

تعیین ساختار ژنتیکی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به روش MIRU-VNTR

مهدی احمدی^۱، دکتر کیوان تدین*^۲، دکتر نادر مصوری^۳، دکتر علی اصغر فرازی^۴، دکتر محمد ارجمندزادگان^۵
دکتر روح اله کشاورز^۶، رضا بنی هاشمی^۷، محمد سخاوتی^۸، داریوش حامدی^۹، مریم ارم آبادی^{۱۰}، دکتر منصوره جباری اصل^{۱۱}
دکتر رایناک قادری^{۱۲}، دکتر سیدداوود حسینی^{۱۳}، شجاعت دشتی پور^{۱۴}

۱- کارشناس ارشد واکسن، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، شعبه اراک. ۲- استادیار، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، کرج. ۳- دانشیار، گروه بیماری‌های عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی اراک. ۴- دانشیار، گروه میکروپ شناسی و ایمنی شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اراک. ۵- دامپزشک، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، کرج. ۶- کارشناس ارشد واکسن، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، کرج. ۷- کارشناس ارشد میکروپ‌شناسی، دانش‌آموخته مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، کرج. ۸- پزشک عمومی، مرکز بهداشت و کارشناس سل استان مرکزی، دانشگاه علوم پزشکی اراک. ۹- استادیار، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، اراک. ۱۰- کارشناس واکسن، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، کرج.

چکیده

زمینه و هدف: روش *MIRU-VNTR* به یکی از فراگیرترین روش‌های استاندارد شده ژنوتایپینگ مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس تبدیل شده است. این مطالعه به منظور تعیین ساختار ژنتیکی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به روش *MIRU-VNTR* و نیز تعیین نقش اعضای دیگر مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس در ایجاد بیماری سل انجام گردید.

روش بررسی: این مطالعه توصیفی روی ۵۳ جدایه حاصل از کشت باکتریایی نمونه‌های خلط و لاواژ معدی بیماران مشکوک به بیماری سل انجام شد. به منظور تعیین هویت جدایه‌ها در ابتدا از آزمون‌های *16S rRNA* و *Rv Typing* و در مرحله بعد از آزمون *RD typing* استفاده شد. سپس با به‌کارگیری ۱۲ لوکوس شناخته شده *MIRU-VNTR typing* ژنوتایپ جدایه‌ها مشخص گردید.

یافته‌ها: در مجموع ۴۴ تیپ ژنتیکی مورد شناسایی قرار گرفت. به طوری که ۱۳ جدایه در ۴ تیپ ژنتیکی به صورت مشترک یک ژنوتایپ را از خود نشان دادند و ۴۰ تیپ ژنتیکی هر کدام فقط توسط یک جدایه نمایش داده شدند. در مقایسه میان لوکوس‌های ۱۲ گانه *MIRU-VNTR* از نظر قدرت تفریق مشخص گردید *MIRU-26* با ۷ آلل قدرتمندترین توان افتراق میان جدایه‌ها را از خود نشان داده است. به طوری که *Simpson's diversity index* در این لوکوس عدد ۰/۷۶۷ بود. به جز یک جدایه با هویت مایکوباکتریوم بوویس، ۵۲ جدایه دیگر مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بودند. هیچ‌یک از نمونه‌ها به سایر اعضای مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس آلوده نبودند. همچنین آلودگی همزمان نمونه‌ها به بیش از دو سویه مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: اگرچه ۴۲ تیپ ژنتیکی *MIRU-VNTR* در میان ۵۳ جدایه تحت مطالعه شناسایی شد؛ اما دستکم در ۱۹ مورد تفاوت میان این تیپ‌ها، فقط در مورد یک لوکوس از ۱۲ لوکوس به‌کاررفته مشاهده گردید. بدین ترتیب در مجموع جمعیت ژنتیکی نسبتاً همگنی از جدایه‌ها مشاهده گردید. اگرچه شناسایی ۱۳ جدایه اپیدمیک در قالب ۴ تیپ ژنتیکی می‌تواند به عنوان نشانه انتقال بیماری در میان مبتلایان باشد؛ اما در مجموع انتقال بیماری در بیماران تحت بررسی چندان گسترده به نظر نمی‌رسد.

کلید واژه‌ها: مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس، مایکوباکتریوم بوویس، *MIRU-VNTR genotyping*، *Rv typing*، *RD typing*

* نویسنده مسؤول: دکتر کیوان تدین، پست الکترونیکی k.tadayon@rvsri.ac.ir

نشانی: کرج، حصارک، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، کدپستی ۳۱۹۷۶۱۹۷۵۱، تلفن ۰۲۶-۳۴۵۰۲۸۹۲
وصول مقاله: ۹۲/۲/۱۷، اصلاح نهایی: ۹۳/۵/۲۵، پذیرش مقاله: ۹۳/۵/۲۶

مقدمه

اعضای مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس ابداع شده‌اند که از جمله آنها می‌توان به الگوریتم‌های *Rv typing* (۶) و *RD typing* (۷) اشاره نمود. این روش‌ها امکان تعیین هویت سریع و دقیق اعضای کمپلکس را ظرف چند ساعت فراهم می‌نمایند. در اپیدمیولوژی سل، شناسایی هسته اولیه انتشار آلودگی یا

با معرفی روش‌های ژنتیک مولکولی و از جمله اسپولیگوتایپینگ تعداد اعضای شناخته شده مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس افزایش یافته است (۵-۱). با شناسایی تدریجی مناطق و مارکرهای ژنتیکی اختصاصی روش‌های وابسته به PCR برای افتراق میان

روش بررسی

این مطالعه توصیفی روی ۵۳ جدایه حاصل از کشت باکتریایی نمونه‌های خلط (۵۲ مورد) و و لاولاژ معدی (یک مورد) بیماران مشکوک به ابتلای سل مراجعه کننده به بیمارستان‌های وابسته به دانشگاه علوم پزشکی اراک از مهر ماه ۱۳۸۸ لغایت اسفند ماه ۱۳۸۹ انجام شد. نمونه‌ها در کلینیک گرفته شد و در اسرع وقت به آزمایشگاه میکروبی شناسی مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی شعبه اراک انتقال یافت.

پس از هضم و آلودگی زدایی نمونه‌ها به روش پتروف (۱۷)، یک میلی‌لیتر از مایع قسمت بالایی سوسپانسیون برداشته شد و به دو لوله فالکون محتوی محیط کشت لونشتاین-جانسون گلگیرینه و پیرووات دار تلقیح گردید. لوله‌های کشت به مدت ۸-۱۲ هفته در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد و به صورت روزانه در هفته نخست از نظر رشد باکتری و بروز آلودگی احتمالی و پس از آن به صورت هفتگی مورد بازرسی قرار گرفت.

برای استخراج ژنوم باکتری از روش معروف به جوشاندن استفاده شد. برای این کار ابتدا لوله‌های کشت دارای نشانه‌های رشد باسیل‌های اسیدفست برای انجام آزمون‌های مولکولی مرحله بعدی انتخاب شدند. به میزان یک لوپ از پرگنه‌های باکتری به یک میکروتیوب مجهز به واشر ضد نشت (O-ring) محتوی ۴۰۰ میکرولیتر بافر تجارتي TB-lysis انتقال داده شد. میکروتیوب‌ها با استفاده از وزنه فلزی مناسب در عمق حمام آب داغ با دمای ۹۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شدند تا باکتری غیرفعال گردد. میکروتیوب به مدت ۱۵ دقیقه در ۹۷۵۰ g سانتریفیوژ و مایع فوقانی محتوی ژنوم باکتری از فیلتر سرسرنگی ۰/۲ میکرولیتر عبور داده شد و تا زمان استفاده در یخچال با دمای ۸-۳ درجه سانتی‌گراد برای نگهداری کوتاه‌مدت (یک هفته) و در فریزر با دمای منفی ۱۸ درجه سانتی‌گراد برای نگهداری طولانی مدت قرار گرفت.

آزمون‌های PCR با استفاده از کیت تجارتي آمپلیکون محصول شرکت آمپلیکور دانمارک محتوی آنزیم تک پلی‌مراز، نوکلئوتیدهای چهارگانه، کلرید منیزیم و سایر املاح متعارف مورد نیاز برای PCR انجام شدند. پرایمرهای مورد مصرف توسط شرکت ماکروژن کره جنوبی ساخته شدند. از روش master mix برای تهیه و آماده‌سازی واکنش‌های PCR استفاده شد و اجزاء واکنش‌ها در تمام آزمون‌ها به گونه‌ای تنظیم گردید که حجم نهایی محتویات هر میکروتیوب برابر ۱۲ میکرولیتر باشد. پروتکل اجرا و اجزا سازنده آزمون‌های مورد استفاده در جدول یک آمده است. در مورد هر آزمون نمونه‌های کنترل مثبت (*Mycobacterium tuberculosis* و *Mycobacterium bovis* BCG P17143, H37Rv

index case و راه‌های انتشار و انتقال آلودگی از میزبان به محیط از اهمیت زیادی برخوردار است. روش‌های ژنتیکی که از آنها با عبارت سیستم‌های ژنوتایپینگ مولکولی یاد می‌شود؛ در چند دهه اخیر ارزش کاربردی غیرقابل انکاری را در درک بهتر از اپیدمیولوژی سل و همچنین کنترل آن از خود نشان داده‌اند (۸). در حال حاضر دو سیستم MIRU-VNTR typing و Spoligotyping به‌عنوان دو روش ژنوتایپینگ شناخته شده وابسته به PCR در اپیدمیولوژی سل مورد پذیرش جامعه علمی بین‌المللی قرار گرفته‌اند و به تدریج جایگزین سیستم تایپینگ RFLP-IS6110 شده‌اند. برخلاف روش اسپولیگو تایپینگ که از یک پروتکل استاندارد و واحد در اجرا برخوردار است (۹ و ۱۰)؛ به نظر می‌رسد اجرای سیستم MIRU-VNTR typing به‌خصوص از نظر تعداد لوکوس‌های ژنتیکی مورد استفاده در میان آزمایشگاه‌های مایکوباکتریولوژی از یکنواختی برخوردار نیست. به طوری که علی‌رغم روش استاندارد شده پیشنهادی توسط محققین انستیتو پاستور مبتنی بر استفاده از ۲۴ لوکوس (۱۱)، همچنان تعداد متفاوتی از این لوکوس‌ها در قالب مجموعه‌های ۱۲ عددی (۱۲)، ۱۵ عددی (۱۳)، ۲۴ عددی (۱۴ و ۱۵) و ۳۲ عددی (۱۶) در مطالعات مختلف به کار گرفته شده‌اند. بخشی از این تفاوت در تعداد لوکوس‌های مورد استفاده با در نظر گرفتن این مشاهده قابل توضیح است که قدرت تفریق انفرادی هر لوکوس مستقل، متناسب با خصوصیات ژنتیکی جمعیت مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس در هر منطقه از جهان می‌تواند در مقایسه با سایر مناطق جهان متفاوت باشد.

براساس گزارش واحد مدیریت و کنترل بیماری وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی ایران تعداد موارد سل اسمیر مثبت از ۱۰۰۹۹ مورد در سال ۱۳۸۸ به ۱۰۶۳۹ مورد در سال ۱۳۸۹ افزایش یافته و بیشترین میزان‌های بروز و شیوع آن نیز در استان‌های سیستان و بلوچستان، گلستان و خراسان رضوی مشاهده شده است. بر همین اساس تعداد و میزان بروز سل ریوی اسمیر مثبت در استان مرکزی در سال ۱۳۸۰ از ۷۲ مورد به ۸۷ مورد در سال ۱۳۸۸ رسیده است. از طرفی تعداد موارد عود بیماری سل اسمیر مثبت در سال ۱۳۸۰، ۴ مورد بوده که در سال ۱۳۸۸ به ۲ مورد کاهش پیدا کرده است. میزان موفقیت درمان بیماری در استان مرکزی در سال ۱۳۸۸ به میزان ۸۷/۷ درصد رسید که از میزان مورد انتظار سازمان بهداشت جهانی (۸۵ درصد) بالاتر بود (۱).

این مطالعه به منظور تعیین ساختار ژنتیکی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به روش MIRU-VNTR و نیز تعیین نقش اعضای دیگر مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس در ایجاد بیماری سل در استان مرکزی انجام گردید.

جدول ۱: فهرست پرایمرهای مورد استفاده (۶ و ۷ و ۱۸)

Typing system	Locus	Primer name	Nucleotide sequence (5' - 3')
Rv Typing	16S rRNA	16S rNAf	ACG GTG GGT ACT AGG TGT GGG TTT C
		16S rNAr	TCT GCG ATT ACT AGC GAC TCC GAC TTC A
	Rv1510	Rv1510f	GTG CGC TCC ACC CAA ATA GTT GC
		Rv1510r	TGT CGA CCT GGG GCA CAA ATC AGT C
	Rv1970	Rv1970f	GCG CAG CTG CCG GAT GTC AAC
		Rv1970r	CGC CGG CAG CCT CAC GAA ATG
	Rv3377/8	Rv3377/8f	CGA CGG GTC TGA CGG CCA AAC TCA TC
		Rv3377/8r	CTT GCT CGG TGG CCG GTT TTT CAG C
Rv3120	Rv3120f	GTC GGC GAT AGA CCA TGA GTC CGT CTC CAT	
	Rv3120r	GCG AAA AGT GGG CGG ATG CCA AGG TAG T	
Rv0577	Rv0577f	ATG CCC AAG AGA AGC GAA TAC AGG CAA	
	Rv0577r	CTA TTG CTG CGG TGC GGG CTT CAA	
IS1561	IS1561f	GCT GGG TGG GCC CTG GAA TAC GTG AAC TCT	
	IS1561r	AAC TGC TCA CCC TGG CCA CCA CCA TTG ACT	
RD Typing	RD1	RD1f	AAG CGG TTG CCG CCG ACC GAC C
		RD1inter	CTG GCT ATA TTC CTG GGC CCG G
		RD1r	GAG GCG ATC TGG CCG TTT GGG G
		RD1f	ATG TGC GAG CTG AGC GAT G
	RD4	RD4inter	TGT ACT ATG CTG ACC CAT GCG
		RD9r4	AAA GGA GCA CCA TCG TCC AC
		RD9f	CAA GTT GCC GTT TCG AGC C
	RD9	RD9inter	CAA TGT TTG TTG CCG TGC
		RD9r	GCT ACC CTC GAC CAA GTG TT
	RD12	RD12f	GGG AGC CCA GCA TTT ACC TC
		RD12inter	GTG TTG CGG GAA TTG CTC GG
	RD12r	AGC AGG AGC GGT TGG ATA TTC	
MIRU-VNTR Typing	ETR-A	ETR-Af	AAA TCG GTC CCA TCA CCT TCT TAT
		ETR-Ar	CGA AGC CTG GGG TGC CCG CGA TT
	ETR-B	ETR-Bf	GCG AAC ACC AGG ACA GCA TCA T
		ETR-Br	GGC ATG CCG GTG ATC GAG TGG
	ETR-C	ETR-Cf	GTG AGT CGC TGC AGA ACC TGC A
		ETR-Cr	GGC GTC TTG ACC TCC ACG AGT
	ETR-D	ETR-Df	CAG GTC ACA ACG AGA GGA AGA GC
		ETR-Dr	GCG GAT CGG CCA GCG ACT CCT
	ETR-E	ETR-Ef	CTT CGG CGT CGA AGA GAG CCT C
		ETR-Er	CGG AAC GCT GGT CAC CAC CTA A
	ETR-F	ETR-Ff	CTC GGT GAT GGT CCG GCC GGT CAC
		ETR-Fr	GGA AGT GCT CGA CAA CGC CAT GC
MIRU-10	MIRU-10f	GTT CTT GAC CAA CTG CAG TCG TCC	
	MIRU-10r	GCC ACC TTG GTG ATC AGC TAC CT	
MIRU-16	MIRU-16f	TCG GTG ATC GGG TCC AGT CCA AGT A	
	MIRU-16r	CCC GTC GTG CAG CCC TGG TAC (VIC)	
MIRU-26	MIRU-26f	TAG GTC TAC CGT CGA AAT CTG TGA C	
	MIRU-26r	CAT AGG CGA CCA GGC GAA TAG	
MIRU-39	MIRU-39f	CGC ATC GAC AAA CTG GAG CCA AAC	
	MIRU-39r	CGG AAA CGT CTA CGC CCC ACA CAT	
MIRU-40	MIRU-40f	GGG TTG CTG GAT GAC AAC GTGNT	
	MIRU-40r	GGG TGA TCT CGG CGA AAT CAG ATA	
QUB11b	QUB11bf	CGT AAG GGG GAT GCG GGA AAT AGG	
	QUB11r	C GA AGT GAA TGG TGG CAT	

الگوریتم Rv typing شامل شش آزمون مستقل Rv0577، Rv1510، Rv1970، Rv3877/8 و Rv3120 است. همه این آزمون‌ها براساس روش پیشنهادی هووارد (۶) و پس از اعمال تغییرات جزئی انجام شدند (جدول‌های ۳-۱).
الگوریتم RD typing مشتمل بر چهار آزمون RD1، RD4، ED9

AN5 (*Mycobacterium bovis*) و نمونه‌های کنترل منفی Double Distilled PCR water و PCR master mix with no DNA template) برحسب نیاز مورد استفاده قرار گرفت.
برای اجرای آزمون 16S rRNA از روش هووارد (۶) و با تغییرات اندک استفاده شد (جدول‌های ۳-۱).

جدول ۲: شرایط انجام آزمون‌های PCR

Locus	Initial Denaturation s/°C	Number of cycles	Denaturation s/°C	Annealing s/°C	Extension s/°C	Final Elongation s/°C
16S rRNA	300/94	35	60/94	60/60	60/72	600/72
IS1561, RV0577, RV1510, RV1970, RV3877/8, RV3120	300/94	35	60/94	60/60	60/72	600/72
RD1, RD4, RD9, RD12	420/95	40	45/94	45/65	45/72	420/72
ETR-A, ETR-B, ETR-C, ETR-D, ETR-E, ETR-F, MIRU-10, MIRU-16, MIRU-26, MIRU-39, MIRU-40	600/95	40	60/94	60/68	60/72	600/72
QUB-11b	600/95	30	60/94	60/65	60/72	600/72

جدول ۳: اجزاء سازنده واکنش‌ها در آزمون‌های PCR

PCR reaction	PCR master mix (µl)	Primer forward (µl)	Primer reverse (µl)	Primer intermediate (µl)	DNA template (µl)	DMSO (µl)	PCR water (µl)	Total volume (µl)
16S rRNA	6	0.4	0.4	0	2	0.4	2.8	12
IS1561, RV0577, RV1510, RV1970, RV3877/8, RV3120	6	0.4	0.4	0	2	0.4	2.8	12
RD1, RD4, RD9, RD12	6	1.25	1.25	1.25	2	0	0.25	12
ETR-A, ETR-B, ETR-C, ETR-D, ETR-E, ETR-F, MIRU-10, MIRU-16, MIRU-26, MIRU-39, MIRU-40, QUB-11b	6	0.3	0.3	0	2	0.4	3	12

با مراجعه به جدول‌های استاندارد مرجع هر روش (۱۹ و ۱۸) تعیین و برای هر جدایه ثبت گردید. ژنوتیپ MIRU-VNTR هر جدایه با توجه به تعداد مشخص شده تکرار واحدهای تکراری در هر لوکوس به صورت یک کد دوازده رقمی ثبت شد (جدول ۴). برای محاسبه قدرت تفریق ژنتیکی لوکوس‌های MIRU-VNTR از اندیکس سیمپسون (Simpson's index) و براساس فرمول زیر استفاده شد (۲۰).

$$\text{Simpson's index} = \frac{\sum n(n-1)}{N(N-1)}$$

n تعداد جدایه‌ها در مورد هر آلل و N تعداد کل جدایه‌ها است.

یافته‌ها

از مجموع ۵۳ بیمار مورد مطالعه، ۳ بیمار (دو زن ۳۵ ساله و ۲۰ ساله و یک مرد ۲۸ ساله) تبعه افغانستان بودند. تابعیت یک بیمار ثبت نشده بود (جدول ۴). ۲۴ بیمار مرد و ۲۶ بیمار زن بودند و جنسیت ۳ بیمار ثبت نشده بود.

میانه سنی مردان و زنان به ترتیب ۷۰ سال و ۷۱ سال تعیین شد (جدول ۴). در بین بیماران ایرانی مسن‌ترین فرد یک زن ۸۹ ساله و

و RD12 به روش ابداعی وارن (۷) و پس از تغییرات مناسب انجام شد (جدول‌های ۳-۱).

برای اجرای روش ژنوتایپینگ MIRU-VNTR از تلفیق پروتکل‌های پیشنهادی موجود (۱۹ و ۱۸) استفاده شد. در مجموع از ۱۲ لوکوس شامل ETR-A، ETR-B، ETR-C، ETR-D، ETR-E، ETR-F، MIRU-10، MIRU-16، MIRU-26، MIRU-39، MIRU-40 و QUB-11b استفاده شد (جدول‌های ۳-۱).

الکتروفورز و تصویربرداری محصولات PCR با استفاده از ژل ۱/۵ درصد آگارز مولکولار بیولوژی (Invitrogen®، USA) از پیش رنگ شده با اتیدیوم بروماید و در میدان الکتریکی به قدرت ۲ V/cm به مدت ۲ دوساعت انجام شد. سپس توسط دستگاه عکسبرداری ژل داک (BioRad®، USA) تصویربرداری صورت گرفت. تعیین اندازه محصولات PCR از طریق مقایسه آنها با باندهای DNA size marker استاندارد 100 bp (Invitrogen®، USA) مورد استفاده در ژل صورت پذیرفت.

نتایج الگوریتم RD typing، MIRU-VNTR و ژنوتایپینگ MIRU-VNTR با توجه به اندازه محصول حاصله در هر آزمون و

تفریق به میزان ۰/۷۶۷ در مورد لوکوس MIRU-26 و کمترین آن به میزان ۰/۰۷۴ در مورد لوکوس ETR-D تعیین گردید. در بررسی جمعیتی نتایج مربوط به لوکوس‌ها، در مجموع در میان ۵۳ جدایه ۴۴ تیپ ژنتیکی شناسایی گردید. به این ترتیب که ۴ تیپ خوشه‌ای (clustered) شامل ۱۳ جدایه و ۴۰ تیپ ژنتیکی انفرادی مشاهده شد (جدول ۴). فراوان‌ترین تیپ ژنتیکی از نظر اپیدمیولوژیکی به صورت مشترک در میان ۵ بیمار مشاهده گردید (جدول ۴). ضمن آن که در هیچ‌یک از بیماران بیش از یک جدایه مایکوباکتریوم و یا تیپ ژنتیکی مشاهده نگردید. از میان ۳ جدایه بیماران افغانی تیپ ژنتیکی یک جدایه (AR0536) کاملاً یکسان با ژنوتیپ جدایه (AR0125) مربوط به یک بیمار ایرانی شناسایی شد. دیگر جدایه‌های بیماران افغانی دستکم در یک (AR1682) و یا چهار لوکوس (AR1421) از لوکوس‌های ۱۲ گانه MIRU-VNTR با شبیه‌ترین جدایه‌های ایرانی به خود متفاوت بودند.

تنها جدایه گاوی شناسایی شده (AR0208) از یک مرد ایرانی ۶۵ ساله با سابقه فعالیت در زمینه دامداری جدا گردید و تیپ ژنتیکی آن کاملاً با جدایه‌های دیگر متفاوت بود (شکل یک و جدول ۴).

بحث

یافته‌های مطالعه حاضر مبتنی بر دخالت مایکوباکتریوم تویرکلوزیس و مایکوباکتریوم بوویس به‌عنوان تنها دو عضو مایکوباکتریوم تویرکلوزیس کمپلکس در بروز سل در استان مرکزی با نتایج دیگر محققین ایرانی (۵-۲) سازگار است. در شرایطی که در مقیاس جهانی مایکوباکتریوم آفریکانوم فراوان‌ترین عضو مایکوباکتریوم تویرکلوزیس کمپلکس پس از مایکوباکتریوم تویرکلوزیس در سل انسانی است. این پاتوژن به‌جز آفریقا در بسیاری از کشورهای آسیایی، اروپایی و قاره آمریکا گزارش شده است (۱۱-۶). با این حال حضور و فعالیت این پاتوژن در ایران تاکنون گزارش نگردیده است. عدم حضور مهاجرین آفریقایی تبار در ایران احتمالاً می‌تواند یکی از دلایل توضیح‌دهنده این مشاهده باشد. در حال حاضر به‌جز اسپولیگوتایپینگ که استفاده از آن علی‌رغم سرعت عمل و دقت زیاد به دلیل نیاز به ابزار مخصوص و ممبران تجارتي جزو روش‌های به نسبت گران‌قیمت محسوب می‌شود و انجام آن در اکثر مواقع تنها در آزمایشگاه‌های رفرانس امکان‌پذیر است؛ هیچ‌کدام از دیگر روش‌های متعارف موجود از نظر سادگی، سرعت، دقت و هزینه قابل مقایسه با دو الگوریتم RV typing و RD typing نیست.

یکی دیگر از ویژگی‌های الگوریتم RD typing توانایی منحصر به فرد آزمون RD1 در افتراق میان سویه غیربیماری‌زا (واکسینال) *M. bovis* BCG با سایر جدایه‌های بیماری‌زای مایکوباکتریوم بوویس

جوان‌ترین فرد یک زن ۲۳ ساله بود.

اطلاعات ثبت شده از شغل بیماران و نیز تماس احتمالی موثر در انتقال بیماری اندک بود. همچنین تعدادی از بیماران طی انجام مطالعه فوت نمودند و امکان پیگیری بعدی پرونده آنان مقدور نبود. در کشت باکتریایی در همه لوله‌های کشت با موفقیت و بدون بروز آلودگی ثانویه، رشد مشخصه مایکوباکتریایی از جمله پرگنه‌های شبیه گل کلم به رنگ کهربایی و محتوی باسیل‌های اسیدفست مشاهده گردید. رشد ترجیحی باکتری بر روی محیط لوشتاين - جانسون پیرووات‌دار فقط در مورد یک جدایه مشاهده شد.

PCR تمام ۵۳ جدایه در نتیجه آزمون 16S rRNA، محصولی را به طول ۵۴۳ زوج باز تولید نمود. بدین ترتیب هویت همه آنها به‌عنوان اعضای جنس مایکوباکتریوم تایید گردید (شکل یک).

پس از اجرای الگوریتم Rv typing در مجموع ۵۲ جدایه محصولات PCR به اندازه ۷۸۶ زوج باز در Rv0577، ۹۴۳ زوج باز در *IS1561*، ۱۰۳۵ زوج باز در Rv1510، ۱۱۱۶ زوج باز در Rv1970، ۹۹۹ زوج باز در Rv3877/8 و ۴۰۴ زوج باز در Rv3120 تولید گردید و براساس مندرجات جدول استاندارد هویت همه آنها مایکوباکتریوم تویرکلوزیس تعیین شد. تنها جدایه متفاوت (AR0208) در جریان بررسی سه لوکوس Rv1510، Rv1970 و Rv3120 هیچ‌گونه محصولی را تولید نمود و در مورد سایر آزمون‌های این الگوریتم نیز محصولات با اندازه یکسان با سایر جدایه‌ها تولید شد و بدین ترتیب هویت آن مایکوباکتریوم بوویس تشخیص داده شد (شکل یک).

در اجرای الگوریتم RD typing نیز ۵۲ جدایه محصولاتی را به اندازه ۱۴۶ زوج باز در آزمون RD1، ۱۷۲ زوج باز در آزمون RD4، ۲۳۵ زوج باز در آزمون RD9 و ۳۶۹ زوج باز در آزمون RD12 تولید گردید. بدین ترتیب هویت همه آنها مایکوباکتریوم تویرکلوزیس تعیین شد. تنها جدایه باقیمانده (AR0208) با توجه به تولید قطعاتی به اندازه ۱۴۶ زوج باز در آزمون RD1، ۲۶۸ زوج باز در آزمون RD4، ۱۰۸ زوج باز در آزمون RD9 و ۳۰۶ زوج باز در آزمون RD12 براساس جدول استاندارد به‌عنوان مایکوباکتریوم بوویس شناسایی شد (شکل یک).

در اجرای ژنوتایپینگ MIRU-VNTR ۶۳۶ محصول PCR حاصل تکثیر ۱۲ لوکوس مربوط به ۵۳ جدایه با موفقیت تولید شد و ناتوانی در تولید محصول در هیچ‌یک از لوکوس‌ها مشاهده نگردید. در بررسی یافته‌های مربوط به لوکوس‌ها به‌صورت مستقل، لوکوس MIRU-26 با ۷ آلل و لوکوس MIRU-39 با ۲ آلل به ترتیب بیشترین و کمترین تنوع ژنتیکی را در جمعیت تحت مطالعه نشان دادند. با این حال پس از محاسبه اندیکس سیمپسون بیشترین قدرت

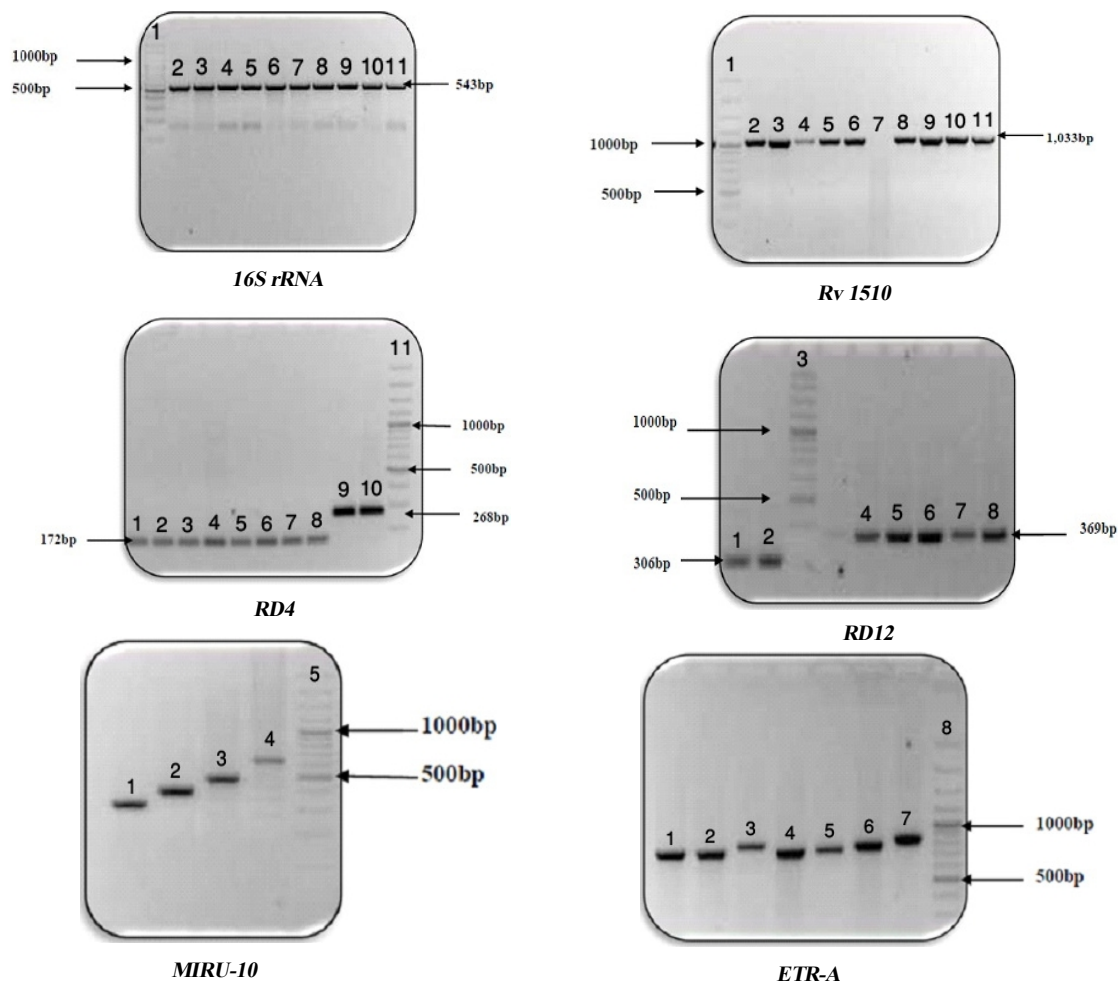
جدول ۴: اطلاعات دموگرافیک بیماران و نتایج ژنوتایپینگ جدایه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس

Isolate ID	Age	Sex	Nationality	ETR-A	ETR-B	ETR-C	ETR-D	ETR-E	ETR-F	MIRU-10	MIRU-16	MIRU-26	MIRU-39	MIRU-40	QUB-11b	Genotype
AR0413	80	M	IRANIAN	2	1	4	2	3	2,2	2	3,2	5	2	3	2	O1
AR0225	42	F	IRANIAN	2	1	4	3	3	2,2	2	3,2	5	2	3	2	O2
AR0123	81	M	IRANIAN	2	1	4	3	3	2,2	2	4,2	5	2	3	2	O3
AR1682	28	M	AFGHANI	2	1	4	3	3	2,2	2	2,2	5	2	3	2	O4
AR0416	66	F	IRANIAN	2	1	4	3	3	2,2	2	3,2	6	2	3	1	O5
AR0404	75	M	IRANIAN	2	1	4	3	3	3,2	2	3,2	5	2	3	2	O6
AR0301	77	F	IRANIAN	2	2	2	3	3	3,2	5	5,2	4	3	3	2	O7
AR0125	78	M	IRANIAN	2	2	2	3	3	3,2	5	4,2	7	2	3	2	C1
AR0536	20	F	AFGHANI	2	2	2	3	3	3,2	5	4,2	7	2	3	2	C1
AR0129	80	ND	IRANIAN	2	2	2	3	3	3,2	7	4,2	9	3	3	2	O8
AR0406	85	ND	IRANIAN	2	2	2	3	3	2,2	2	5,2	6	2	4	2	O9
AR0832	79	F	IRANIAN	2	2	2	3	5	2,2	7	5,2	8	3	3	2	O10
AR1164	80	F	IRANIAN	2	2	2	3	5	3,2	7	4,2	9	3	3	2	O11
AR0410	80	F	IRANIAN	2	2	4	3	3	2,2	2	4,2	5	2	3	2	O12
AR0974	70	F	IRANIAN	3	1	4	3	3	2,2	1	4,2	7	2	3	2	O13
AR0409	48	F	IRANIAN	3	1	4	3	3	2,2	2	2,1	4	2	3	2	O14
AR0200	80	M	IRANIAN	3	1	4	3	3	2,2	2	3,2	5	2	2	2	O15
AR1421	35	F	AFGHANI	3	1	4	3	3	2,2	2	5,2	5	3	3	1	O16
AR0401	48	M	IRANIAN	3	1	4	3	3	2,2	2	3,2	6	2	1	2	O17
AR0054	73	F	IRANIAN	3	1	4	3	3	2,2	2	3,2	6	2	3	2	C2
AR0112	71	F	IRANIAN	3	1	4	3	3	2,2	2	3,2	6	2	3	2	C2
AR0126	75	F	IRANIAN	3	1	4	3	3	2,2	2	3,2	6	2	3	2	C2
AR0128	75	M	IRANIAN	3	1	4	3	3	2,2	2	3,2	6	2	3	2	C2
AR0244	74	F	IRANIAN	3	1	4	3	3	2,2	2	3,2	6	2	3	2	C2
AR0411	82	F	IRANIAN	3	1	4	3	3	2,2	2	3,2	6	2	3	1	O18
AR0619	70	F	IRANIAN	3	1	4	3	3	2,2	2	5,2	6	2	3	2	O19
AR0959	60	M	IRANIAN	3	1	4	3	3	2,2	2	4,2	6	2	3	2	O20
AR0119	ND	F	IRANIAN	3	1	4	3	3	2,2	2	3,2	6	2	3	2	O21
AR0405	45	M	IRANIAN	3	1	4	3	3	2,2	2	4,2	6	2	4	2	O22
AR1020	37	M	IRANIAN	3	2	2	3	3	2,2	2	4,2	5	2	3	2	O23
AR1700	24	M	IRANIAN	3	2	2	3	3	2,2	5	4,2	6	3	4	2	O24
AR0122	83	F	IRANIAN	3	2	2	3	5	3,2	5	3,2	7	2	3	2	O25
AR0403	73	M	IRANIAN	3	2	4	3	3	1,2	5	5,2	1	2	3	2	O26
AR0402	23	F	IRANIAN	3	2	4	3	3	2,2	2	4,2	6	2	1	2	O27
AR0127	89	M	IRANIAN	3	2	4	3	3	2,2	2	3,2	6	2	3	2	O28
AR0412	65	F	IRANIAN	4	2	2	3	3	3,2	2	4,2	5	2	4	2	O29
AR1257	40	F	IRANIAN	4	2	2	3	3	3,2	2	4,2	7	3	3	2	O30
AR0414	70	M	IRANIAN	4	2	2	3	4	3,2	5	3,2	7	3	3	2	O31
AR0134	70	F	IRANIAN	4	2	2	3	4	3,2	6	4,2	7	3	3	2	O32
AR1335	81	M	IRANIAN	4	2	2	3	4	3,2	7	4,2	1	3	4	2	O33
AR0121	35	M	IRANIAN	4	2	2	3	5	3,2	6	4,2	5	2	4	2	O34
AR1710	32	M	IRANIAN	4	2	2	3	6	3,2	6	4,2	5	2	3	2	O35
AR0408	85	F	IRANIAN	4	2	2	3	5	3,2	6	4,2	5	3	4	2	O36
AR119D	73	M	IRANIAN	4	2	2	3	5	3,2	6	4,2	7	3	1	2	O37
AR0192	80	M	IRANIAN	4	2	2	3	5	3,2	6	4,2	7	2	3	2	C3
AR0193	80	F	IRANIAN	4	2	2	3	5	3,2	6	4,2	7	2	3	2	C3
AR0400	70	M	IRANIAN	4	2	2	3	5	3,2	6	4,2	7	2	3	2	C3
AR1892	27	M	IRANIAN	4	2	2	3	5	3,2	6	4,2	7	2	3	2	C3
AR0500	60	M	IRANIAN	4	2	2	3	5	3,2	6	4,2	7	3	3	2	C4
AR0580.1	45	M	IRANIAN	4	2	2	3	5	3,2	6	4,2	7	3	3	2	C4
AR0124	ND	ND	ND	4	2	2	3	5	3,2	6	4,2	7	3	4	2	O38
AR0407	83	F	IRANIAN	4	2	4	3	3	2,3	3	3,2	4	2	3	3	O39
AR0208	65	F	IRANIAN	6	6	5	4	3	2,1	2	3,2	5	3	2	4	O40

Simpson's index 0.682 0.516 0.528 0.074 0.484 0.561 0.658 0.622 0.767 0.429 0.410 0.179 -

اعداد موجود در ستون‌های مربوط به هر لوکوس تعداد واحدهای تکراری در ژنوم هر جدایه را نشان می‌دهند. این اعداد براساس اندازه محاسبه شده محصول PCR هر لوکوس در هر جدایه و تطبیق آن با جدول‌های استاندارد تعیین شدند.

M: مرد، F: زن، ND: نامشخص، Genotype O: تیپ ژنتیکی انفرادی، Genotype C: تیپ ژنتیکی خوشه‌ای



شکل ۱: تصویر ژل الکتروفورز مربوط به آمپلیفیکاسیون مناطق مختلف ژنتیکی مورد استفاده در مطالعه حاضر در هر تصویر ستون مربوط به DNA size marker مشخص شده است.

M. bovis BCG متفاوت است.

در مطالعه حاضر اعمال روش تایپینگ MIRU-VNTR بر روی ۵۳ جدایه نشانه‌ای مبنی بر آلودگی هیچ‌یک از بیماران به بیش از یک جدایه (سویه) را نشان نداد. یکی از خصوصیات این روش آن است که در صورت وجود بیش از یک سویه به دلیل احتمال تولید باندهای الکتروفورزی متفاوت، وقوع این وضعیت قابل تشخیص خواهد بود. به نظر می‌رسد تعداد گزارش‌هایی از موارد آلودگی همزمان بیماران به بیش از دو سویه یا دو گونه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از نقاط مختلف جهان رو به افزایش است (۲۶). به‌طوریکه این رقم حتی تا ۱۹ درصد بیماران (۲۷ و ۲۸) گزارش شده است. اینگونه موارد عموماً در مناطق با شیوع بالای بیماری نظیر آفریقا مشاهده می‌گردند (۲۹). در ایران تنها گزارش موجود در این ارتباط مشاهده آلودگی همزمان بیماران HIV مثبت در اهواز به مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و مایکوباکتریوم ابویوم است (۳۰).

در مطالعه حاضر مقادیر متفاوتی از فراوانی آلل‌ها در میان لوکوس‌های MIRU-VNTR مشاهده شد. به طوری که لوکوس‌های

در مطالعه حاضر این توانایی از دو منظر مورد استفاده قرار گرفته است. اولاً مواردی از ابتلا بیماران به عوارض ناشی از انتشار غیرمنتظره سویه واکسینال *M. bovis* BCG پیش از این در خارج از ایران (۲۱ و ۲۲) و همچنین ایران (۲۳ و ۲۴) گزارش شده است. علاوه بر این در صورت آلودگی بیماران به مایکوباکتریوم بوویس افتراق میان سویه‌های حاد و سویه واکسینال BCG از نظر آزمایشگاهی به‌سادگی امکان‌پذیر نیست. اهمیت این نکته وقتی بیشتر مشخص می‌شود که ذکر گردد در اسپولیگوتایپینگ یک تیپ ژنتیکی مهم (مشهور به SB120) که مشخصه سویه واکسینال BCG است؛ به‌صورت مشابه در میان بسیاری از سویه‌های حاد مایکوباکتریوم بوویس (معروف به سویه‌های شبه BCG) نیز دیده می‌شود. در ایران این اسپولیگوتایپ به عنوان فراوان‌ترین تیپ ژنتیکی مایکوباکتریوم بوویس گزارش شده است (۲۵). این در حالی است که روش اسپولیگوتایپینگ قادر به تفریق میان این سویه‌ها با سویه واکسینال BCG نیست. در مطالعه حاضر با انجام آزمون RD1 مشخص گردید تنها جدایه مایکوباکتریوم بوویس (AR0208) با سویه واکسینال

MIRU-26، MIRU-40 و MIRU-40 متنوع‌ترین از نظر تعداد آلل‌ها بودند. در مطالعه اصغرزاده و همکاران روی ۱۵۶ جدایه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس جمع‌آوری شده از بیماران در ارومیه و تبریز نیز این لوکوس‌ها بیشترین میزان تنوع ژنتیکی را از خود نشان دادند (۳۱). پیش از این مشاهدات مشابه در مطالعات خارج از ایران گزارش شده است. به طوری که در مطالعه بین‌المللی انجام شده بر روی ۴۹۴ جدایه از بیش از ۳۰ کشور در سال ۲۰۰۶ لوکوس‌های فوق در گروه متنوع‌ترین لوکوس‌ها شناخته شدند (۱۸). در مطالعه حاضر فراوانی هریک آلل‌ها از یک الگوی یکنواخت پیروی نکرده است. به طوری که برخی از آلل‌ها به صورت مشخص از فراوانی بیشتری برخوردار بودند. به عنوان مثال در لوکوس ETR-D در بین ۵۳ جدایه تحت مطالعه ۵۱ جدایه دارای یک آلل واحد بودند و تنها در ۲ جدایه آلل‌های دیگر مورد شناسایی قرار گرفت. به نظر می‌رسد فراوانی تر بودن بعضی از آلل‌های خاص در جمعیت جدایه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در مطالعه حاضر که در واقع بخشی از جمعیت بزرگ‌تر این باکتری در ایران است؛ در واقع نشانه‌ای از وجود یک خانواده (کلون) از این پاتوژن در منطقه تحت مطالعه است. این خصوصیت پیش از این در مورد دیگر پاتوژن‌های با ماهیت ژنتیکی کلونال مورد توجه قرار گرفته است. به طوری که در مورد مایکوباکتریوم بوویس آلل‌های مشخصی از لوکوس‌های ETR در انگلستان (۳۲)، اسپانیا (۳۳) و ایران (۳۴) از فراوانی قابل توجهی در مقایسه با بقیه آلل‌ها برخوردارند. مشاهده این ویژگی در میان ساختار ژنتیکی جدایه‌های تحت مطالعه در لوکوس‌های مورد نظر این مطالعه ضمن آن که می‌تواند مؤید ارتباط ساختاری ژنتیکی و کلونال میان این جدایه‌ها باشد؛ می‌تواند نشانه‌ای از حضور طولانی‌تر این آلل‌ها در مقایسه با آلل‌های دیگر در منطقه جغرافیایی تحت مطالعه نیز باشد (۳۵).

در مطالعه حاضر در مجموع ۴۴ تیپ ژنتیکی در میان ۵۳ جدایه تحت بررسی شناسایی گردید. بدین ترتیب ۸۳ درصد جدایه‌ها دارای تیپ‌های ژنتیکی مستقل بودند. این میزان نشان‌دهنده سطح نسبتاً بالایی از تنوع ژنتیکی در میان جدایه‌های استان است. در عین حال توجه به این مشاهده ضروری است که ۱۹ تیپ ژنتیکی تنها در یک لوکوس از دوازده لوکوس با یکدیگر متفاوت بودند که در اصطلاح تکنیکی این گونه تفاوت‌ها بنام Single Locus Variation (SLV) نامیده می‌شوند. به نظر نمی‌رسد این تشابهات گسترده میان تیپ‌های MIRU-VNTR یافت شده در استان مرکزی تصادفی باشند. برعکس، این تیپ‌های ژنتیکی بنابر احتمال زیاد معرف وجود کلون یا کلون‌های اجدادی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در منطقه هستند که پس از تکوین در منطقه به مرور زمان و در جریان انتقال بیماری

به بیماران مختلف منشاء پیدایش تیپ‌های مشابه دیگر شده‌اند. به نظر می‌رسد اظهار نظر قطعی‌تر در ارتباط با این فرضیه منوط به انجام آزمون‌های تکمیلی دیگر نظیر اسپولیگوتایپینگ است که از دیدگاه تکاملی ژنوتیپ‌ها اطلاعات دقیق‌تری را ارائه می‌نماید.

در عین حال ۱۳ جدایه (۲۵ درصد) از مجموع ۵۳ جدایه مورد مطالعه در قالب ۴ تیپ ژنتیکی گروهی و یا به اصطلاح اپیدمیکی دسته‌بندی شدند که در بزرگ‌ترین گروه ۵ جدایه و در گروه‌های بعدی به ترتیب ۴، ۲ و ۲ جدایه یکسان قرار گرفتند. جدایه‌های موجود در هر گروه از نظر ژنوتیپ در تمام ۱۲ لوکوس به کار گرفته شده یکسان بودند و وجود این جدایه‌ها به احتمال بسیار زیاد نشانه انتقال سل در میان این بیماران در استان مرکزی است. با توجه به عدم دسترسی به اطلاعات مربوط به تماس یا تماس‌های احتمالی موثر اپیدمیولوژیکی میان بیماران در این مطالعه، به نظر می‌رسد با اسپولیگوتایپینگ بتوان با اطمینان بیشتر در مورد انتقال بیماری میان این بیماران اظهار نظر نمود.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه اگرچه ۴۲ تیپ ژنتیکی MIRU-VNTR در میان ۵۳ جدایه تحت مطالعه شناسایی شد؛ اما دستکم در ۱۹ مورد تفاوت میان این تیپ‌ها، فقط در مورد یک لوکوس از ۱۲ لوکوس به کار گرفته مشاهده شد. بدین ترتیب در مجموع جمعیت ژنتیکی نسبتاً همگنی از جدایه‌ها مشاهده گردید. اگرچه شناسایی ۱۳ جدایه اپیدمیکی در قالب ۴ تیپ ژنتیکی می‌تواند به عنوان نشانه انتقال بیماری در میان مبتلایان باشد؛ اما در مجموع انتقال بیماری در بیماران تحت بررسی چندان گسترده به نظر نمی‌رسد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی مصوب (۹۰۴۷-۱۸-۱۸-۲) مؤسسه تحقیقات واکنش و سرم‌سازی رازی بود و با حمایت مالی آن مؤسسه به انجام رسید. همچنین اجرای عملیات آزمایشگاهی در قالب پایان‌نامه آقای مهدی احمدی برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته میکروبیولوژی پزشکی از مؤسسه تحقیقات واکنش و سرم‌سازی رازی شعبه اراک انجام گردید. بدین وسیله از آقایان دکتر مجید رضوانی، دکتر هادی قدکچی و نیز دکتر حبیب اله پایکاری به خاطر مساعدت در سازماندهی و اجرای این مطالعه تشکر می‌نمایم. یاد و خاطره زنده‌یاد دکتر Louis Paul Delpi پایه‌گذار و نخستین رئیس مؤسسه پس از تجدید سازمان در سال ۱۳۰۹، زنده یاد دکتر عزیز رفیعی نخستین رئیس ایرانی انستیتو و زنده یاد پروفیسور حسین میرشمسی معاون فنی مؤسسه در کنار دیگر پژوهشگران در گذشته این مرکز را گرامی می‌داریم.

References

- Chiari M, Zanoni M, Alborali LG, Zanardi G, Avisani D, Tagliabue S, et al. Isolation of *Mycobacterium caprae* (Lechtal genotype) from red deer (*Cervus elaphus*) in Italy. *J Wildl Dis*. 2014 Apr;50(2):330-3.
- Alexander KA, Laver PN, Michel AL, Williams M, van Helden PD, Warren RM, et al. Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex pathogen, *M. mungi*. *Emerg Infect Dis*. 2010 Aug; 16(8):1296-9.
- Gey van Pittius NC, Perrett KD, Michel AL, Keet DF, Hlokwet T, Streicher EM, et al. Infection of African buffalo (*Syncerus caffer*) by *oryx* bacillus, a rare member of the antelope clade of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Wildl Dis*. 2012 Oct; 48(4):849-57.
- Cousins DV, Peet RL, Gaynor WT, Williams SN, Gow BL. Tuberculosis in imported hyrax (*Procavia capensis*) caused by an unusual variant belonging to the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Vet Microbiol*. 1994 Nov;42(2-3):135-45.
- Coscolla M, Lewin A, Metzger S, Maetz-Renning K, Calvignac-Spencer S, Nitsche A, et al. Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex isolate from a wild chimpanzee. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2013 Jun [date cited]. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1906.121012>
- Huard RC, Lazzarini LC, Butler WR, van Soolingen D, Ho JL. PCR-based method to differentiate the subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* complex on the basis of genomic deletions. *J Clin Microbiol*. 2003 Apr;41(4):1637-50.
- Warren RM, Gey van Pittius NC, Barnard M, Hesselting A, Engelke E, de Kock M, et al. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex by PCR amplification of genomic regions of difference. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2006 Jul;10(7):818-22.
- Kidenya BR, Webster LE, Behan S, Kabangila R, Peck RN, Mshana SE, et al. Epidemiology and genetic diversity of multidrug-resistant tuberculosis in East Africa. *Tuberculosis (Edinb)*. 2014 Jan;94(1):1-7.
- Zhang Z, Pang Y, Wang Y, Liu C, Zhao Y. Beijing genotype of *Mycobacterium tuberculosis* is significantly associated with linezolid resistance in multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis in China. *Int J Antimicrob Agents*. 2014 Mar; 43(3):231-5.
- Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol*. 1997 Apr;35(4):907-14.
- Allix-Béguec C, Supply P, Wanlin M, Bifani P, Fauville-Dufaux M. Standardised PCR-based molecular epidemiology of tuberculosis. *Eur Respir J*. 2008 May;31(5):1077-84.
- Asante-Poku A, Nyaho MS, Borrell S, Comas I, Gagneux S, Yeboah-Manu D. Evaluation of Customised Lineage-Specific Sets of MIRU-VNTR Loci for Genotyping *Mycobacterium tuberculosis* Complex Isolates in Ghana. *PLoS one*. 2014; 9(3):p. e92675.
- Zamani S, Aflaki M, Fooladi AA, Darban-Sarokhalil D, Bameri Z, Khazaei S, et al. MIRU-VNTR analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* isolates from three provinces of Iran. *Scand J Infect Dis*. 2013 Feb;45(2):124-30.
- de Beer JL, Akkerman OW, Schürch AC, Mulder A, van der Werf TS, van der Zanden AG, et al. Optimization of standard in-house 24-locus variable-number tandem-repeat typing for *Mycobacterium tuberculosis* and its direct application to clinical material. *J Clin Microbiol*. 2014 May;52(5):1338-42.
- Allix-Béguec C, Wahl C, Hanekom M, Nikolayevskyy V, Drobniewski F, Maeda S, et al. Proposal of a consensus set of hypervariable mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat loci for subtyping of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing isolates. *J Clin Microbiol*. 2014 Jan; 52(1):164-72.
- Lee J, Kang H, Kim S, Yoo H, Kim HJ, Park YK. Optimal Combination of VNTR Typing for Discrimination of Isolated *Mycobacterium tuberculosis* in Korea. *Tuberc Respir Dis (Seoul)*. 2014 Feb;76(2):59-65.
- Sekar MG, Rehman F, Kumar V, Selvakumar N. Equivalence of acid alone or acid-alcohol as decolorizing agent in Ziehl-Neelsen method. *Indian J Tuberc*. 2012 Oct;59(4):219-23.
- Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rüsch-Gerdes S, Willery E, et al. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*. 2006 Dec;44(12):4498-510.
- Sola C, Filliol I, Legrand E, Lesjean S, Locht C, Supply P, et al. Genotyping of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using MIRUs: association with VNTR and spoligotyping for molecular epidemiology and evolutionary genetics. *Infect Genet Evol*. 2003;3(2): 125-33.
- 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 Nov;26(11):2465-6.
- Mokrousov I, Vyazovaya A, Potapova Y, Vishnevsky B, Otten T, Narvskaya O. *Mycobacterium bovis* BCG-Russia Clinical Isolate with Noncanonical Spoligotyping Profile. *J Clin Microbiol*. 2010 Dec;48(12):4686-7.
- Aslan G, Kuyucu N, Aydin E, Günel S, Emekdaş G. [A case of fatal disseminated infection caused by *Mycobacterium bovis* BCG strain and the identification of the isolate by spoligotyping]. *Mikrobiyol Bul*. 2010 Apr;44(2):297-302. [Article in Turkish]
- Norouzi S, Movahedi Z, Mamishi S, Monajemzadeh M, Rezaei N. Disseminated BCG as a unique feature of an infant with severe combined immunodeficiency. *Turk J Pediatr*. 2011 May-Jun; 53(3):328-32.
- Movahedi Z, Norouzi S, Mamishi S, Rezaei N. BCGiosis as a presenting feature of a child with chronic granulomatous disease. *Braz J Infect Dis*. 2011 Jan-Feb;15(1):83-6.
- Tadayon K, Mosavari N, Feizabadi MM. An epidemiological perspective on bovine tuberculosis spotlighting facts and dilemmas in Iran, a historically zebu-dominant farming country. *Iran J Microbiol*. 2013; 5(1):1-13.
- Silva MR, Rocha Ada S, da Costa RR, de Alencar AP, de Oliveira VM, Fonseca Júnior AA, et al. Tuberculosis patients co-infected with *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* in an urban area of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2013 May;108(3). pii: S0074-02762013000300321
- Cohen T, Van Helden PD, Wilson D, Colijn C, McLaughlin MM, Abubakar I, et al. Mixed-Strain *Mycobacterium tuberculosis* infections and the implications for tuberculosis treatment and control. *Clin Microbiol Rev*. 2012;25(4):708-19.
- Mallard K, McNerney R, Crampin AC, Houben R, Ndlovu R, Mumthali L, et al. Molecular detection of mixed infections of *Mycobacterium tuberculosis* strains in sputum samples from patients in Karonga District, Malawi. *J Clin Microbiol*. 2010 Dec; 48(12):4512-8.
- Lazzarini LC, Rosenfeld J, Huard RC, Hill V, Lapa E Silva JR, Desalle R, et al. *Mycobacterium tuberculosis* spoligotypes that

may derive from mixed strain infections are revealed by a novel computational approach. *Infect Genet Evol.* 2012; 12(4): 798-806.

30. Khosravi AD, Alavi SM, Hashemzade M, Abasi E, Seghatoleslami S. The relative frequency of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* infections in HIV positive patients, Ahvaz, Iran. *Asian Pac J Trop Med.* 2012 Jan;5(1):71-4.

31. 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):124-31.

32. Inwald J, Hinds J, Palmer S, Dale J, Butcher PD, Hewinson RG, et al. Genomic Analysis of *Mycobacterium tuberculosis*

Complex Strains Used for Production of Purified Protein Derivative. *J Clin Microbiol.* Aug 2003; 41(8): 3929-32.

33. Parra A, Larrasa J, García A, Alonso JM, de Mendoza JH. Molecular epidemiology of bovine tuberculosis in wild animals in Spain: a first approach to risk factor analysis. *Vet Microbiol.* 2005 Oct; 110(3-4):293-300.

34. Tadayon K, Mosavari N, Sadeghi F, Forbes KJ. *Mycobacterium bovis* Infection in Holstein Friesian Cattle, Iran. *Emerg Infect Dis.* 2008 Dec; 14(12):1919-21.

35. Tanaka MM, Francis AR. Detecting emerging strains of tuberculosis by using spoligotypes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006 Oct; 103(41):15266-71.

Original Paper

Mycobacterium tuberculosis genotyping by MIRU-VNTR method

Ahmadi M (M.Sc)¹, Tadayon K (Ph.D)^{*2}, Mosavari N (Ph.D)², Farazi AA (M.D, MPH)³
Arjomandzadegan M (Ph.D)⁴, Keshavarz R (DVM)⁵, Banihashemi R (M.Sc)⁶
Sekhavati M (M.Sc)⁶, Hamed D (M.Sc)⁷, Eramabadi M (M.Sc)⁷, Jabbari M (M.D)⁸
Ghaderi R (Ph.D)⁵, Hoseini D (Ph.D)⁹, Dashtipour Sh (B.Sc)¹⁰

¹Vaccine Expert, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Arak, Iran. ²Assistant Professor, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Karaj, Iran. ³Associate Professor, Tropical and Infectious Diseases Department, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran. ⁴Associate Professor, Microbiology & Immunology Department, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran. ⁵Veterinarian, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Karaj, Iran. ⁶Vaccine expert, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Karaj, Iran. ⁷Microbiologist, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Karaj, Iran. ⁸General Physician, Tuberculosis Expert, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran. ⁹Assistant Professor, Arak Branch, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Arak, Iran. ¹⁰Vaccine Expert, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Karaj, Iran.

Abstract

Background and Objective: MIRU-VNTR typing is currently one of the most frequently-used standardized genotyping systems in molecular epidemiology of tuberculosis in the world. This study was done to determine the *Mycobacterium tuberculosis* genotyping by MIRU-VNTR method.

Methods: This descriptive study was done on sputum, gastric lavage clinical specimens of 53 tuberculosis suspected patients. Fifty-three isolates were identified by 16S rRNA and Rv-typing followed by RD typing. They were then subjected to a 12-locus (ETRA, ETRB, ETRC, ETRD, ETRE and ETRF, MIRU-10, MIRU-26, MIRU-39, MIRU-30 plus QUB-11b) MIRU-VNTR typing system.

Results: In MIRU-VNTR typing, forty-four types were identified with 13 isolates classified in 4 clustered and the remaining 40 isolates representing 40 orphan patterns. In comparative analysis of MIRU-VNTR loci, MIRU-26 with 7 alleles displayed the highest diversity level (Simpson's diversity index = 0.767). Out of the 53 isolates, only one was identified as *Mycobacterium bovis*. All the remaining isolates were characterized as *Mycobacterium tuberculosis*. None of the samples was affected to *Mycobacterium* complex strain. No evidence of either double or co-infection of the patients with more than one species/strain was detected.

Conclusion: While the genomic diversity observed by MIRU-VNTR typing sounds extensive, the population genomic structure on the whole however, seems to be homogenous. Recent transmission between studied patients does not appear to be a frequent event as only 13 isolates representing 4 MIRU-VNTR types, were assumingly epidemic.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis* complex, *Mycobacterium bovis*, RD typing, Rv-typing, MIRU-VNTR genotype

* Corresponding Author: Tadayon K (Ph.D), E-mail: k.tadayon@rvsri.ac.ir

Received 7 May 2013

Revised 16 Aug 2014

Accepted 17 Aug 2014

Cite this article as: Ahmadi M, Tadayon K, Mosavari N, Farazi AA, Arjomandzadegan M, Keshavarz R, Banihashemi R, Sekhavati M, Hamed D, Eramabadi M, Jabbari M, Ghaderi R, Hoseini D, Dashtipour Sh. [*Mycobacterium tuberculosis* genotyping by MIRU-VNTR method]. J Gorgan Uni Med Sci. 2015; 17(1): 97-107. [Article in Persian]