فصلنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست-پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال پانزدهم، شماره ۱، صفحه ۱۲ – ۱ (بهار ۱۳۹۱)

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

محدثه مظفری[۱و۲*]، پریسا فرنیا[۱]، مهدی جعفریان[۱]، محمدرضا رضوی‌دلیگانی[۲]، مهدی کاظم‌پور[۱]،
محمدرضا مسجدی[۱]، علی‌اکبر ولایتی[۱]

[۱] مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
[۲] دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم

چکیده

زمینه: اخیراً نشان داده شده است که سوش‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس ژنوتایپ بیجینگ، رابطه مستقیمی با مقاومت دارویی دارند. بنابراین روشی ساده و سریع برای تشخیص و تمایز ایزوله‌های خانواده بیجینگ مورد نیاز می‌باشد. هدف از این مطالعه، ارزیابی قدرت تمایز لوکوس‌های مختلف دو روش MIRU-VNTR 15 و MIRU-VNTR 12 برای سویه‌های بیجینگ و مقایسه آن با سایر سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می‌باشد.

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

یافته‌ها: از ۱۰۵ سویه مایکوباکتریوم 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≥۰/۶) که از بین آن‌ها لوکوس QUB26 بالاترین قدرت تمایز را داشت (HGI=۰/۸۴). تعداد تکرارها در لوکوس QUB11b برای سویه‌های بیجینگ اختصاصی بود. تنها لوکوس بسیار افتراق‌دهنده برای سویه‌های بیجینگ، MIRU16 بود. لوکوس‌های QUB26، Mtub21، MIRU39، MIRU27، MIRU23 و MIRU26 جز لوکوس‌های افتراق‌دهنده متوسط (۰/۶>HGI≤۰/۴) و سایر لوکوس‌ها برای سویه‌های بیجینگ قدرت تمایز ضعیفی داشتند (HGI<۰/۴).

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

واژگان کلیدی: MIRU-VNTR، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، ژنوتایپ بیجینگ، سل

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

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

E-mail: mohadeseh.mozafari@yahoo.com

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-03-29]

مقدمه

با وجود واکسیناسیون گسترده Mycobacterium bovis BCG و داروهای 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 سوش‌های 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 به‌دست 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 به‌وسیله این ژنو تایپ ایجاد می‌شود. این سویه‌ها به‌علت 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 به‌علت مهاجرت افراد از اتحادیه شوروی سابق به اروپا از طریق مرز افغانستان باشد که منجر به انتشار و شیوع سویه‌های بیجینگ مقاوم به دارو در افغانستان شده است (۵-۲).

به‌علت 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[1] 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 به‌واسطه پرایمرهای اختصاصی متصل به غشای نیتروسلولوزی صورت می‌گیرد. طرح هیبریداسیون نشان می‌دهد، کدام الگوی نقاط فاصله‌انداز در کدام سویه وجود دارد. این روش را اصطلاحاً اسپولیگوتایپینگ[2] یا به‌عبارتی الگوبرداری نقاط فاصله‌انداز می‌گویند (۸).

در سال ۲۰۰۱ یک‌روش ژنوتایپینگ بر اساس توالی‌های تکراری تصادفی VNTR[3]، با استفاده از واحدهای تکراری پراکنده مایکوباکتریایی

[1] Direct Repeat
[2] Spacer Oligotyping
[3] Variable Number of Tandem Repeats

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-03-29]

(MIRU)[4] ابداع شد (۹). این روش بر مبنای PCR است و تعداد تکرارهای هر لوکوس، بر اساس اندازه محصول PCR محاسبه می‌گردد. امروزه از سه روش ۱۲ لوکوس MIRU-VNTR، ۱۵ لوکوس MIRU-VNTR و ۲۴ لوکوس MIRU-VNTR به‌طور گسترده‌ای استفاده می‌شود. در روش ۱۲ لوکوسی، لوکوس‌هایی که بررسی می‌شوند عبارتند از MIRU2، MIRU4، MIRU10، MIRU16، MIRU20، MIRU23، MIRU24، MIRU26، MIRU27، MIRU31، MIRU39 و MIRU40. در سال ۲۰۰۶، Supply و همکاران مجموعه بزرگتری از ۲۴ لوکوس MIRU-VNTR با زیر مجموعه‌ای از ۱۵ لوکوس بسیار افتراق‌دهنده پیشنهاد کردند. این ۱۵ لوکوس حاوی ۶ عدد از ۱۲ لوکوس سابق به‌اضافه 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 مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بررسی شده است.

مواد و روش‌کار

سویه‌ها: ۱۰۵ سویه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس جدا شده از بیماران سل ریوی در مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی، آزمایشگاه رفرانس سل کشوری (بیمارستان مسیح دانشوری) از نظر الگوی MIRU-VNTR بررسی شدند. جداسازی اولیه سویه‌های مایکوباکتریوم 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 (۰/۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، ریفامپین (۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، استرپتومایسین (۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و اتامبوتول (۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به‌روش تناسبی انجام شد و سویه‌ها به سه گروه حساس، MDR[5] و Non-MDR تقسیم‌بندی شدند. استخراج DNA با استفاده از روش استاندارد Cetyl-Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB) 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 مایکوباکتریوم توبرکلوزیس شناسایی شدند. الگوهای اسپولیگوتایپینگ با استفاده از سایت MIRU-VNTRplus[6] بررسی شدند.

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

[4] Mycobacterial Iinterspersed Repetitive Units

[5] Multi-Drug Resistance
[6] www.miru-vntrplus.org

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-03-29]

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

تعیین پروفایل آللی MIRU-VNTR:

با استفاده از روش استاندارد، تعداد توالی‌های تکرار شونده برای هر سویه از طریق اندازه‌گیری محصولات PCR برروی ژل مشخص شد. در روش ۱۵ لوکوس MIRU-VNTR، تعداد تکرارها برای هر لوکوس به‌صورت کد ۱۵ رقمی است و ترتیب آن براساس شماره لوکوس VNTR به‌این ترتیب بیان می‌شود (از راست به چپ) (۴۲۴)Mtub۰۴، (۵۷۷)ETRC، (۵۸۰)MIRU۴، (۸۰۲)MIRU۴۰، (۹۵۹)MIRU۱۰، (۱۶۴۴)MIRU۱۶، (۱۹۵۵)Mtub۲۱، (۲۱۶۳)QUB۱۱b، (۲۱۶۵)ETRA، (۲۴۰۱)Mtub۳۰، (۲۹۹۵)MIRU۲۶، (۳۱۹۲)MIRU۳۱، (۳۶۹۰)Mtub۳۹، (۴۰۵۲)QUB۲۶، (۴۱۵۶)QUB۴۱۵۶ برای مثال پروفایل آللی ۱۵ لوکوس MIRU-VNTR برای سویه استاندارد H37Rv به‌این‌صورت است:

Mtub 04	ETRC	MIRU 4	MIRU 40	MIRU 10	MIRU 16	Mtub 21	QUB 11b	ETRA	Mtub 30	MIRU 26	MIRU 31	Mtub 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	2	۴	۲

در روش ۱۲ لوکوس MIRU-VNTR، تعداد تکرارها برای هر لوکوس به‌صورت کد ۱۲ رقمی است. پروفایل آللی ۱۲ لوکوس MIRU-VNTR برای سویه استاندارد H37Rv به‌این‌صورت است:

MIRU2	MIRU4	MIRU10	MIRU16	MIRU20	MIRU23	MIRU24	MIRU26	MIRU27	MIRU31	MIRU39	MIRU40
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

آنالیز آماری: آزمون HGI [7] برای تنوع آللی هر یک از پرایمرها استفاده شد.

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

در این فرمول D شاخص عددی افتراق، N مجموع سویه‌های موجود در روش تایپینگ مورد استفاده، S تعداد کل متفاوت سویه‌ها و nj تعداد سویه‌های متعلق به تیپ j می‌باشد (۱۳). فرمول با استفاده از نرم‌افزار Direct Stats محاسبه شد. چنانچه HGI≥۰/۶ باشد، لوکوس مربوطه بسیار افتراق‌دهنده است، و اگر رابطه ۰/۶>HGI≥۰/۴ برقرار باشد، لوکوس مورد نظر افتراق‌دهنده متوسط و اگر HGI<۰/۴ باشد لوکوس موردنظر افتراق‌دهنده ضعیفی است.

[7] Hunter-Gaston discriminatory Index

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-03-29]

جدول ۱) توالی پرایمرهای دو روش۱۲ 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 تکرارها در H37Rv	طول قطعه در سویه استانداردH37Rv
MIRU2* (53 bp)	TGGACTTGCAGCAATGGACCAACT TACTCGGACGCCGGCTCAAAA	۲(۵۳)	۵۰۸
MIRU20 (77 bp)	TCGGAGAGATGCCCTTCGAGTTAG GGAGACCGCGACCAGGTACTTGTA	۲(۷۷)	۵۹۱
MIRU23 (53 bp)	CAGCGAAACGAACTGTGCTATCAC CGTGTCCGAGCAGAAAAGGGTAT	۶(۵۳)	۸۷۳
MIRU24 (54 bp)	CGACCAAGATGTGCAGGAATACAT GGGCGAGTTGAGCTCACAGAA	۱(۵۴)	۴۴۷
MIRU27 (53 bp)	TCGAAAGCCTCTGCGTGCCAGTAA GCCATGTGAGCGTGCCACTCAA	۳(۵۳)	۶۵۷
MIRU39 (53 bp)	ACTGATTGGCTTCATACGGCTTTA GTGCCGACGTGGTCTTGAT	۲(۵۳)	۶۴۶
MIRU4* (77 bp)	GCGCGAGAGCCCGAACTGC GCGCAGCAGAAACGTCAGC	۲(۷۷)	۳۲۹
MIRU26 (51 bp)	CCCGCCTTCGAAACGTCGCT TGGACATAGGCGACCAGGCGAATA	۳(۵۱)	۶۱۴
MIRU40 (54 bp)	GGGTTGCTGGATGACAACGTGT GGGTGATCTCGGCGAAATCAGATA	۱(۵۴)	۴۰۸
MIRU10 (53 bp)	GTTCTTGACCAACTGCAGTCGTCC GCCACCTTGGTGATCAGCTACCT	۳(۵۳)	۶۴۳
MIRU16 (53 bp)	TCGGTGATCGGGTCCAGTCCAAGTA CCCGTCTGCAGCCCTGGTAC	۲(۵۳)	۶۷۱
MIRU31 (53 bp)	GTGCCGACGTGGTCTTGAT ACTGATTGGCTTCATACGGCTTTA	۳(۵۳)	۶۵۱
Mtub04* (51 bp)	GTCCAGGTTGCAAGAGATGG GGCATCCTCAACAACGGTAG	۲(۵۱)	۲۶۹
ETRC (58 bp)	GACTTCAATGCGTTGGA GTCTTGACCTCCACGAGTGC	۴(۵۸)	۲۷۶
ETRA (75 bp)	TCGGTCCCATCACCTTCTTA ATTTCGATCGGGATGTTGAT	۳(۷۵)	۴۲۰
Mtub30 (58 bp)	AGTCACTTTCCTACCACTCGTAAC ATTAGTAGGGCACTAGCACCTCAAG	۲(۵۸)	۳۱۹
Mtub39 (58 bp)	CGGTGGAGGCGATGAACGTCTTC TAGAGCGGCACGGGGGAAAGCTTAG	۵(۵۸)	۵۵۰
Qub4156 (59 bp)	TGACCACGGATTGCTCTAGT GCCGGCGTCCATGTT	۲(۵۹)	۶۸۰
Qub11b (69 bp)	CGTAAGGGGGATGCGGGAAATAGG CGAAGTGAATGGTGGCAT	۵(۶۹)	۴۱۲
Mtub21 (57 bp)	AGATCCCAGTTGTCGTCGTC CAACATCGCCTGGTTCTGTA	۲(۵۷)	۲۰۶
Qub26 (111 bp)	AACGCTCAGCTGTCGAT CGGCCGTGCCGGCCAGGTCCTTCCCGAT	۵(۱۱۱)	۷۰۸

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

یافته‌ها

بیماران از نظر اپیدمیولوژی کلاسیک شامل سن، جنس و مقاوت آنتی‌بیوتیکی بررسی شدند. از ۱۰۵ بیمار، ۷۶ نفر (۷۲/۴ درصد) مرد، و ۲۹ نفر (۲۷/۶ درصد) زن بودند و محدوده سنی بیماران ۸۹-۹ سال بود. از نظر مقاومت آنتی‌بیوتیکی، ۳۹ سویه (۳۷/۱ درصد) حساس، ۳۶ سویه (۳۴/۳ درصد) MDR و ۳۰ سویه (۲۸/۶ درصد)، Non-MDR بودند.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-03-29]

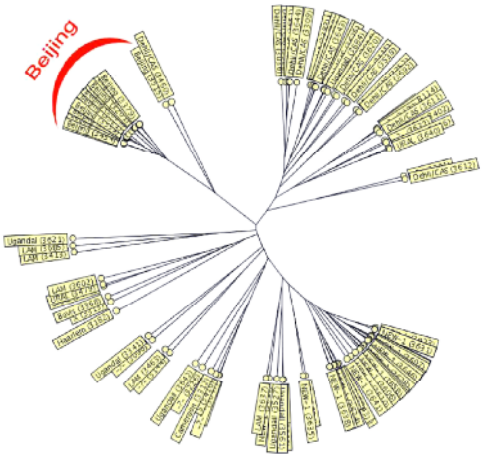
تایپینگ مولکولی سوش‌های جدا شده با استفاده از اسپولیگوتایپینگ:

با روش اسپولیگوتایپینگ ۱۲ گونه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس شناسایی شدند که شامل: New-1 (۲۳/۸ درصد)، Dehli/CAS (۲۰/۹۵ درصد)، Beijing (۱۹/۰۴ درصد)، UgandaII (۵/۷۱ درصد)، LAM (۴/۷۶ درصد)، URAL (۲/۸۶ درصد)، UgandaI (۲/۸۶ درصد)، S (۱/۹ درصد)، Haarlem (۱/۹ درصد)، X (۰/۹۵ درصد)، Cameroon (۰/۹۵ درصد)، Bovis (۰/۹۵ درصد) می‌باشند. و باقی آن‌ها (۱۳/۳۷ درصد) ناشناخته بودند (جدول۲).

جدول ۲) سویه‌های جداشده با روش اسپولیگوتایپینگ

سویه‌های جداشده	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 اسپولیگوتایپینگ 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 ۶۴-۹ سال بود. از نظر مقاومت آنتی‌بیوتیکی ۸ سویه (۴۰ درصد) حساس، ۷ سویه (۳۵ درصد) MDR و ۵ سویه (۲۵ درصد) Non-MDR بودند.



شکل۱) رابطه تکاملی سویه‌ها با استفاده از روش
* Unweighted Pair Grouping Method (Radial-Tree) UPGMA* using Arithmetic means

۱۰۵ سویه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با روش ۱۲ لوکوس MIRU-VNTR و ۱۵ لوکوس MIRU-VNTR بررسی شدند. به‌طور 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≥۰/۶) عبارت بودند از: QUB۲۶ (HGI=۰/۸۴)، MIRU۱۰ (HGI=۰/۸۲)، MIRU۲۶ (HGI=۰/۸۱)، MIRU۱۶ (HGI=۰/۷۹)، Mtub۲۱ (HGI=۰/۷۷)، Mtub۰۴ (HGI=۰/۷۵)، QUB۴۱۵۶ (HGI=۰/۷۲)، Mtub۳۹ (HGI=۰/۶۵)، ETRA (HGI=۰/۶۸)، MIRU۳۱ (HGI=۰/۶۸)، MIRU۳۹ (HGI=۰/۶۳) که در این میان ۵ لوکوس MIRU۱۰، MIRU۱۶، MIRU۲۶، MIRU۳۱ و MIRU۳۹ در روش ۱۲ لوکوسی وجود دارند، و لوکوس MIRU۳۹ در روش ۱۵ لوکوسی وجود ندارد. لوکوس‌هایی که افتراق‌دهنده متوسط بودند (۰/۶HGI≤۰/۴)، عبارت بودند از ETRC (HGI=۰/۵۸)، MIRU۴۰ (HGI=۰/۵۴)، QUB۱۱b (HGI=۰/۵۸)، MIRU۲۳ (HGI=۰/۴۶)،

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-03-29]

(HGI=۰/۴۸)، که دو لوکوس MIRU۲۳ و MIRU۴۰ در روش ۱۲ لوکوسی وجود دارند، و لوکوسMIRU۲۳ در روش ۱۵ لوکوسی وجود ندارد.

لوکوس‌هایی که افتراق‌دهنده ضعیف بودند (HGI<۰/۴)، عبارت بودند از MIRU۲ (HGI=۰/۰۸)، MIRU۴ (HGI=۰/۱)، MIRU۲۰ (HGI=۰/۲)، MIRU۲۴، (HGI=۰/۰۸)، MIRU۲۷ (HGI=۰/۲۵). که در این بین، تنها لوکوس۴ MIRU در روش ۱۵ لوکوسی وجود دارد. (جدول ۳)

جدول ۳) شاخص HGI لوکوس‌های MIRU-VNTR برای کل نمونه‌ها

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

*لوکوس‌های مشترک دو روش ۱۲ و ۱۵ لوکوسی

در مورد نمونه‌های بیجینگ، قدرت تمایز هر دو روش ۱۲ و ۱۵ لوکوسی پایین بود و اکثر لوکوس‌ها الگوی مشابهی در این سویه‌ها داشتند. تنوع آللی لوکوس‌های MIRU-VNTR از صفر تا ۰/۶۳ متفاوت بود.

MIRU۱۶، تنها لوکوس بسیار افتراق‌دهنده بود (HGI=۰/۶۳)(جدول ۴)، که این لوکوس در هر دو روش ۱۲ لوکوسی و ۱۵ لوکوسی وجود دارد. در نمونه‌های بیجینگ پایین‌ترین پروفایل عددی برای این لوکوس ۲ و بالاترین پروفایل عددی آن ۴ بود.

لوکوس MIRU۲۷ که برای کل نمونه‌ها جزء ضعیف‌ترین لوکوس‌های افتراق‌دهنده بودند، برای سویه‌های بیجینگ جز لوکوس افتراق‌دهنده متوسط (۰/۶≤HGI<۰/۴) محسوب شد (شکل ۲ و ۳). اما لوکوس MIRU۱۰ که برای کل نمونه‌ها، دومین لوکوس بسیار افتراق‌دهنده بود (شکل ۴ و ۵)، در مورد نمونه‌های بیجینگ، جزء لوکوس‌های افتراق‌دهنده ضعیف بود (HGI=۰/۱۴).

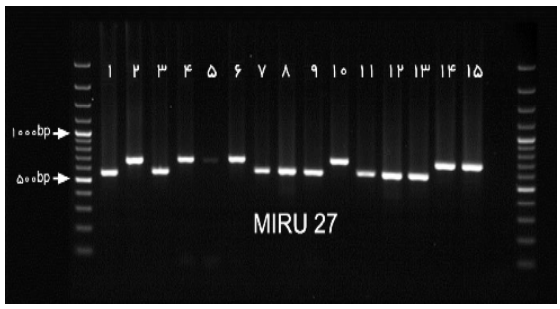
جدول ۴) شاخص HGI لوکوس‌های MIRU-VNTR برای نمونه‌های بیجینگ

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

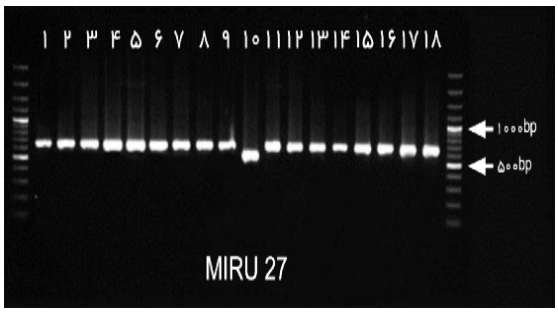
*لوکوس‌های مشترک دو روش ۱۲ و ۱۵ لوکوسی با رنگ خاکستری نشان داده شده اند

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-03-29]

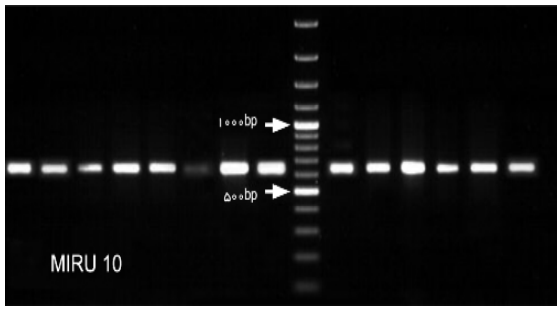
از ویژگی‌های دیگر سویه‌های بیجینگ که آن‌ها را از سایر سویه‌ها متمایز کرد، تعداد تکرارها در لوکوسQUB۱۱b بود که در تمامی سویه‌های بیجینگ دارای ۶ توالی تکراری پشت سرهم ۶۹ جفت‌بازی بود و اندازه محصول PCR آن برابر با ۴۸۱ جفت‌باز بود (شکل ۶)، ولی این لوکوس در سایر سویه‌ها دارای یک، ۲، ۳ یا ۴ توالی تکراری پشت سرهم بود.



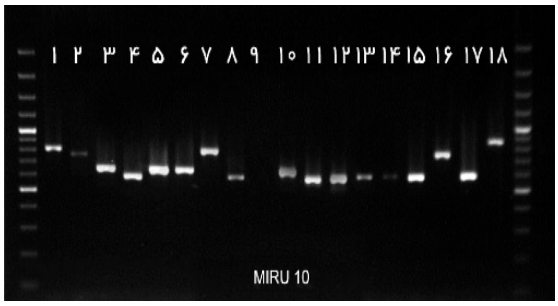
شکل ۲) محصولات PCR لوکوس MIRU27 برای سویه‌های بیجینگ، شماره ۱۵ سویه H37Rv



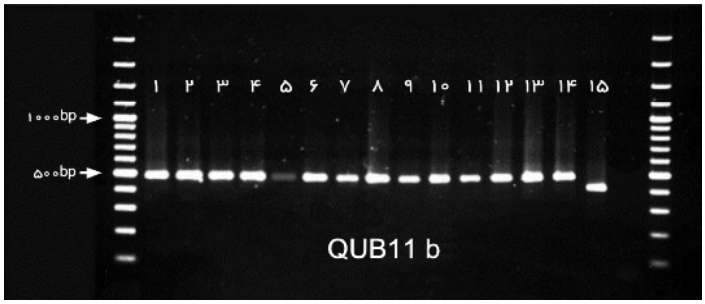
شکل۳) محصولات PCR لوکوس MIRU27 برای سایر سویه‌ها



شکل۴) محصولات PCR لوکوس MIRU10 برای ۱۴ نمونه بیجینگ



شکل۵) محصولات PCR لوکوس MIRU10 برای سایر سویه‌ها



شکل۶) محصولات PCR لوکوس QUB11b برای سویه‌های بیجینگ ، شماره ۱۵ سویه H37Rv

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-03-29]

بحث

اخیراً سویه‌های بیجینگ به‌دلیل دارا بودن ویژگی‌های مهم پاتوژنیک مانند انتقال‌پذیری بالا، و رابطه با مقاومت دارویی، توجهات زیادی را به‌خود معطوف ساخته‌اند (۱۴). در مطالعه ما از ۱۰۵ سویه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با روش اسپولیگوتایپینگ، ۲۰ سویه بیجینگ شناسایی شد (۱۹/۰۴ درصد). در همین زمینه، مطالعه‌ای توسط ولایتی و همکاران بر روی ۱۷۴۲ سویه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس جدا شده از بیماران ایرانی و افغانی انجام شد، با روش اسپولیگوتایپینگ مشخص شد که۳/۲ درصد از سویه‌ها متعلق به ژنوتایپ بیجینگ بود که۵۵/۴ درصد آن‌ها MDR بودند، و فراوانی این ژنوتایپ در بیماران افغانی بالاتر بود (۱۵). در مطالعه‌ای توسط فرنیا و همکاران انجام شد، از بین ۲۶۳ مورد MDR-TB، ۲۰/۵ درصد سویه بیجینگ گزارش شد که۷۶/۹ درصد آن‌ها از بیماران افغانی جدا شده بودند (۱۶).

در مطالعه دیگری از بین ۲۳۸ سویه مایکوباکتریوم 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 کارآمدی از VNTRها مانند برخی از لوکوس‌های QUB گزارش شده که تغییرپذیری بالایی از خود نشان می‌دهند (۱۹). در مطالعه ما نیز از بین تمامی لوکوس‌ها، QUB۲۶ بالاترین قدرت افتراق را برای کل سویه دارا بود. لوکوس‌های MIRU۲۴ و MIRU۲ برای کل نمونه‌ها پایین‌ترین قدرت تمایز را داشتند. (HGI=۰/۰۸). ده لوکوس از ۱۱ لوکوسی که دارای قدرت افتراق‌دهندگی قوی بودند، در روش ۱۵ لوکوس MIRU-VNTR وجود داشتند و تنها یک لوکوس (MIRU۴) از ۵ لوکوسی که دارای قدرت افتراق‌دهندگی ضعیف بودند، در روش ۱۵ لوکوس MIRU-VNTR وجود داشت. لوکوس‌های MIRU۲۷ که برای کل نمونه‌ها جزء ضعیف‌ترین لوکوس‌های افتراق‌دهنده بود، برای سویه‌های بیجینگ جز لوکوس‌های افتراق‌دهنده متوسط (۰/۶≤HGI<۰/۴) محسوب شد. لوکوس MIRU۱۰ که برای کل نمونه‌ها، دومین لوکوس بسیار افتراق‌دهنده بود، در مورد نمونه‌های بیجینگ، جزء لوکوس‌های افتراق‌دهنده ضعیف بود.

تعداد تکرارها در لوکوس QUB۱۱b 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 به‌دست آمده از روسیه (n=۴۴)، آفریقای جنوبی (n=۳۸)، سنگاپور (n=۱۶۰)، بنگلادش (n=۱۵) و سایر مناطق انجام شد، نشان داد که لوکوس MIRU۲۶ در ژنوتایپ بیجینگ پلی‌مرفیسم متوسطی دارد و می‌تواند دارای ۲ الی ۹ کپی باشد (۲۱). به‌علاوه، تعداد ۷ کپی در لوکوس MIRU۲۶ نه تنها در برخی از سویه‌های بیجینگ، بلکه در سایر سویه‌های

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-03-29]

مایکوباکتریوم توبرکلوزیس هم دیده شد. در مطالعه ما لوکوس MIRU۲۶ 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 وQUB۳۲۳۲ به‌عنوان لوکوس بسیار افتراق‌دهنده شناسایی شد. تنوع آللی لوکوس‌ها از صفر تا ۰/۷۴ متغیر بود (۶).

در مطالعه ما، لوکوس MIRU۱۶ 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 به‌روش اسپولیگوتایپینگ، آنالیز به‌روش ۱۲ لوکوس MIRU-VNTR و ۱۵ لوکوس MIRU-VNTR انجام شد و مشخص شد که سیستم‌های ۱۵ و ۲۴ لوکوسی نسبت به‌روش ۱۲ لوکوسی سویه‌های بیجینگ را با قدرت بالاتری تمایز می‌دهند (۵). در مطالعه ما هم قدرت افتراق روش ۱۵ لوکوسی برای تمایز سویه‌های مایکوباکتریوم 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.

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

طبق نتایج به‌دست 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 MIRU۱۰ که برای سویه‌های بیجینگ الگوی تقریباً ثابتی داشت، اما برای سایر سویه‌ها بسیار متغیر بود، و لوکوس MIRU۲۷ که برای سویه‌های بیجینگ پلی‌مرفیسم متوسطی داشت اما در سایر سویه‌ها تقریباً دارای الگوی یکسانی بود.

تشکر و قدردانی

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

References:

1.Enarson DA, Chretien J. Epidemiology of respiratory infectious diseases. Curr Opin Pulm Med 1999; 5: 128-35.
2.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.
3.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

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-03-29]

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, Mirsaeidi 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 Mycobactrium 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.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-03-29]

Original Article

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

M. Mozafari [1, 2], P. Farnia [1], M. Jafarian [1], MR. Razavi Deligani [2], M. Kazempour [1], MR. Masjedi [1], AA. Velayati [1]*

[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≥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≤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

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-03-29]