



مقایسه مدل ژنتیکی مایکروباکتریوم توبرکلوزیس بیجینگ با سایر سویه‌های مایکروباکتریوم MIRU-VNTR با استفاده از روش توبرکلوزیس

محدثه مظفری^{۱*}، پریسا فرنیا^۱، مهدی جعفریان^۱، محمد رضا رضوی دلیگانی^۲، مهدی کاظم پور^۱
محمد رضا مسجدی^۱، علی اکبر ولایتی^۱

^۱ مرکز تحقیقات مایکروباکتریولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

^۲ دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم

چکیده

زمینه: اخیراً نشان داده شده است که سوشهای مایکروباکتریوم توبرکلوزیس ژنوتایپ بیجینگ، رابطه مستقیمی با مقاومت دارویی دارند. بنابراین روشی ساده و سریع برای تشخیص و تمایز ایزولهای خانواده بیجینگ مورد نیاز می‌باشد. هدف از این مطالعه، ارزیابی قدرت تمایز لوکوس‌های مختلف دو روش MIRU-VNTR^{۱۵} و MIRU-VNTR¹² برای سویه‌های بیجینگ و مقایسه آن با سایر سویه‌های مایکروباکتریوم توبرکلوزیس می‌باشد.

مواد و روش‌ها: ابتدا ۱۰۵ سویه مایکروباکتریوم توبرکلوزیس با روش‌های اسپولیگوتایپینگ شناسایی شدند، سپس با روش‌های ۱۲ و ۱۵ لوکوس MIRU-VNTR مورد آنالیز ژنومی قرار گرفتند و تنوع آلی هر یک از لوکوس‌ها با استفاده از آزمون (HGI) HunterGaston Discriminatory Index محاسبه شد.

یافته‌ها: از ۱۰۵ سویه مایکروباکتریوم توبرکلوزیس با روش اسپولیگوتایپینگ، ۲۰ سویه بیجینگ شناسایی شد (۱۹/۰۵ درصد). بررسی با روش ۱۲ و ۱۵ لوکوس MIRU-VNTR در کل سویه‌ها نشان داد که ۱۱ لوکوس جزء لوکوس‌های بسیار افتراق‌دهنده بودند (HGI $\geq 0/۶$) که از بین آن‌ها لوکوس QUB26 بالاترین قدرت تمایز را داشت (۰/۸۴). تعداد تکرارها در لوکوس QUB11b برای سویه‌های بیجینگ اختصاصی بود. تنها لوکوس بسیار افتراق‌دهنده برای سویه‌های بیجینگ، MIRU16 بود. لوکوس‌های QUB26، MIRU26، MIRU23، MIRU27، MIRU39، Mtub21 و سایر لوکوس‌ها برای سویه‌های بیجینگ قدرت تمایز ضعیفی داشتند ($<0/۴$). (HGI $<0/۶$) و سایر لوکوس‌ها برای سویه‌های بیجینگ قدرت تمایز ضعیفی داشتند ($<0/۴$). (HGI $<0/۴$)

نتیجه‌گیری: روش ۱۲ و ۱۵ لوکوس MIRU-VNTR ساده و سریع هستند و برای تمایز سویه‌های بیجینگ از سایر سویه‌های مایکروباکتریوم توبرکلوزیس مناسب می‌باشند، اما برای تمایز بین سویه‌های مختلف بیجینگ مناسب نمی‌باشند و الگوهای به دست آمده تقریباً مشابهند. قدرت افتراق روش ۱۵ لوکوسی برای تمایز سویه‌های مایکروباکتریوم توبرکلوزیس بالاتر از روش ۱۲ لوکوسی بود.

وازگان کلیدی: MIRU-VNTR، مایکروباکتریوم توبرکلوزیس، ژنوتایپ بیجینگ، سل

دریافت مقاله: ۱۱/۳/۱۱ - ۸۹/۳/۳۰ - پذیرش مقاله: ۸۹/۵/۳۰

* تهران، انتهای نیاوران، دارآباد، بیمارستان مسیح دانشوری، مرکز تحقیقات مایکروباکتریولوژی

مقدمه

سویه‌های بیجینگ مقاوم به دارو در افغانستان شده است (۲-۵).

به علت نهفته بودن عفونت مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، روش‌های اپیدمیولوژی کلاسیک نمی‌تواند شیوع بیماری را مشخص کند. انگشت‌نگاری DNA ایزوله‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس ابزار قدرتمندی برای مطالعه اپیدمیولوژی مولکولی سل است (۶). بنابراین امروزه از روش‌های مبتنی بر PCR مانند اسپولیگوتایپینگ و MIRU-VNTR برای تمایز گونه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس استفاده می‌شود. اسپولیگوتایپینگ بر اساس پلی‌مرفیسم لوکوس DR^۱ در ژنوم مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس (۳۶ جفت‌باز) که به یک یا دو توالی فاصله‌انداز غیرتکراری (۳۵ تا ۴۱ جفت‌باز) متصل است، می‌باشد (۷).

تعداد و توالی نوکلئوتیدی مناطق فاصله‌انداز در هر گونه اختصاصی و منحصر به فرد است. بررسی نقاط فاصله‌انداز در تکنیک اسپولیگوتایپینگ به واسطه پرایمرهای اختصاصی متصل به غشای نیتروسلولولزی صورت می‌گیرد. طرح هیبریداسیون نشان می‌دهد، کدام الگوی نقاط فاصله‌انداز در کدام سویه وجود دارد. این روش را اصطلاحاً اسپولیگوتایپینگ^۲ یا به عبارتی الگوبرداری نقاط فاصله‌انداز می‌گویند (۸).

در سال ۲۰۰۱ یک روش ژنتوتایپینگ بر اساس توالی‌های تکراری تصادفی VNTR^۳، با استفاده از واحدهای تکراری پراکنده مایکوباکتریایی

با وجود واکسیناسیون گسترده Mycobacterium bovis BCG ضدسل، بیماری سل همچنان یکی از عوامل اصلی کشنده در بین بیماری‌های عفونی محسوب می‌شود که سالانه حدود ۸ میلیون بیماری و ۲ تا ۳ میلیون مرگ را سبب می‌شود (۱).

یک گروه از سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، ژنوتایپ بیجینگ می‌باشد که در ارتباط با اپیدمی‌های مختلفی در سراسر دنیا در بین جوامع مختلف بوده است. ژنوتایپ بیجینگ اولین بار بین سال‌های ۱۹۹۲ تا ۱۹۹۴ با استفاده از روش IS6110-RFLP و اسپولیگوتایپینگ از سویه‌های به دست آمده از منطقه پکن چین شناسایی شد و علت نام‌گذاری این خانواده تحت عنوان "بیجینگ"، این است که بالاترین تراکم آن در منطقه پکن دیده شده است. برآورد شده که بیش از یک چهارم موارد سل در جهان به وسیله این ژنو تایپ ایجاد می‌شود. این سویه‌ها به علت ارتباط با مقاومت چند دارویی و همچنین توانایی تکثیر سریع داخل ماکروفاژهای انسان، توجهات زیادی را به خود معطوف ساخته‌اند.

انتشار جهانی این سویه‌ها برنامه‌های کنترل سل را در سراسر دنیا تهدید می‌کند. بنابراین روشی ساده و سریع برای تشخیص و تمایز ایزوله‌های خانواده بیجینگ در مناطقی که سل همه‌گیر است مورد نیاز می‌باشد.

در اکثر مطالعات انجام شده در ایران درصد بیشتری از سویه‌های بیجینگ، بیماران افغانی بودند. 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

^۱ Direct Repeat

^۲ Spacer Oligotyping

^۳ Variable Number of Tandem Repeats

(بیمارستان مسیح دانشوری) از نظر الگوی MIRU-VNTR بررسی شدند. جداسازی اولیه سویه‌های مایکروبکتریوم توبرکلوزیس با روش پتروف^۴ درصد و با استفاده از محیط Lowenstein Jensen (L.J) انجام شد و برای شناسایی سویه‌ها از تست‌های بیوشیمیایی، از قبیل تست‌های نیاسین، فعالیت کاتالاز، احیاء نیترات استفاده شد. حساسیت دارویی در برابر ایزونیازید (۰/۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، ریفارمپین (۰/۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، استرپتومایسین (۰/۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و اتامبوتول (۰/۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به روش تناسبی انجام شد و سویه‌ها به سه گروه حساس،^۵ Non-MDR و MDR^۶ تقسیم‌بندی شدند. استخراج Cetyl-Triethyl Ammonium Bromide DNA با استفاده از روش استاندارد CTAB (Ammonium Bromide) انجام شد (۱۱).

اسپولیگوتایپینگ: با استفاده از پرایمرهای DRa: 5' GTT TTT GGG TCT GAC GAC3' و DRb: 5' CCG AGA GGG GGA AAC3' اسپولیگوتایپینگ انجام شد (۱۲) و ژنوتایپ‌های مختلف مایکروبکتریوم توبرکلوزیس شناسایی شدند. الگوهای اسپولیگوتایپینگ با استفاده از سایت MIRU-VNTRplus^۷ بررسی شدند.

تایپینگ MIRU-VNTR: واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای مربوطه انجام شد (جدول ۱). برنامه PCR برای تمامی لوکوس‌های MIRU و Mtub و QUB به این صورت بود: ۹۴°C به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل (شامل ۹۴°C به مدت یک دقیقه، ۵۳–۶۷°C به مدت یک دقیقه و ۷۲°C به مدت یک دقیقه و سی ثانیه) و در نهایت ۷۲°C به مدت ۱۰

^۴ ابداع شد (۹). این روش بر مبنای PCR است و تعداد تکرارهای هر لوکوس، بر اساس اندازه محصول PCR محاسبه می‌گردد. MIRU-VNTR امروزه از سه روش ۱۲ لوکوس ۱۵ لوکوس MIRU-VNTR و ۲۴ لوکوس MIRU-VNTR به طور گستردگی استفاده می‌شود. در روش ۱۲ لوکوسی، لوکوس‌هایی که بررسی می‌شوند عبارتند از MIRU4، MIRU2، MIRU23، MIRU20، MIRU16، MIRU10، MIRU31، MIRU27، MIRU26، MIRU24 Supply و MIRU40 MIRU39 در سال ۲۰۰۶. و همکاران مجموعه بزرگتری از ۲۴ لوکوس MIRU-VNTR با زیر مجموعه‌ای از ۱۵ لوکوس بسیار افتراق‌دهنده پیشنهاد کردند. این ۱۵ لوکوس ۹ حاوی عدد از ۱۲ لوکوس سابق به اضافه ۹ لوکوس جدید (شامل Mtub، QUB، ETR) است. لوکوس‌های VNTR اضافه در هر دو روش ۱۵ و ۲۴ لوکوسی، باعث افزایش قدرت تمایز نسبت به روش ۱۲ لوکوسی شده‌اند (۱۰). به دلیل اهمیت سویه‌های بیجینگ و رابطه آن‌ها با مقاومت دارویی، در این مطالعه قدرت مجموعه لوکوس‌های روش ۱۵ لوکوس MIRU-VNTR و ۱۲ لوکوس MIRU-VNTR در تمایز سویه‌های بیجینگ و دیگر سویه‌های مایکروبکتریوم توبرکلوزیس بررسی شده است.

مواد و روش کار

سویه‌ها: ۱۰۵ سویه مایکروبکتریوم توبرکلوزیس جدا شده از بیماران سل ریوی در مرکز تحقیقات مایکروبکتریولوژی، آزمایشگاه رفرانس سل کشوری

^۵ Multi-Drug Resistance

^۶ www.miru-vntrplus.org

^۷ Mycobacterial Interspersed Repetitive Units

به صورت کد ۱۵ رقمی است و ترتیب آن براساس شماره لوکوس VNTR به این ترتیب بیان می‌شود (از ETRC(۵۷۷) M_{tub}۰۴(۴۲۴) راست به چپ) M_{tub}۰۴(۴۲۴) M_{IRU}۱۰(۹۵۹) M_{IRU}۴۰(۸۰۲) M_{IRU}۴(۵۸۰) M_{tub}۲۱(۱۹۵۵) M_{IRU}۱۶(۱۶۴۴) ETRA(۲۱۶۵) QUB۱۱b(۲۱۶۳) M_{IRU}۲۶(۲۹۹۵) M_{tub}۳۰(۲۴۰۱) M_{tub}۳۹(۳۶۹۰) M_{IRU}۳۱(۳۱۹۲) QUB۴۱۵۶(۴۱۵۶) QUB۲۶(۴۰۵۲) برای مثال پروفایل آللی ۱۵ لوکوس MIRU-VNTR برای سویه استاندارد H37Rv به این صورت است:

دقیقه. برای لوکوس‌های ETRA و ETRC برنامه PCR به این صورت بود: ۹۴°C به مدت ۵ دقیقه، ۶۵°C ۳۰ سیکل (شامل ۹۴°C به مدت سی ثانیه، C ۷۲°C به مدت چهل ثانیه) و در نهایت برای ETRA و یا ۵۹/۵°C برای ETRC به مدت سی ثانیه، ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه. محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شدند.

MIRU-VNTR

تعیین پروفایل آللی با استفاده از روش استاندارد، تعداد توالی‌های تکرار شونده برای هر سویه از طریق اندازه‌گیری محصولات PCR بر روی ژل مشخص شد. در روش ۱۵ لوکوس MIRU-VNTR تعداد تکرارها برای هر لوکوس

M _{tub} 04	ETRC	M _{IRU} 4	M _{IRU} 40	M _{IRU} 10	M _{IRU} 16	M _{tub} 21	QUB 11b	ETRA	M _{tub} 30	M _{IRU} 26	M _{IRU} 31	M _{tub} 39	QUB 26	QUB 4156
VNTR 4156	VNTR 4052	VNTR 3690	VNTR 3192	VNTR 2995	VNTR 2401	VNTR 2165	VNTR 2163b	VNTR 1955	VNTR 1644	VNTR 959	VNTR 802	VNTR 580	VNTR 577	VNTR 424
۲	۵	۵	۳	۳	۲	۳	۵	۲	۲	۳	۱	۲	۴	۲

است. پروفایل آللی ۱۲ لوکوس MIRU-VNTR برای سویه استاندارد H37Rv به این صورت است:

در روش ۱۲ لوکوس MIRU-VNTR تعداد تکرارها برای هر لوکوس به صورت کد ۱۲ رقمی

M _{IRU} 2	M _{IRU} 4	M _{IRU} 10	M _{IRU} 16	M _{IRU} 20	M _{IRU} 23	M _{IRU} 24	M _{IRU} 26	M _{IRU} 27	M _{IRU} 31	M _{IRU} 39	M _{IRU} 40
VNTR 154	VNTR 580	VNTR 959	VNTR 1644	VNTR 2059	VNTR 2531	VNTR 2387	VNTR 2996	VNTR 3006	VNTR 3192	VNTR 4348	VNTR 802
۲	۲	۳	۲	۲	۶	۱	۳	۳	۳	۲	۱

تعداد کل متفاوت سویه‌ها و n_j تعداد سویه‌های متعلق به تیپ $\sum j$ می‌باشد (۱۳). فرمول با استفاده از نرم‌افزار Direct Stats محاسبه شد. چنانچه $HGI \geq 0/6$ باشد، لوکوس مربوطه بسیار افتراق‌دهنده است، و اگر رابطه $0/6 < HGI \leq 0/4$ برقرار باشد، لوکوس مورد نظر افتراق‌دهنده متوسط و اگر $< 0/4$ HGI باشد لوکوس موردنظر افتراق‌دهنده ضعیفی است.

آنالیز آماری: آزمون HGI^۷ برای تنوع آللی هر یک از پرایمرها استفاده شد.

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

در این فرمول D شاخص عددی افتراق، N مجموع سویه‌های موجود در روش تایپینگ مورد استفاده، S

⁷ Hunter-Gaston discriminatory Index

جدول ۱) توالی پرایمرهای دو روشن ۱۲ لوکوس MIRU-VNTR و ۱۵ لوکوس MIRU-VNTR؛ تعداد و اندازه توالی‌های تکراری پشت سرهم در سویه استاندارد H37Rv مشخص شده‌اند

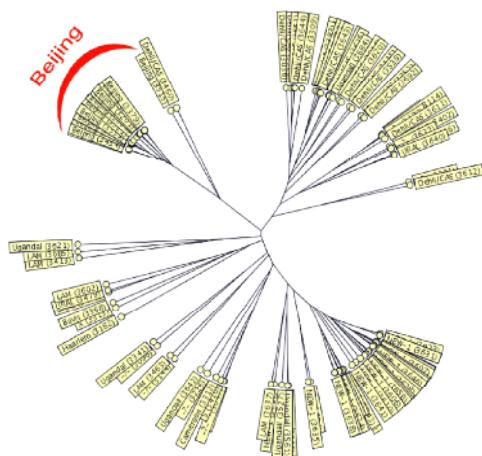
نام لوکوس (bp)	PCR Primer sequences (5'-3')	تعداد تکرارها و اندازه H37Rv	طول قطعه در سویه استاندارد H37Rv
MIRU2*(53 bp)	TGGACTTGCAGCAATGGACCAACT TACTCGGACGCCGGCTAAAA	۲(۵۳)	۵۰۸
MIRU20(77 bp)	TCGGAGAGATGCCCTTCGAGTTAG GGAGACCGCGACCAGGTACTTGA	۲(۷۷)	۵۹۱
MIRU23(53 bp)	CAGCGAAACGAACTGTGCTATCAC CGTGTCCGAGCAGAAAAGGGTAT	۶(۵۳)	۸۷۳
MIRU24(54 bp)	CGACCAAGATGTGCAGGAATACAT GGCGCAGTTGAGCTCACAGAA	۱(۵۴)	۴۴۷
MIRU27(53 bp)	TCGAAAGCCTCTCGCTGCCAGTAA GCCATGTGAGCGTGCCACTCAA	۳(۵۳)	۶۵۷
MIRU39(53 bp)	ACTGATTGGCTTCATACGGCTTTA GTGCCGACGTGGTCTTGAT	۲(۵۳)	۶۴۶
MIRU4*(77 bp)	GCGCGAGAGCCCCGAACTGC GCGCAGCAGAAACGTCAAC	۲(۷۷)	۳۲۹
MIRU26	CCCGCCTTCGAAACGTGCGT	۳(۵۱)	۶۱۴
MIRU40	TGGACATAGGCAGCCAGGGCAATA GGGTTGCTGGATGACAACGTGT	۱(۵۴)	۴۰۸
MIRU10	GGGTGATCTCGCGAAATCAGATA GTTCTTGACCAACTGCAGTCGTC	۳(۵۳)	۶۴۳
MIRU16	GCCACCTTGGTGTACAGTACACT TCGGTGTATCGGGTCCAGTCCAAGTA	۲(۵۳)	۶۷۱
MIRU31	CCCGTCTGCAGCCCTGGTAC GTGCCGACGTGGTCTTGAT	۳(۵۳)	۶۵۱
MIRU31	ACTGATTGGCTTCATACGGCTTTA	۳(۵۳)	۶۵۱
Mtub04*(51 bp)	GTCCAGGTTGCAAGAGATGG GGCATCCTCAACAACGGTAG	۲(۵۱)	۲۶۹
ETRC	GACTTCAATGCGITGGA	۴(۵۸)	۲۷۶
(58 bp)	GTCTTGACCTCCACGAGTGC	۳(۷۵)	۴۲۰
ETRA	TCGGTCCCACCTCTTCA	۲(۵۳)	۶۴۳
(75 bp)	ATTTCGATCGGGATGTTGAT	۲(۵۳)	۶۷۱
Mtub30	AGTCACTTCTACCACTCGAAC	۲(۵۸)	۳۱۹
(58 bp)	ATTAGTAGGGCACTAGCACCTCAAG	۲(۵۸)	۳۱۹
Mtub39	CGGTGGAGGCATGAACGTCTTC	۵(۵۸)	۵۵۰
(58 bp)	TAGAGCGCACGGGGAAAGCTTAG	۲(۵۹)	۶۸۰
Qub4156	TGACCACGGATTGCTCTAGT GCCGGCGTCCATGTT	۵(۶۹)	۴۱۲
(59 bp)	CGTAAGGGGGATGCGGGAAATAGG CGAAGTGAATGGTGCGAT	۲(۵۷)	۲۰۶
Qub11b	AGATCCCAGTTGTCGTCGTC	۲(۵۷)	۲۰۶
(69 bp)	CAACATCGCCTGGTTCTGTA	۲(۵۷)	۲۰۶
Mtub21	AACGCTCAGCTGTCGAT	۲(۵۷)	۲۰۶
(57 bp)	CGGCCGTGCCGGCAGGTCTCCCGAT	۵(۱۱)	۷۰۸

*بخش خاکستری تیره پرایمرهای روشن ۱۵ لوکوس، بخش سفید رنگ پرایمرهای روشن ۱۲ لوکوسی و بخش خاکستری روشن پرایمرهای مشترک هر دو روشن می‌باشد.

یافته‌ها

مقاومت آنتی‌بیوتیکی، ۳۹ سویه (۳۷/۱) درصد) حساس، ۳۶ سویه (۳۴/۳) درصد) MDR و ۳۰ سویه (۲۸/۶) درصد)، Non-MDR بودند.

بیماران از نظر اپیدمیولوژی کلاسیک شامل سن، جنس و مقاومت آنتی‌بیوتیکی بررسی شدند. از ۱۰۵ بیمار، ۷۶ نفر (۷۲/۴) مرد، و ۲۹ نفر (۲۷/۶) درصد) زن بودند و محدوده سنی بیماران ۹-۸۹ سال بود. از نظر



شکل ۱) رابطه تکاملی سویه‌ها با استفاده از روش

* Unweighted Pair Grouping Method (Radial-Tree) UPGMA*
using Arithmetic means

۱۰۵ سویه مایکروبکتریوم توبرکلوزیس با روش ۱۲ لوکوس MIRU-VNTR و ۱۵ لوکوس MIRU-VNTR بررسی شدند. به طور کلی قدرت تمایز روش ۱۵ لوکوسی برابر با ۰/۶۵ و قدرت تمایز روش ۱۲ لوکوسی برابر با ۰/۴۵ بود. لوکوس‌هایی که بسیار افتراق‌دهنده بودند ($HGI \geq 0/6$) عبارت بودند از: $(HGI=0/82)MIRU10$, $(HGI=0/84)QUB26$, $(HGI=0/89)MIRU16$, $(HGI=0/81)MIRU26$, $(HGI=0/85)Mtub04$, $(HGI=0/88)Mtub21$, $(HGI=0/65)Mtub39$, $(HGI=0/72)QUB4156$, $(HGI=0/68)MIRU31$, $(HGI=0/68)ETRA$, $(HGI=0/63)MIRU39$ که در این میان ۵ لوکوس MIRU39 در روش ۱۲ لوکوسی وجود دارند، و لوکوس MIRU39 در روش ۱۵ لوکوسی وجود ندارد. لوکوس‌هایی که افتراق‌دهنده متوسط بودند ($HGI \leq 0/6$) عبارت بودند از: $(HGI=0/54) MIRU40$, $(HGI=0/58) ETRC$, $MIRU23$, $(HGI=0/46)$, $(HGI=0/58) QUB11b$

تاپینگ مولکولی سوش‌های جدا شده با استفاده از اسپولیگوتاپینگ:

با روش اسپولیگوتاپینگ ۱۲ گونه مایکروبکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس شناسایی شدند که شامل: ۲۰/۹۵ Dehli/CAS ۲۳/۸ New-1 درصد، ۵/۷۱ UgandaII ۱۹/۰۴ Beijing درصد، ۲/۸۶ LAM درصد، ۱/۹ UgandaI درصد، ۰/۹۵ X Haarlem درصد، ۰/۹۵ Bovis Cameroon درصد، و باقی آن‌ها (۱۳/۳۷ درصد) ناشناخته بودند (جدول ۲).

جدول ۲) سویه‌های جداده با روش اسپولیگوتاپینگ

سویه‌های جداده	تعداد	درصد
New-1	۲۵	۲۳/۸
Dehli/CAS	۲۲	۲۱
Beijing	۲۰	۱۹/۰
UgandaII	۶	۵/۷
LAM	۵	۴/۷
URAL	۳	۲/۸۶
UgandaI	۳	۲/۸۶
S	۲	۱/۹
Haarlem	۲	۱/۹
X	۱	۰/۹۵
Cameroon	۱	۰/۹۵
Bovis	۱	۰/۹۵
Unknown	۱۴	۱۳/۳

۲۰ سویه بیجینگ با روش اسپولیگوتاپینگ شناسایی شدند (۱۹/۰۵ درصد). که ۱۴ سویه مربوط به بیماران مرد (۷۰ درصد) و ۶ سویه مربوط به بیماران زن (۳۰ درصد) بودند و محدوده سنی آن‌ها ۹-۶۴ سال بود. از نظر مقاومت آنتی‌بیوتیکی ۸ سویه (۴۰ درصد) حساس، ۷ سویه (۳۵ درصد) MDR و ۵ سویه (۲۵ درصد) Non-MDR بودند.

MIRU₁₆، تنها لوکوس بسیار افتراق دهنده بود (HGI=۰/۶۳) (جدول ۴)، که این لوکوس در هر دو روش ۱۲ لوکوسی و ۱۵ لوکوسی وجود دارد. در نمونه های بیجینگ پایین ترین پروفایل عددی برای این لوکوس ۲ و بالاترین پروفایل عددی آن ۴ بود.

لوکوس MIRU₂₇ که برای کل نمونه ها جزء ضعیف ترین لوکوس های افتراق دهنده بودند، برای سویه های بیجینگ جز لوکوس افتراق دهنده متوسط ($HGI < 0/4$) محسوب شد (شکل ۲ و ۳). اما لوکوس MIRU₁₀ که برای کل نمونه ها، دومین لوکوس بسیار افتراق دهنده بود (شکل ۴ و ۵)، در مورد نمونه های بیجینگ، جزء لوکوس های افتراق دهنده ضعیف بود (HGI=۰/۱۴).

جدول ۴) شاخص HGI لوکوس های MIRU-VNTR برای نمونه های بیجینگ

HGI	Locus
۰/۰	MIRU02
۰/۳۲	MIRU20
۰/۴۴	MIRU23
۰/۰	MIRU24
۰/۴۷	MIRU27
۰/۵۳	MIRU39
۰/۱۴	*MIRU04
۰/۱۴	MIRU10
۰/۶۳	MIRU16
۰/۴۶	MIRU26
۰/۱۵	MIRU31
۰/۲۴	MIRU40
۰/۱۴	Mtub04
۰/۱۴	ETR-C
۰/۴۴	Mtub21
۰/۰	QUB11b
۰/۱۴	ETR-A
۰/۰	Mtub30
۰/۳۳	Mtub39
۰/۵۵	QUB26
۰/۱۵	QUB4156

*لوکوس های مشترک دو روش ۱۲ و ۱۵ لوکوسی با رنگ خاکستری نشان داده شده اند.

(HGI=۰/۴۸)، که دو لوکوس MIRU_{۲۳} و MIRU_{۴۰} در روش ۱۲ لوکوسی وجود دارند، و لوکوس MIRU_{۲۳} در روش ۱۵ لوکوسی وجود ندارد. لوکوس هایی که افتراق دهنده ضعیف بودند MIRU_۲ (HGI<۰/۴)، عبارت بودند از MIRU_{۲۰} (HGI=۰/۱)، MIRU_۴ (HGI=۰/۰۸) MIRU_{۲۷} (HGI=۰/۰۸)، MIRU_{۲۴} (HGI=۰/۲) MIRU (HGI=۰/۲۵). که در این بین، تنها لوکوس ۴ در روش ۱۵ لوکوسی وجود دارد. (جدول ۳)

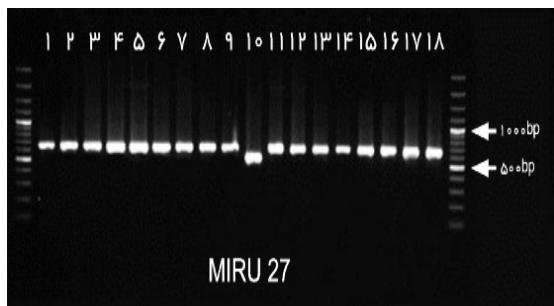
جدول ۳) شاخص HGI لوکوس های MIRU-VNTR برای کل نمونه ها

HGI	Locus	12 locus MIRU-VNTR
۰/۰۸	MIRU02	
۰/۲	MIRU20	
۰/۴۸	MIRU23	
۰/۰۸	MIRU24	
۰/۲۵	MIRU27	
۰/۶۳	MIRU39	
۰/۱	*MIRU04	
۰/۸۲	*MIRU10	
۰/۷۹	*MIRU16	
۰/۸۱	*MIRU26	
۰/۶۸	*MIRU31	
۰/۵۴	*MIRU40	
۰/۷۵	Mtub04	
۰/۵۸	ETR-C	
۰/۷۷	Mtub21	
۰/۵۸	QUB11b	
۰/۶۸	ETR-A	
۰/۴۶	Mtub30	
۰/۶۵	Mtub39	
۰/۸۴	QUB26	
۰/۷۲	QUB4156	

*لوکوس های مشترک دو روش ۱۲ و ۱۵ لوکوسی

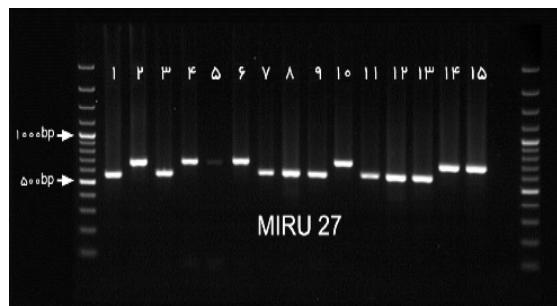
در مورد نمونه های بیجینگ، قدرت تمایز هر دو روش ۱۲ و ۱۵ لوکوسی پایین بود و اکثر لوکوس ها الگوی مشابهی در این سویه ها داشتند. تنوع آلی لوکوس های MIRU-VNTR از صفر تا ۰/۶۳ متفاوت بود.

جفت بازی بود و اندازه محصول PCR آن برابر با ۴۸۱ جفت باز بود (شکل ۶)، ولی این لوکوس در سایر سویه‌ها دارای یک، ۲، ۳ یا ۴ توالی تکراری پشت سرهم بود.

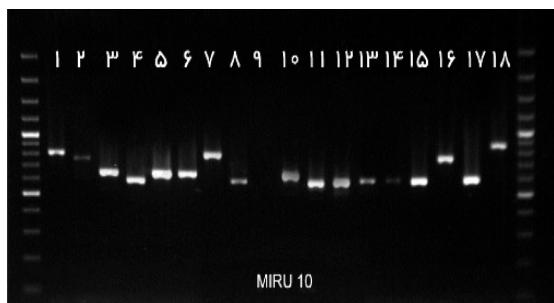


شکل ۳) محصولات PCR لوکوس MIRU27 برای سایر سویه‌ها

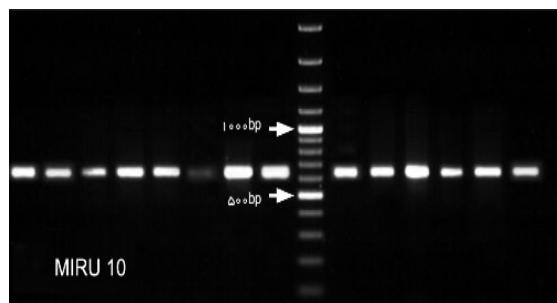
از ویژگی‌های دیگر سویه‌های بیجینگ که آن‌ها را از سایر سویه‌ها متمایز کرد، تعداد تکرارها در لوکوس QUB11b بود که در تمامی سویه‌های بیجینگ دارای ۶ توالی تکراری پشت سرهم ۶۹



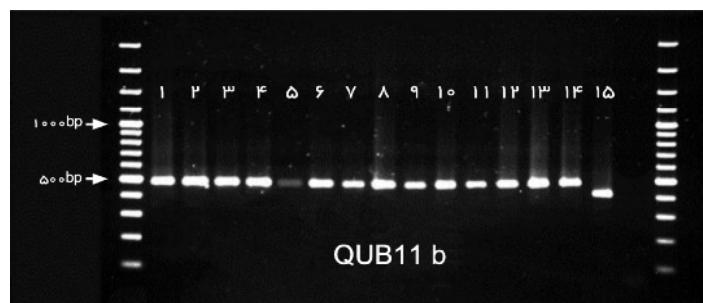
شکل ۲) محصولات PCR لوکوس MIRU27 برای سویه‌های بیجینگ،
شماره ۱۵ سویه H37Rv



شکل ۵) محصولات PCR لوکوس MIRU10 برای سایر سویه‌ها



شکل ۴) محصولات PCR لوکوس MIRU10 برای ۱۴ نمونه بیجینگ



شکل ۶) محصولات PCR لوکوس QUB11b برای سویه‌های بیجینگ ، شماره ۱۵ سویه H37Rv

نشان می‌دهند (۱۹). در مطالعه ما نیز از بین تمامی لوکوس‌ها، QUB_{۲۶} بالاترین قدرت افتراق را برای کل سویه دارا بود. لوکوس‌های MIRU_{۲۴} و MIRU_۲ برای کل نمونه‌ها پایین‌ترین قدرت تمایز را داشتند. HGI=۰/۰۸. ده لوکوس از ۱۱ لوکوسی که دارای قدرت افتراق دهنگی قوی بودند، در روش ۱۵ لوکوس MIRU-VNTR وجود داشتند و تنها یک لوکوس (MIRU_۴) از ۵ لوکوسی که دارای قدرت افتراق دهنگی ضعیف بودند، در روش ۱۵ لوکوس MIRU-VNTR وجود داشت. لوکوس‌های MIRU_{۲۷} که برای کل نمونه‌ها جزء ضعیفترین لوکوس‌های افتراق دهنده بود، برای سویه‌های بیجینگ جز لوکوس‌های افتراق دهنده متوسط MIRU_{۱۰} ($HGI \leq ۰/۶$) محسوب شد. لوکوس بسیار که برای کل نمونه‌ها، دومین لوکوس افتراق دهنده بود، در مورد نمونه‌های بیجینگ، جزء لوکوس‌های افتراق دهنده ضعیف بود.

تعداد تکرارها در لوکوس QUB_{۱۱b} برای سویه‌های بیجینگ، اختصاصی و برابر با ۶ کپی بود ولی این لوکوس در سایر سویه‌ها دارای یک الی ۴ توالی تکراری پشت سرهم بود (۲۰). اما مطالعات دیگری که روی تعداد زیادی از نمونه‌های به دست آمده از روسیه (n=۴۴)، آفریقای جنوبی (n=۳۸)، سنگاپور (n=۱۶۰)، بنگladش (n=۱۵) و سایر مناطق انجام شد، نشان داد که لوکوس MIRU_{۲۶} در ژنوتایپ بیجینگ پلی مرفیسم متوسطی دارد و می‌تواند دارای ۲ الی ۹ کپی باشد (۲۱). به علاوه، تعداد ۷ کپی در لوکوس MIRU_{۲۶} نه تنها در برخی از سویه‌های بیجینگ، بلکه در سایر سویه‌های

بحث

اخیراً سویه‌های بیجینگ به دلیل دارا بودن ویژگی‌های مهم پاتوژنیک مانند انتقال‌پذیری بالا، و رابطه با مقاومت دارویی، توجهات زیادی را به خود معطوف ساخته‌اند (۱۴). در مطالعه ما از ۱۰۵ سویه مایکروبکتریوم توبرکلوزیس با روش اسپولیگوتایپینگ، ۲۰ سویه بیجینگ شناسایی شد (۱۹/۰۴). در همین زمینه، مطالعه‌ای توسط ولایتی و همکاران بر روی ۱۷۴۲ سویه مایکروبکتریوم توبرکلوزیس جدا شده از بیماران ایرانی و افغانی انجام شد، با روش اسپولیگوتایپینگ مشخص شد که ۳/۲ درصد از سویه‌ها متعلق به ژنوتایپ بیجینگ بود که ۵۵/۴ درصد آن‌ها MDR بودند، و فراوانی این ژنوتایپ در بیماران افغانی بالاتر بود (۱۵). در مطالعه‌ای توسط فرینیا و همکاران انجام شد، از بین ۲۶۳ مورد ۲۰/۵ درصد سویه بیجینگ گزارش شد که ۷۶/۹ درصد آن‌ها از بیماران افغانی جدا شده بودند (۱۶).

در مطالعه دیگری از بین ۲۳۸ سویه مایکروبکتریوم توبرکلوزیس جدا شده از بیماران ایرانی و افغانی، ۵/۵ درصد آن‌ها به ژنوتایپ بیجینگ تعلق داشتند (۱۷). در مطالعات دیگر در شیراز (۱۸) فراوانی این ژنوتایپ ۱۰ درصد و در مشهد ۷/۱ درصد گزارش شد (۳) در مطالعه ما ۱۹/۰۵ درصد از سویه‌ها به ژنوتایپ بیجینگ تعلق داشتند که این حاکی از فراوانی این ژنوتایپ در کشور می‌باشد.

برای تمایز سویه‌های بیجینگ، لوکوس‌های VNTR از کارآمدی از VNTRها مانند برخی از لوکوس‌های QUB گزارش شده که تغییر‌پذیری بالایی از خود

با توجه به اینکه ژنتوتایپ بیجینگ با مقاومت دارویی در ارتباط است و سرعت انتشار آن در جمعیت بالاست و در افراد آلووده با این ژنتوتایپ، دوره کمون بیماری بسیار کوتاه است، شناسایی سریع ژنتوتایپ بیجینگ اهمیت زیادی دارد. لذا در مطالعات مختلف سعی شده که لوکوس‌های VNTR شاخصی برای تمایز کردن این ژنتوتایپ شناسایی شوند.

طبق نتایج بدست آمده از این مطالعه، برای شناسایی سریع سویه‌های بیجینگ از سایر سویه‌ها، ابتدا انجام PCR برای لوکوس QUB11b پیشنهاد می‌شود و به دنبال آن PCR لوکوس‌های MIRU^{۱۰} که برای سویه‌های بیجینگ الگوی تقریباً ثابتی داشت، اما برای سایر سویه‌ها بسیار متغیر بود، و لوکوس MIRU^{۲۷} که برای سویه‌های بیجینگ پلی‌مرفیسم متوسطی داشت اما در سایر سویه‌ها تقریباً دارای الگوی یکسانی بود.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از همکاری مرکز تحقیقات مایکوباتریولوژی، آزمایشگاه رفانس سل کشوری واقع در بیمارستان مسیح دانشوری جهت فراهم‌آوری منابع مالی و همچنین از پرسنل آزمایشگاه رفانس سل کشوری به خاطر کمک‌های آزمایشگاهی روتین تشکر و قدردانی می‌گردد.

References:

- Enarson DA, Chretien J. Epidemiology of respiratory infectious diseases. Curr Opin Pulm Med 1999; 5: 128-35.
- Kremer K, Glynn JR, Lillebaek T, et al. Definition of the Beijing/W Lineage of Mycobacterium tuberculosis on the Basis of Genetic Markers. J Clin Microbiol 2004; 42: 4040-9.
- Rohani M, Farnia P, Naderi Nasab M, et al. Beijing genotype and Other predominant Mycobacterium tuberculosis spoligotypes observed in Mashhad city, Iran. Indian J Med

مایکوباتریوم توبرکلوزیس هم دیده شد. در مطالعه ما لوکوس MIRU^{۲۶} در سویه بیجینگ، قدرت تمایز متوسطی داشت ($HGI=۰/۴۶$)، و تعداد تکرارها در این لوکوس برابر با ۵، ۷ یا ۸ بود.

در مطالعه‌ای که توسط تاج‌الدین و همکاران در مورد سویه‌های بیجینگ انجام شد، تنوع آللی ۹ لوکوس VNTR بررسی شد و QUB^{۳۲۳۲} به عنوان لوکوس بسیار افتراق‌دهنده شناسایی شد. تنوع آللی لوکوس‌ها از صفر تا ۰/۷۴ متغیر بود (۶).

در مطالعه ما، لوکوس MIRU^{۱۶} برای سویه‌های بیجینگ بالاترین قدرت تمایز را داشت ($HGI=۰/۶۳$) و تنوع آللی برای سویه‌های بیجینگ از صفر تا ۰/۶۳ متغیر بود.

در مطالعه دیگری در چین صورت گرفت، پس از جداسازی ۷۲ سویه بیجینگ به روش اسپولیگوتایپینگ، آنالیز به روش ۱۲ لوکوس MIRU-VNTR و ۱۵ لوکوس MIRU-VNTR انجام شد و مشخص شد که سیستم‌های ۱۵ و ۲۴ لوکوسی نسبت به روش ۱۲ لوکوسی سویه‌های بیجینگ را با قدرت بالاتری تمایز می‌دهند (۵). در مطالعه ما هم قدرت افتراق روش ۱۵ لوکوسی برای تمایز سویه‌های مایکوباتریوم توبرکلوزیس بالاتر از روش ۱۲ لوکوسی بود. اما هر دو روش ۱۲ و ۱۵ لوکوسی برای تمایز سویه‌های بیجینگ از یکدیگر قدرت پایینی داشتند و بیشتر لوکوس‌ها دارای الگوهای یکسانی بودند.

- Microbiol 2009; 27: 306-10.
- 4.Chin PJ, Chiu CC, Jou R. Identification of Beijing Lineage *Mycobacterium tuberculosis* with combined Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit Loci 26, 31 and ETR-A. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 1022-3.
 - 5.Jiao W, Mokrousov I, Sun GZ, et al. Evaluation of New Variable-Number Tandem-Repeat System for Typing *Mycobacterium tuberculosis* with Beijing Genotype Isolates From Beijing, China. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 1045-9.
 - 6.Ahmadi M, Farnia P, Tajedin E, et al. *Mycobacterium tuberculosis* Complex identification with spoligotyping method in patients attending to Masih Daneshvari hospital. *Sci Journal Zanjan Univ Med Sci* 2009; 67: 23-32.
 - 7.Han H, Wang F, Xiao Y, et al. Utility of mycobacterial interspersed repetitive unit typing for differentiating *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Wuhan, China. *JMM* 2007; 56: 1219-23.
 - 8.Amirmozafari N, Ramezanzadeh R, Farnia P, et al. The frequency of Beijing genotype of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from tuberculosis patients. *J Iran Uni Med Sci* 2005; 13: 7-16.
 - 9.Supply P, Lesjean S, Savine E, et al. Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on Mycobacterial interspersed repetitive units. *J clin Microbiol* 2001; 39: 3563-71.
 - 10.Supply P, Allix C, Lesjean S, et al. Proposal for standardization of optimized Mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 4498-510.
 - 11.Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 907-14.
 - 12.Farnia P, Mohammadi F, Masjedi MR, et al. Evaluation of Tuberculosis transmission in Tehran: using RFLP and spoligotyping methods. *J Infect* 2004; 49: 94-101.
 - 13.Hunter PR, Gaston MA. Numerical Index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 2465-6.
 - 14.Mokrousov I, Narvskaya O, Vyazovaya A, et al. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing Genotype in Russia: in Search of Informative Variable-Number Tandem-Repeat Loci. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 3276-584.
 - 15.Velayati AA, Farnia P, Mirsaedi M, et al. The most prevalent *Mycobacterium tuberculosis* superfamilies among Iranian and afghan TB cases. *Scand J Infect Dis* 2006; 38: 463-8.
 - 16.Farnia P, Masjedi MR, Mirsaedi M, et al. Prevalence of Haarlem I and Beijing types of *Mycobacterium tuberculosis* Strains in Iranian and afghan MDR-TB Patients. *J Infect* 2006; 53: 331-6.
 - 17.Tajeddin E, Farnia p, Kargar M, et al. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype using three different molecular methods. *J Semnan Uni Med Sci* 2009; 1: 7-14.
 - 18.Doroudchi M, Kremer K, Basiri EA, et al. IS6110-RFLP and spoligotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Iran. *Scand J Infect Dis* 2000; 32: 663-8.
 - 19.Supply P, Warren RM, Banuls AL, et al. Linkage disequilibrium between minisatellite loci supports clonal evolution of *Mycobacterium tuberculosis* in a high tuberculosis incidence area. *Mol Microbiol* 2003; 47: 529-38.
 - 20.Rao KR, Ahmed N, Srinivas S, et al. Rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotypes on the basis of the Mycobacterial interspersed repetitive unit locus 26 signatures. *J clin microbial* 2006; 44: 274-7.
 - 21.Mokrousov I. *Mycobacterium Tuberculosis* Beijing Genotype And Mycobacterial Interspersed repetitive unit Typing. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 1614-5.

Original Article***Comparison of Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype with other Mycobacterium tuberculosis strains Using MIRU-VNTR method***

**M. Mozafari^{1,2*}, P. Farnia¹, M. Jafarian¹, MR. Razavi Deligani², M. Kazempour¹,
MR. Masjedi¹, AA. Velayati¹**

¹ Mycobacteriology research center (MRC), Shahid Beheshty University of Medical Sciences, Tehran, IRAN

² Islamic Azad University of Qom, Tehran, IRAN

(Received 1 Jun, 2010 Accepted 21 Aug, 2010)

Abstract

Background: Recently it is shown that Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype are associated with drug resistance. Thus a simple and rapid method is required for identification and differentiation of Beijing family isolates. Therefore the aim of this study is to evaluate discriminatory power of different loci in both 12 MIRU-VNTR and 15 MIRU-VNTR Methods for Beijing genotype.

Methods: In total 105 Mycobacterium tuberculosis strains were identified by spoligotyping, then genomic analysis was carried out by using 12 and 15 MIRU-VNTR methods. Allelic diversity for each locus was calculated using Hunter Gaston Discriminatory Index (HGI).

Results: With spoligotyping 20 out of 105 isolates (19.05%) belonged to the Beijing family. Investigating all strains with 12 and 15 MIRU-VNTR showed that 11 loci were highly discriminative ($HGI \geq 0.6$) and QUB26 had the highest discriminatory power ($HGI = 0.84$). Number of repeats in QUB11b was specific for Beijing genotype, and only MIRU16 was highly discriminator for this genotype. QUB26, Mtub21, MIRU39, MIRU27, MIRU23 and MIRU26 were moderately discriminator ($0.4 \leq HGI < 0.6$) and other loci were poorly discriminator for Beijing strains ($HGI < 0.4$).

Conclusion: 12 and 15 locus MIRU-VNTR are simple and rapid methods and suitable for differentiation of Beijing genotype from other MTB strains, however these two methods are not suitable for discriminating Beijing family among themselves. In overall discriminatory power of 15 locus MIRU-VNTR method was higher than 12 locus MIRU-VNTR.

Keywords: MIRU-VNTR, mycobacterium tuberculosis, Beijing genotype, tuberculosis

*Address for correspondence: Mycobacteriology research center (MRC), Shahid Beheshty University of Medical Sciences, Tehran, IRAN; E-mail: mohadeseh.mozafari@yahoo.com