cultured from TB patients attending a teaching hospital in Tehran, Iran from January 2015 to December 2016. Standard 15-locus Mycobacterial Interspersed Repeat Units/Variable Numbers of Tandem Repeat (MIRU-VNTR) typing was applied to genotype clinical isolates.

Results: There were 78 different VNTR profiles comprising 2 clusters and 76 unique patterns. The Hunter – Gaston discriminatory index (HGDI) was 0.990, indicating a high power of discrimination for MIRU-VNTR typing. The QUB26 and MTUB21 loci were designated as highly discriminative.

Conclusion: The high genetic diversity among *Mycobacterium tuberculosis* isolates suggests that transmission may have been caused by different sources.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, genotyping, MIRU-VNTR, Tehran, Iran

J Mazandaran Univ Med Sci 2017; 27 (149): 40-48 (Persian).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-03-29]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و هفتم شماره 149 خرداد سال 1396 (48-40)

تعیین ساختار ژنتیکی *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* به روش *MIRU- VNTR 15 loci*

طاهر عظیمی[1]
عارف شریعتی[1]
فاطمه فلاح[2]
عباسعلی ایمانی فولادی[3]
علی هاشمی[4]
حسین گودرزی[2]
محمد جواد نصیری[5]

چکیده

سابقه و هدف: سل یکی از علل اصلی مرگ و میر ناشی از بیماری‌های عفونی در جهان است. در ایران، بر اساس آمار سازمان بهداشت جهانی(WHO) ، میزان بروز سل 21 نفر در هر یکصد هزار نفر در سال 2015 گزارش شده است. مطالعه حاضر به منظور بررسی تنوع ژنتیکی و نحوی انتقال *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* در شهر تهران، طراحی گردید.

مواد و روش‌ها: تعداد 80 ایزوله *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* از بیماران مبتلا به سل مراجعه کننده به یکی بیمارستان‌های آموزشی شهر تهران، از بهمن 1393 تا دی 1395 جدا شد. از روش استاندارد MIRU-VNTR برای ژنوتایپینگ ایزوله‌های جدا شده استفاده شد.

یافته‌ها: تعداد 78 پروفایل مختلف VNTR شامل 2 کلاستر و 76 الگوی منحصر به فرد به‌دست آمد. میزان شاخص HGDI برابر با 0/990 و نشان دهنده قدرت بالای افتراق روش MIRU-VNTR بود. لوکوس‌های QUB26 و MTUB21 به عنوان لوکوس های با قدرت افتراق بالا شناخته شدند.

استنتاج: تنوع ژنتیکی بالا در میان ایزوله های *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* بیانگر آن است که انتقال این ایزوله ها ممکن است از منابع مختلف رخ داده باشد.

واژه های کلیدی: *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس*، ژنوتایپینگ، MIRU-VNTR، تهران، ایران

مقدمه

بیماری سل توسط *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* ایجاد می شود و به عنوان یکی از عوامل اصلی مرگ و میر ناشی از بیماری‌های عفونی در سراسر جهان شناخته شده است(1). علی‌رغم وجود داروهای ضد سلی موثر، این بیماری به عنوان یک چالش بزرگ جهانی است وتخمین زده می‌شود که سالانه بیش از 9 میلیون نفر در جهان به فرم فعال این بیماری مبتلا می شوند و 1/5 میلیون نفر نیز به دلیل ابتلا به این بیماری جان خود را از دست می‌دهند(2، 3). طبق گزارش سازمان بهداشت جهانی (WHO)، میزان بروز بیماری سل در سال 2015 در ایران، 21 نفر در هر 100000 نفر گزارش شده است(4). شیوع بیماری سل در بعضی از کشورهایی که هم مرز با ایران هستند ، 2 الی 3 برابر بیش‌تراز این مقدار می‌باشد(5). در شهر تهران نیز به عنوان پایتخت ایران و

مولف مسئول: محمدجواد نصیری - تهران، خیابان کودکیار، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی Email: mj.nasiri@hotmail.com
1. دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
2. استاد، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
3. استاد، مرکز تحقیقات میکروب شناسی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران
4. استادیار گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
5. استادیار، مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
تاریخ دریافت : 1395/10/22 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : 1395/10/27 تاریخ تصویب : 1396/2/3

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-03-29]

پرجمعیت ترین شهر کشور، تخمین زده می‌شود که میزان ابتلا به بیماری سل ، 21 مورد در هر 100000 نفر باشد. در طول سال‌های گذشته، افراد زیادی از شهرهای دیگر و هم‌چنین بعضی از کشورهای هم مرز و مجاور به شهر تهران مهاجرت کرده اند و بیش از 450000 نفر از مهاجران افغانی هم اکنون در این شهر زندگی می‌کنند(6). عواملی نظیر نقص سیستم ایمنی، شیوع سویه‌های مقاوم به چند دارو (MDR) مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، سالخوردگی افراد، به عنوان ریسک فاکتورهایی برای بیماری سل مطرح می‌باشند(7، 8). هم‌چنین همسایگی با کشورهایی مثل افغانستان، پاکستان، ترکمنستان و عراق که شیوع بیماری سل در این کشورها بسیار بیشتر از ایران می‌باشد، باعث شده است که بیماری سل به عنوان یک مشکل مهم و اساسی در ایران باقی بماند(9، 10). در دهه‌های اخیر، ژنوتایپ بندی سویه‌های *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس*، با تشخیص شیوع بیماری و به وسیله ردیابی عفونت، به طور چشمگیری اطلاعات ما را از اپیدمیولوژی بیماری سل افزایش داده است و معرفی روش‌های تایپینگ مولکولی نیز اطلاعات مورد نیاز جهت نشان دادن روش‌های انتقال و شیوع *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* را افزایش داده و باعث تغییر سیاست های کنترل ملی و محلی گردیده است(15-11). روش‌های مولکولی مانند اسپولیکوتایپینگ، MIRU-VNTR، IS6110-RFLP و ETR typing نیز که توالی کاملی از ژنوم را آنالیز می‌کنند، جهت مشخص کردن ایزوله‌های بالینی *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* در کشور ایران مورد استفاده قرار می‌گیرند(16). روش IS6110-RFLP به عنوان روش مرسوم و Gold Standard در ژنوتایپ‌بندی سویه‌های *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* مطرح می‌باشد ولی از آن‌جایی که انجام این روش سخت بوده و نیازمند مقدار زمان زیادی برای کشت نمونه‌ها بوده و مقدار DNA بیش‌تری لازم می‌باشد، استفاده از این روش محدود شده است. علاوه بر این، روش IS6110-RFLP دارای قدرت افتراق کم‌تری در بین ایزوله‌های *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* با تعداد کپی های کمتری از IS6110 می‌باشد(20-17). روش تایپینگ MIRU-VNTR (mycobacterial interspersed repetitive units- variable number of tandem repeats) دارای قدرت افتراق بیش‌تری بوده و تمایل کم‌تری به هموئوپلازی دارد وهمراه با روش اسپولیگوتایپینگ، به عنوان ابزارهای مناسبی جهت ارزیابی پیشرفت بیماری سل در بین افراد آلوده به کار می‌رود(21، 22). بنابراین هدف از انجام این مطالعه مشخص کردن الگوهای ژنتیکی سویه‌های *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* جداشده از بیماران بستری شده در یک مرکز آموزشی شهر تهران و هم‌چنین مشخص کردن ژنوتایپ‌های غالب در این منطقه می‌باشد.

مواد و روش ها

در مجموع 80 ایزوله ی *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* از بیماران بستری شده در یک مرکز آموزشی در شهر تهران از سال 1394-1395جمع آوری گردید. هر یک از سویه های مورد بررسی در این مطالعه متعلق به یک بیمار مشخص بودند و همه ایزوله‌ها از طریق کشت نمونه‌های خلط و بال گرفته شده از بیماران به دست آمدند. بیماران مورد بررسی دارای محدوده سنی گسترده‌ای بودند و علائم و نشانه‌های بالینی بیماری سل را داشتند و اسمیر گرفته شده نیز جهت تشخیص باسیل اسید فست مثبت بود.ایزوله ها توسط تست های استاندارد بیوشیمیایی نظیر تولید نیاسین، تست کاتالاز، و تولید نیترات مشخص گردیدند. استخراج DNA نیز از کلونی‌ها به روش جوشانیدن (Boiling) انجام شد. برای تایید نهایی نمونه های استخراج شده DNA، روش اختصاصی IS6110 با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (PCR) انجام یافته و همه ی DNA ی استخراج شده از کلونی ها به عنوان *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* تایید گردیدند. برای

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-03-29]

انجام MIRU-VNTR پرایمرهای اختصاصی جهت اتصال به نواحی متغیر تکراری *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* (VNTR)، برای تکثیر نواحی VNTR مختلف از 15 لوکوس طبق پروتوکل بیان شده توسط Supply و همکاران استفاده گردید (جدول شماره 1)(23). تعداد کپی‌های VNTR توسط اندازه هریک از نواحی تکثیر یافته مشخص گردید. واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (PCR) در یک حجم 25 میکرو لیتر که محتوی 2/5 میکرولیتر بافرPCR، 1میلی مولار MgCl2، 0/01 پیکومولار از هریک از پرایمرهای F و R، 200 میکرومولارdNTP، 1 واحد از آنزیم Taq DNA polymerase(mi Taq, Metabion, Martinsried, Germany) و 2 میکرولیتر از DNA الگو می‌باشد، انجام شد. برنامه تکثیر واکنش زنجیره‌ای پلی مراز نیز در دستگاه بدین ترتیب بود: دناتوراسیون اولیه دردمای 94 درجه سانتی گراد برای 5 دقیقه، سپس 94 درجه برای 45 ثانیه، (دمای اتصال پرایمرها بر اساس هر یک از لوکوس‌های ارزیابی شده متغیر بوده و در جدول شماره 1 آمده است)، 72 درجه به مدت 90 ثانیه و در نهایت 72 درجه به مدت 10 دقیقه جهت تکثیر نهایی بوده است. برای کنترل آلودگی مواد و واکنش‌ها، آب مقطر تزریقی به عنوان کنترل منفی استفاده گردید و در نهایت محصول PCR در ژل آگارز 1/5 درصد الکتروفورز شده و نتایج آنالیز گردید.

جهت آنالیز تنوع آللی VNTR و ارتباطات ژنتیکی، همه نتایج وارد یک فایل اکسل گردیده و سپس تنوع آللی هریک از لوکوس‌های VNTR توسط شاخص افتراقی Hunter Gaston ارزیابی گردید. ارتباطات ژنتیکی که بین ایزوله وجود داشت نیز با استفاده روش unweighted pair group و همراه با نرم افزار MIRU-VNTR Plus software که فاصله‌های موجود در بین سویه ها را با توجه به تعداد کپی‌های VNTR محاسبه می کند ، نشان داده شد. درخت فیلوژنتیکی UPGMA نیز توسط نرم افزار عنوان شده ترسیم گردید. کلاسترها بر اساس فاصله مشخص از 0 و الگوهای مشابه در 15 لوکوس تعیین گردیدند. ضریب قطعی 1 و فاصله مشخص 0/3 که مربوط به 7 لوکوس مختلف بودند ، جهت مشخص کردن سویه‌های مرتبط استفاده شد. الگوهای MIRU-VNTR-15 locus به دست آمده از مطالعه، با الگوهای موجود در پایگاه داده های جهانی، جهت مشخص کردن دودمان و ارتباط سویه‌های *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* مورد بررسی، مقایسه گردید و شاخص تنوع آللی VNTR، (h)، برای ارزیابی تنوع آللی لوکوس‌های مختلف تکرار های تصادفی با تعداد متغیر(VNTR) مورد استفاده قرار گرفت.

جدول شماره 1: شرایط دمایی PCR و پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه

MIRU Locus	Primer sequences (5' to 3')	Annealing Temp C
MIRU 26	TAGGTCTACCGTCGAAATCTGTGAC AGGCGAATAG	58
MIRU 40	GGGTTGCTGGATGACAACGTGTGGGT GATCTCGGCGAAATCAGATA	59
MIRU 10	GTTCTTGACCAACTGCAGTCGTCC GCCACCTTGGTGATCAGCTACCT	62
MIRU 16	TCGGTGATCGGGTCCAGTCCAAGTA CCCGTCGTGCAGCCCTGGTAC	59
MIRU 4; ETR D	GCGCGAGAGCCCGAACTGC GCGCAGCAGAAACGCCAGC	60
MIRU 31; ETR E	ACTGATTGGCTTCATACGGCTTTA GTGCCGACGTGGTCTTGAT	60
Mtub04	CTTGGCCGGCATCAAGCGCATTATT GGCAGCAGAGCCCGGGATTCTTC	60
ETR C	CGAGAGTGGCAGTGGCGGTTATCT AATGACTTGAACGCGCAAATTGTGA	63
ETR A	AAATCGGTCCCATCACCTTCTTAT CGAAGCCTGGGGTGCCCGCGATTT	58/5
Mtub30	CTTGAAGCCCCGGTCTCATCTGT ACTTGAACCCCCACGCCCATTAGTA	60
Mtub39	CGGTGGAGGCGATGAACGTCTTCTAG AGCGGCACGGGGGAAAGCTTAG	61
QUB-4156	TGACCACGGATTGCTCTAGT GCCGGCGTCCATGTT	59
QUB-11b	CGTAAGGGGGATGCGGGAAATAGG CGAAGTGAATGGTGGCAT	60
Mtub21	AGATCCCAGTTGTCGTCGTCCAACAT CGCCTGGTTCTGTA	63
QUB-26	AACGCTCAGCTGTCGGAT CGGCCGTGCCGGCCAGGTCCTTCCCG AT	58

یافته ها

با استفاده از روش تایپینگ MIRU-VNTR15 loci ، 78 الگوی مختلف در میان 80 ایزوله *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* تعیین گردید. این 78 الگو در 2 کلاستر که از 4 سویه تشکیل شده اند و 76 الگوی غیر مشابه توزیع شدند(جدول شماره 2).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-03-29]

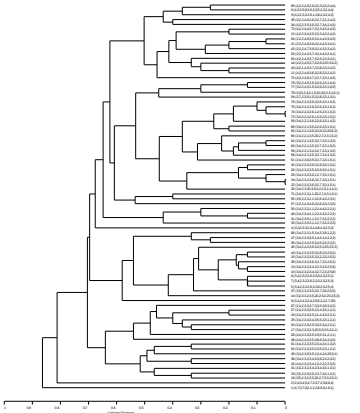
جدول شماره 2: الگوی 78 نوع پروفایل مختلف در بین سویه های مورد بررسی

فراوانی	الگو MIRU	Frequency	الگو MIRU
1	4,2,1,4,5,3,7,3,2,8,2,3,2,4,2	2	3,4,2,3,2,3,6,3,2,7,3,3,1,5,1
1	3,4,2,3,5,1,1,2,2,7,3,2,2,2,2	2	3,4,2,2,2,6,1,2,6,2,3,1,5,2
1	2,2,2,4,7,3,9,3,2,4,3,3,3,4,2	1	4,7,3,7,9,2,1,2,2,8,6,8,1,6,1
1	3,4,2,3,2,3,5,3,2,8,2,3,2,5,2	1	2,4,3,4,5,4,7,3,3,7,2,3,8,6,4
1	4,2,2,4,5,3,7,4,2,8,2,0,3,4,2	1	4,2,2,3,2,2,6,1,2,8,4,3,2,4,2
1	3,4,2,4,2,3,6,3,2,5,2,0,2,5,2	1	3,3,2,3,3,2,3,4,4,8,4,3,2,3,2
1	3,4,2,3,4,1,1,2,2,4,3,2,2,2,2	1	3,4,2,3,2,2,6,3,2,8,2,3,2,5,4
1	3,4,2,3,3,3,5,1,4,5,2,4,2,2,2	1	4,2,2,5,6,2,6,3,2,5,2,3,2,4,4
1	4,4,2,4,3,3,5,3,6,8,3,4,3,4,2	1	3,4,2,3,2,2,6,3,2,3,2,3,2,5,3
1	3,4,2,3,6,3,5,1,3,4,2,4,0,3,1	1	3,4,2,3,2,2,6,3,2,6,2,3,2,5,1
1	2,4,2,3,2,1,1,2,2,4,4,2,2,2,1	1	3,2,2,4,2,2,4,3,5,5,2,2,2,7,0
1	2,4,2,3,6,3,5,3,2,7,2,3,1,5,1	1	3,4,2,3,2,3,4,3,2,7,2,3,2,5,8
1	2,4,2,2,2,3,5,2,3,5,2,3,1,2,1	1	4,2,2,4,6,3,6,3,2,8,2,3,2,4,2
1	2,2,2,4,2,3,7,3,2,4,4,3,2,4,1	1	4,2,2,3,4,3,5,3,2,3,4,3,2,4,2
1	2,7,2,3,5,1,5,3,2,8,2,3,1,3,1	1	3,4,2,3,2,3,4,3,2,3,2,3,2,5,3
1	4,5,2,3,3,1,1,3,2,6,4,3,2,3,1	1	3,2,3,3,2,3,5,0,2,5,2,0,2,5,3
1	2,4,2,2,2,1,3,4,3,2,7,2,3,1,3,2	1	3,4,2,3,2,3,5,3,2,2,2,3,2,5,3
1	2,2,2,4,3,4,6,3,2,6,3,3,2,3,3	1	4,4,2,3,2,3,4,1,3,2,2,2,2,3,3
1	4,4,2,2,2,1,3,5,3,2,7,2,4,1,3,2	1	3,4,2,3,3,2,3,0,5,5,3,5,2,2,1
1	3,4,2,2,2,1,3,6,3,2,6,2,3,1,4,2	1	3,5,2,3,2,3,5,0,2,7,3,3,2,3,1
1	3,4,2,2,2,1,3,5,3,2,7,2,3,1,5,2	1	2,4,2,3,3,2,5,2,1,4,3,3,2,2,1
1	4,4,2,2,2,3,5,2,3,4,2,2,1,3,2	1	2,4,2,3,3,2,5,3,3,5,3,4,2,2,1
1	3,4,2,2,2,1,3,5,3,2,7,2,4,1,3,2	1	2,2,2,4,6,3,9,3,2,4,4,3,3,4,1
1	4,2,2,4,3,3,7,3,2,6,2,3,3,4,1	1	3,5,2,3,3,3,5,2,3,7,3,4,1,3,1
1	2,2,2,4,6,3,9,3,2,4,4,3,3,4,3	1	3,4,2,3,3,3,4,3,5,5,3,3,1,2,1
1	3,4,2,2,2,1,3,5,3,2,6,2,3,0,5,2	1	3,4,2,3,2,3,5,3,2,8,3,3,1,5,1
1	2,4,2,2,2,1,3,5,0,2,7,2,3,1,5,2	1	2,4,2,3,3,3,5,2,2,4,3,3,1,2,1
1	2,4,2,2,3,3,5,3,2,6,2,3,0,5,2	1	4,4,2,3,3,3,5,3,5,3,3,1,2,1,1
1	2,4,2,3,3,3,5,2,3,7,3,3,2,2,3	1	3,4,2,3,2,3,6,1,2,7,3,3,1,5,1
1	3,4,2,2,2,1,3,5,2,2,6,2,3,1,5,2	1	4,2,2,3,5,3,6,3,2,7,3,4,2,4,3
1	3,4,2,2,2,4,5,2,6,3,2,7,2,1,2,4,2	1	3,2,2,4,5,2,6,3,2,7,2,1,2,4,2
1	3,4,2,3,2,2,5,3,4,5,2,3,2,2,2	1	3,4,2,3,2,2,5,3,4,5,1,5,3,2,6,2,3,1,6,3
1	3,5,2,3,2,3,5,3,2,7,2,6,2,5,2	1	3,5,2,3,2,3,5,3,2,7,2,6,2,5,2,3,1,6,1
1	3,4,2,3,2,3,4,3,3,8,2,3,2,3,2	1	3,4,2,3,2,3,4,3,3,8,2,3,2,3,2
1	4,2,2,4,5,2,6,3,2,7,2,3,2,5,2	1	3,4,2,3,2,3,6,3,2,7,2,3,2,5,2

MIRU Pattern : ETR A, ETR C, MIRU 04, ETR E, MIRU 10, MIRU 16, MIRU 26, MIRU 40, QUB11b, QUB 26, MTUB 30, MTUB 39, MTUB 04, MTUB 21, QUB4156

مقایسه‌ای که بین الگوهای به دست امده از 15 لوکوس با پایگاه داده ای MIRU-VNTR سازمان جهانی (http://www.miru-vntr.org) انجام یافت نشان داد که 3 مورد از سویه‌ها با 186 سویه‌ای که در پایگاه دیتا بیس جهانی وجود دارد مشابهت دارند. هم‌چنین قدرت افتراق روش MIRU-VNTR برای همه ایزوله‌ها بسیار بالا بود (HGDI=0/99). بزرگ‌ترین کلاستر از دو سویه تشکیل شده بود و 76 ایزوله نیز دارای الگوهای غیر مشابه بودند. برمبنای شاخص تمایز و افتراق، 4 لوکوس MIRU در این مطالعه دارای قدرت افتراقی بالایی بودند($h > 0/6$) که شامل MIRU10, MIRU26 , QUB26 , MTUB21 می‌باشد. هم‌چنین 9 لوکوس نیز قدرت افتراقی متوسطی ($0/3 \leq h \leq 0/6$) داشتند که به ترتیب شامل MIRU40, MIRU16 , QUB11b , MTUB30 , MTUB39 , MTUB04 , QUB4156 , ETRC , ETRA بوده و در میان 15 لوکوس، لوکوس‌های ETRC و MIRU04 پایین‌ترین تنوع آللی و لوکوس QUB26 بیش‌ترین تنوع آللی را با استفاده از روش MIRU نشان داده‌اند. نتایج توزیع آلل‌های MIRU در جدول شماره 3 نشان داده شده است.

درخت فیلوژنتیکی توسط نرم افزار MIRU-VNTR plus و MVSP ترسیم گردید و با استفاده از این دندروگرام ایزوله‌هایی را با الگوهای ژنتیکی مشابه تشخیص داده و با همدیگر گروه‌بندی شد که در نمودار شماره 1 نشان داده شده است.



نمودار شماره 1: دندروگرام ترسیم شده برای 80 ایزوله مورد بررسی توسط نرم افزار MIRU-VNTR plus و MVSP

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-03-29]

جدول شماره 3: تنوع آللی لوکوس های مورد مطالعه به روش MIRU-VNTR

انواع آلل ها	ETR A	ETR C	MIRU 04	ETR E	MIRU 10	MIRU 16	MIRU 26	MIRU 40	QUB11b	QUB 26	MTUB 30	MTUB 39	MTUB 04	MTUB 21	QUB4156
0	-	1	-	-	1	-	-	6	-	-	-	3	2	-	1
1	-	-	1	-	8	9	7	8	1	-	-	2	32	1	28
2	17	21	75	16	33	19	-	12	60	3	45	7	38	14	33
3	44	2	4	43	15	50	2	52	11	5	23	55	7	15	12
4	19	50	-	19	3	2	8	2	4	11	11	8	-	19	5
5	-	4	-	1	11	-	31	-	3	13	-	1	-	25	-
6	-	-	-	-	7	-	21	-	1	14	1	1	-	5	-
7	-	2	-	1	1	-	8	-	-	21	-	-	-	11	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13	-	2	1	-	1
9	-	-	-	-	1	-	3	-	-	-	-	1	-	-	-
HGDI	0/6	0/5	0/1	0/2	0/7	0/5	0/7	0/5	0/4	0/8	0/5	0/5	0/6	0/7	0/6
کل	3	6	3	5	9	4	7	5	6	7	4	9	5	7	6

HGDI total: 0.99 (HGDI, Hunter-Gaston discriminatory index.)

بحث

مایکوباکتریوم توبرکلوزیس عامل اصلی بیماری سل بوده و به عنوان اولین عامل مرگ و میر ناشی از بیماری‌های عفونی مطرح می‌باشد(1). براساس گزارش سازمان بهداشت جهانی (WHO)، هر ساله به طور متوسط در کشور ایران از هر 100 هزار نفر، بیش از 20 نفر به بیماری سل مبتلا می‌شوند(2). کشور ایران به دلیل ورود مهاجران زیادی از کشورهای مرزی و تجمع این مهاجران در شهرهای بزرگ مثل تهران و ریسک فاکتورهای دیگری مثل تراکم جمعیتی بالا و کمبود امکانات بهداشتی و مراقبتی، یک ناحیه استراتژیک برای جلوگیری و کنترل انتقال بیماری سل در این منطقه محسوب می شود(6). در مطالعه حاضر، 80 سویه *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* از بیماران بستری در یکی از مراکز آموزشی شهر تهران جدا گردیده و با استفاده از روش‌های IS6110 و MIRU-VNTR 15-locus الگوهای ژنتیکی شان را مورد بررسی قرار دادیم. مشخص کردن دودمان ژنتیکی ایزوله‌های *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* در شهر تهران، می‌تواند در مطالعات بعدی جهت مشخص کردن زنجیره انتقال مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مورد استفاده قرار گیرد که این امر یک فاکتور کلیدی در کنترل بیماری سل نه تنها در ایران بلکه در جهان می‌باشد. روش تایپینگ MIRU-VNTR که در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت، قدرت افتراقی بسیار بالایی را برای همه ایزوله نشان داد و میزان HGDI برابر با 0/99 بود . قدرت افتراقی که در مطالعه ما به دست آمد، با میزان قدرت افتراقی که در مطالعه‌ای که توسط زمانی و همکاران انجام یافته بود تقریبا مشابه بود. در مطالعه ما 76 ایزوله دارای الگوهای غیر مشابه بودند و این نتایج عکس نتایجی بود که در مطالعه زمانی و همکارانش گزارش شده بوده است(13).

در مطالعه‌ای که توسط محمد عسگرزاده و همکاران انجام یافته بود، 95 مورد از ایزوله‌های مورد بررسی دارای الگوهای ژنتیکی غیر مشابهی بودند واین گزارش تقریبا مشابه نتیجه ای است که در مطالعه ما به دست آمد . اما در این مطالعه بزرگ‌ترین کلاستر شامل 9 ایزوله بوده است و از این نظرمشابهتی با نتیجه مطالعه ما نداشته است(24). در مطالعه ما، لوکوس QUB26 بیش‌ترین قدرت افتراقی راهمراه با 7 آلل نشان داد (HGDI :0/833) و بعد از این لوکس نیز، لوکوس‌های MTUB21(HGDI:0/785) و MIRU10(HGDI:0/765) و MIRU26(HGDI :0/760) قرار داشتند، اما در

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-03-29]

مطالعه‌ای که توسط Wei Lu و همکاران در کشور چین انجام یافت، نتایج هیچ مشابهتی با نتایج بررسی ما نداشته و بیان شده که لوکوس QUB11b (HGDI :0/734) بیش‌ترین قدرت تمایز را در بین سایر لوکوس‌ها دارد(25). نکته جالب در نتایج بررسی‌های ما این بود که اغلب سویه‌هایی که ما مورد مطالعه قرار دادیم دارای الگوهای غیر مشابهی بودند و احتمالا این موضوع بیانگر این است که این ایزوله به تازگی در بین بیماران انتشار یافته است، اما میزان قرار گیری سویه‌ها در کلاسترهای مشخص در مطالعه ما 5 درصد و 4 ایزوله بوده و این موضوع تاکید می‌کند که شیوع بیماری در اغلب موارد ناشی از عود مجدد این سویه ها بوده است. مواردی مانند تراکم جمعیت بالا ، بیماری های اندمیک ، شیوع بیماری ایدز در شهر تهران که به عنوان ریسک فاکتور مطرح می باشند می توانند درانتشار و انتقال بیماری سل نقش داشته باشند. مشابه نتایج مطالعه‌ای که توسط Loubna Tazi انجام یافته بود، اغلب بیماری در جامعه می‌تواند ناشی از فعالیت مجدد و عود عفونت‌های *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* نسبت به انتقال اخیر بیماری باشد. اگر این نتایج صحیح باشند و بیش‌تر بیماری‌های ایجادشده به دلیل عود عفونت باشد، تاثیر احتمالی و کم انتقال بیماری و عنوان کردن این مطلب که شیوع بیش‌تر بیماری در جامعه به دلیل فعالیت مجدد می باشد می‌تواند توسط برنامه‌های کنترلی و مدیریت بیماری به میزان زیادی تحت تاثیر قرار بگیرد. شاید در آینده درمان عفونت‌های پنهان ومخفی *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* به عنوان یک استراتژی کنترلی در نواحی که بیماری به صورت اندمیک وجود دارد در نظر گرفته شود(26). علاوه بر این، از آن جایی که اغلب بیمارانی که به شهر تهران مراجعه می‌کنند از مناطق و شهرهای مختلف کشور هستند، قابل پیش‌بینی بود که الگوهای ژنتیکی متفاوت باشد و همان‌طور که قبلا بیان شده اغلب سویه‌ها در این مطالعه دارای الگوهای غیر مشابه بودند. با فرض این‌که مقاومت دارویی در سویه‌های مختلف دارای الگوهای مشابه نیست ،زمانی که چنین الگوی ژنتیکی از ژنوتایپ بندی ایزوله ها به دست می‌آید، می‌توان عنوان کرد که خطر مقاومت دارویی گسترده در جامعه وجود دارد. با توجه به نتایج مطالعه ما و بررسی‌هایی که توسط افراد مختلف در مناطق مختلفی انجام یافته است، می‌توان پیشنهاد داد که یک پایگاه داده‌ای واحد، مشابه پایگاه داده‌ای جهانی در کشور ایران به خصوص شهر تهران، جهت پایش و ارزیابی بیماران و سویه‌های در حال گردش در جامعه ایجاد گردد.

سپاسگزاری

این مقاله برگرفته از پایان نامه دوره کارشناسی ارشد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به شماره ثبت 110 می‌باشد.

References

1. Mbugi EV, Katale BZ, Siame KK, Keyyu JD, Kendall SL, Dockrell HM, et al. Genetic diversity of Mycobacterium tuberculosis isolated from tuberculosis patients in the Serengeti ecosystem in Tanzania. Tuberculosis. 2015; 95(2): 170-178.
2. World Health Organization (WHO). *Global Tuberculosis Report. 20th ed . 2015.* 2015.
3. World Helth Organization: Western Pacific Region. Regional Strategy to stop tubercolosis in the western pacific (2011–2015). 2010.
4. Organization, W.H., *Global tuberculosis report 2015.* 2015. 2.
5. Zamani S, Haeili M, Nasiri MJ , Imani Fooladi AA, Javadpour S, Feizabadi MM.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-03-29]

Genotyping of Mycobacterium tuberculosis isolates from Hormozgan province of Iran based on 15 locus MIRU-VNTR and spoligotyping. Internatiomal Journal of Bacteriology. 2016; (2016). (persian).

6. Feyisa SG, Haeili M, Zahednamazi F, Mosavari N, Taheri MM, Hamzehloo G, et al. Molecular characterization of Mycobacterium tuberculosis isolates from Tehran, Iran by restriction fragment length polymorphism analysis and spoligotyping. Rev Soc Bras Med Trop. 2016; 49(2):204-410.
7. Singh M, Mynak M, Kumar L, Mathew JL, Jindal SK. Prevalence and risk factors for transmission of infection among children in household contact with adults having pulmonary tuberculosis. Arch Dis Child. 2005; 90(6): 624-628.
8. Farnia P, Mohammadi F, Masjedi MR, Varnerot A, Zarifi AZ, Tabatabee J, et al. Evaluation of tuberculosis transmission in Tehran: using RFLP and sploloigotyping methods. Journal of Infection. 2004; 49(2): 94-101.(persian).
9. Mozafari M, Farnia P, Afraei M, Derakhshani-Nezhad Z, Masjedi MR, Velayati AA. Molecular diversity of Mycobacterium tuberculosis strains indifferent provinces of Iran. Iran J Microbiol. 2013;5(4):366-373.(persian).
10. Haeili M, Darban□Sarokhalil D, Fooladi AAI, Javadpour S, Hashemi A, Siavoshi F, et al. Spoligotyping and drug resistance patterns of Mycobacterium tuberculosis isolates from five provinces of Iran. Microbiologyopen. 2013;2(٦):988-996.
11. Barnes PF, Cave MD. Molecular epidemiology of tuberculosis. New Engl J Med. 2003; 349(12): 1149-1156.
12. Van Soolingen D, Kremer K, Vynycky E. New perspectives in the molecular epidemiology of tuberculosis. Mycobacteria and TB.Vol 2: Karger Publishers; 2004. pp. 17-45.
13. Zamani S, Haeili M, Nasiri MJ, Imani Fooladi AA, Javadpour S, Feizabadi MM. Genotyping of Mycobacterium tuberculosis Isolates from Hormozgan Province of Iran Based on 15-Locus MIRU-VNTR and Spoligotyping. Inte J Bacteriol. 2016; 2016: 7146470.
14. Kato-Maeda M, Small PM. How molecular epidemiology has changed what we know about tuberculosis. West J Med. 2000; 172(4):256-259.
15. Easterbrook PJ, Gibson A, Murad S, Lamprecht D, Ives N, Ferguson A, et al. High rates of clustering of strains causing tuberculosis in Harare, Zimbabwe: a molecular epidemiological study. J Clin Microbiol. 2004;42(10): 4536-4544.
16. Pourostadi M, Rashedi J, Poor BM, Kafil HS, Shirazi S, Asgharzadeh M. Molecular Diversity of Mycobacterium tuberculosis Strains in Northwestern Iran. Jundishapur J Microbiol. 2016;9(٩): e35520. (persian).
17. Sougakoff W. Molecular epidemiology of multidrug resistant strains of Mycobacterium tuberculosis. Clin Microbiol Infect. 2011; 17(6):800-805.
18. McEvoy CR, van Pittius NCG, Victor TC, van Helden PD, Warren RM. The role of IS6110 in the evolution of Mycobacterium tuberculosis. Tuberculosis (Edinb). 2007; 87(5): 393-404.
19. Sun Y-J, Bellamy R, Lee AS, Ng ST, Ravindran S ,Wong S-Y, et al. Use of mycobacterial interspersed repetitive unit-

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-03-29]

variable-number tandem repeat typing to examine genetic diversity of Mycobacterium tuberculosis in Singapore. J Clin Microbiol. 2004; 42(5): 1986-1993.

20. Teixeira Dantas NG, Suffys PN, Carvalho WS, Gomes HM, de Almeida IN, de Assis LJ, et al. Genetic diversity and molecular epidemiology of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis in Minas Gerais State, Brazil. BMC Infectious Diseases. 2015; 15(1):306.

21. Skuce RA, McCorry TP, McCarroll JF, Roring SM, Scott AN, Brittain D, et al. Discrimination of Mycobacterium tuberculosis complex bacteria using novel VNTR-PCR targets. Microbiology. 2002; 148(pt 2): 519-528.

22. Mazars E, Lesjean S, Banuls AL, Gilbert M, Vincent V, Gicquel B, et al .High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of Mycobacterium tuberculosis molecular epidemiology. Proc NatI Acad Sciences USA. 2001; 98(4): 1901-1906.

23. Supply P. Multilocus variable number tandem repeat genotyping of Mycobacterium tuberculosis: Technical Guide.Institue de Biologie, 2005.

24. Asgharzadeh M, Kafil HS, Roudsary AA, Hanifi GR. Tuberculosis transmission in Northwest of Iran: using MIRU-VNTR, ETR-VNTR and IS6110-RFLP methods. Infect Genet Evol. 2011; 11(1):124-131.

25. Lu W, Lu B, Liu Q, Dong H, Shao Y, Jiang Y, et al. Genotypes of Mycobacterium tuberculosis isolates in rural China: using MIRU-VNTR and spoligotyping methods. Scand J Infect Dis. 2014;46(2):98-106.

26. Tazi L, El Baghdadi J, Lesjean S, Locht C, Supply P, Tibayrenc M, et al. Genetic diversity and population structure of Mycobacterium tuberculosis in Casablanca, a Moroccan city with high incidence of tuberculosis. J Clin Microbiol. 2004; 42(1): 461-466.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-03-29]