

Evaluation of the prevalence of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from tuberculosis patients referred to Pasteur Institute of Iran

Nayereh Ebrahimzadeh¹, Shiva Irani¹, Shohreh Khatami², Seyed Davar Siadat^{2,3}

¹Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

²Department of Biochemistry, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

³Department of Mycobacteriology and Pulmonary Research, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

⁴Microbiology Research Center (MRC), Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Abstract

Background: Tuberculosis is a threat to public health. The epidemiology of tuberculosis can be effective in identifying the source of infection, the dominant circulating strains and achieving transmission pathways in the world. The aim of this study was to determine the genotype of *Mycobacterium tuberculosis* (M. tb) strains in patients referred to Pasteur Institute of Iran between 2018 and 2019.

Materials and methods: In this study, 50 confirmed M. tb strains were evaluated. After M. tb strains identification and determining the drug susceptibility test, all strains were genotyped by MIRU-VNTR (Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit Variable Number Tandem Repeat) method.

Results: The most frequent genotype in all strains was CAS/Delhi (42%), followed by Haarlem (24%), NEW-1 (10%), LAM (8%), Beijing (8%), Cameroon (4%), EAI (% 2) and S (2%). Three clonal complexes and 44 singleton isolates were identified. Beijing genotype was the common genotype in MDR-TB strains. Also, QUB26 and QUB4156 loci had shown the highest of discriminative and allelic diversity.

Conclusion: CAS/Delhi and Beijing genotypes were introduced as the dominant genotypes in drug sensitive and MDR strains, respectively.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, MIRU-VNTR, Genotype.

Cited as: Ebrahimzadeh N, Irani SH, Khatami SH, Siadat SD. Evaluation of the prevalence of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from tuberculosis patients referred to Pasteur Institute of Iran. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2021; 31(3): 328-337.

Correspondence to: Seyed Davar Siadat

Tel: +98 21-64112282

E-mail: d.siadat@gmail.com

ORCID ID: 0000-0002-6892-5603

Received: 27 Dec 2020; **Accepted:** 20 Apr 2020

بررسی فراوانی ژنوتایپ سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس جدا شده از بیماران مسلول مراجعه کننده به انستیتو پاستور ایران

نیره ابراهیم زاده^۱، شیوا ایرانی^۱، شهره خاتمی^۲، سید داور سیادت^{۳،۴}

^۱گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

^۲گروه بیوشیمی، انستیتوپاستور ایران، تهران، ایران

^۳بخش سل و تحقیقات ریوی، انستیتوپاستور ایران، تهران، ایران

^۴مرکز تحقیقات میکروب شناسی، انستیتوپاستور ایران، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: بیماری سل به عنوان تهدیدی برای سلامت بهداشت جهانی مطرح است. بررسی اپیدمیولوژی بیماری سل می‌تواند در شناسایی منبع عفونت، سویه‌های غالب در حال گردش و دستیابی به مسیرهای انتقال در دنیا، نقش موثری داشته باشد. هدف از این مطالعه، تعیین ژنوتایپ سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بیماران مراجعه کننده به انستیتو پاستور ایران در سال‌های ۱۳۹۶-۱۳۹۷ بود. **روش بررسی:** در این مطالعه، ۵۰ سویه تایید شده از نظر عفونت مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مورد بررسی قرار گرفتند. سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بعد از شناسایی و تعیین الگوی حساسیت دارویی با روش *MIRU-VNTR* (*Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit*) *Variable Number Tandem Repeat*، تعیین ژنوتایپ شدند. **یافته‌ها:** ژنوتایپ‌های شناسایی شده *CAS/Delhi* (۴۲٪)، *Haarlem* (۲۴٪)، *NEW-I* (۱۰٪)، *LAM* (۸٪)، *Beijing* (۸٪)، *Cameroon* (۴٪)، *EAI* (۲٪) و *S* (۲٪) تعیین شدند و سه کلونال کمپلکس و ۴۴ سویه *singleton* شناسایی شدند. در سویه‌های مقاوم ژنوتایپ *Beijing* ژنوتایپ غالب بود. هم چنین لوکوس‌های *QUB26* و *QUB4156* دارای بالاترین قدرت افتراق و تنوع آلی بودند. **نتیجه‌گیری:** ژنوتایپ *CAS/Delhi* و *Beijing* به ترتیب به عنوان ژنوتایپ‌های غالب در سویه‌های حساس به دارو و *MDR* معرفی شدند. **واژگان کلیدی:** مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، *MIRU-VNTR*، ژنوتایپ.

مقدمه

۱۰۰۰۰۰) و تعداد مرگ و میر ناشی از آن حدود ۱/۴ میلیون گزارش شده است (۲).

همچنان سل مقاوم به، دارو تهدیدی برای سلامت عمومی محسوب می‌شود. در سال ۲۰۱۹ در سراسر جهان، نزدیک به نیم میلیون نفر مبتلا به سل مقاوم به ریفامپین (RR-TB) بودند که ۷۸٪ موارد از آنها مبتلا به سل مقاوم به چند دارو (MDR-TB) گزارش شدند (۳).

تخمین زده شده است که یک سوم مردم جهان مبتلا به سل نهفته هستند و از این تعداد تنها درصد کمی از افراد، مبتلا به سل ریوی فعال، در طول عمر خود می‌شوند، که نشان دهنده این واقعیت است که پاسخ ایمنی میزبان، برای محافظت از

بیماری سل از دیرباز در جوامع انسانی شایع بوده و این باکتری را از اسکلت انسان‌های عصر حجر و نیز در استخوان‌های مومیایی در مصر باستان جدا کردند (۱). طبق آخرین گزارش سازمان بهداشت جهانی (World Health Organization .WHO) بروز جهانی بیماری سل در سال ۲۰۱۹ حدود ۱۰ میلیون نفر بوده (معادل ۱۳۳ مورد در

آدرس نویسنده مسئول: تهران، بخش سل و تحقیقات ریوی، مرکز تحقیقات میکروب شناسی،

انستیتوپاستور ایران، سید داور سیادت (email: d.siadat@gmail.com)

ORCID ID: 0000-0002-6892-5603

تاریخ دریافت مقاله: ۹۹/۱۰/۷

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۱/۳۱

توسعه بیماری مهم است؛ بنابراین درک مکانیسم های میزبان و تعامل آن با سل به طور فزاینده ای دارای اهمیت است (۴). پاسخ میزبان به عفونت میکوباکتریایی به چندین عامل از جمله کنترل ژنتیکی میزبان و فاکتورهای باکتریایی و میان کنش بین آنها بستگی دارد که جنبه های ناشناخته زیادی از این میان کنش وجود دارد.

شواهد رو به فزاینده ای نشان می دهد که تفاوت های ژنتیکی در میان گونه های توبرکلوزیس ممکن است پیامدهای فنوتیپی مهمی داشته باشد (۵). از طرفی شدت ویروالانس در سویه های میکوباکتریوم توبرکلوزیس متنوع است و اهمیت بالینی این تنوع در سل، هم چنان چالش برانگیز است. به علت آن که میکوباکتریوم توبرکلوزیس از طریق تعویض تک نوکلئوتیدی، حذف و مضاعف شدگی تکامل می یابد، ساختار جمعیت آن به شدت کلونال است (۶). شاید این امر علتی باشد که هر یک از ویژگی های ویروالانس این دودمان های کلونالی به طور خاصی تکامل پیدا می کند (۷).

امروزه بر اساس تعیین توالی کل ژنوم (Whole-Genome Sequencing: WGS)، میکوباکتریوم توبرکلوزیس به ۷ دودمان تقسیم بندی می شود. دودمان های ۱ (indo-oceanic) و ۷ (اخیراً در اسیایی و در میان مهاجران اسیایی در جیبوتی گزارش شده است) و دودمان ۵ (West African-1) و ۶ (West African-2) به عنوان دودمان های نیایی شناخته می شوند و از نظر جغرافیایی محدود به مناطق خاصی هستند، به جز دودمان ۱ که توزیع متوسطی را نشان می دهد. در مقابل دودمان ۲ (East Asian) مانند Beijing، دودمان ۳ (Delhi/Cas) و دودمان ۴ (Euro-American) با تمایل بالایی در سطح جهان انتقال یافته اند (۸).

در اپیدمیولوژی سل و سایر میکوباکتریوم ها، مانند همه بیماری های عفونی، مسئله اصلی تعریف منبع عفونت و پیگیری مسیرهای انتقال و انتشار آن در محیط است. برای دستیابی به این مهم، توانایی تشخیص و ردیابی جداگانه سویه های میکوباکتریوم از اهمیت حیاتی برخوردار است (۹). همچنین، تکنیک های تایپینگ مولکولی، ابزار قدرتمند برای نشان دادن شیوع بیماری، انجام ردیابی تماس و بررسی تنوع سویه ها هستند. امروزه تکنیک های تایپینگ مولکولی با توجه به قدرت آنها در تشخیص انتقال و تمایز مجدد عفونت و عود، ابزار قابل اعتمادی برای بررسی اپیدمیولوژیک سل است. برای مطالعه اپیدمیولوژیک میکوباکتریوم توبرکلوزیس، چندین تکنیک تایپ مولکولی وجود دارد. دو روش مهم تایپینگ مبتنی بر PCR، MIRU-

VNTR و اسپولیگوتایپینگ بوده که بیشترین استفاده را در این زمینه دارند (۱۰).

روش MIRU-VNTR ابزاری بسیار کارآمد برای ژنوتایپینگ میکوباکتریوم توبرکلوزیس است و دارای قدرت تمایز بالا (۱۱)، سهولت روش کار و دستیابی به یک کد دیجیتالی برای هر سویه است که منجر به سهولت استفاده از این روش می شود (۱۲).

با توجه به شیوع سل در ایران، لزوم ردیابی سویه های در حال گردش در جامعه دارای اهمیت بسیاری است. هدف از این مطالعه، تعیین ژنوتایپ سویه های حساس و مقاوم به دارو میکوباکتریوم توبرکلوزیس در بیماران مراجعه کننده به انستیتو پاستور ایران بود.

مواد و روشها

سویه های بالینی میکوباکتریوم توبرکلوزیس

در این مطالعه گذشته نگر، تعداد ۵۰ سویه بالینی از بخش سل و تحقیقات ریوی انستیتو پاستور در بازه زمانی سال های ۱۳۹۷-۱۳۹۶ مورد مطالعه قرار گرفتند. سویه H37Rv (ATCC27294) به عنوان سویه رفرنس استفاده شد. مطالعه فوق در کمیته اخلاق انستیتو پاستور ایران (IR.PIL.REC.1396.42) به تصویب رسید.

تمام سویه های بالینی در محیط لوونشتاین جانسون کشت داده شدند و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۶ تا ۸ هفته نگهداری شدند و با استفاده از روش های استاندارد میکروبیولوژیک و بیوشیمیایی (رنگ آمیزی زیل نلسون، تست نیاسین، کاتالاز و نیترات) سویه ها تایید شدند. برای بررسی حساسیت دارویی (Drug susceptibility testing) سویه های میکوباکتریوم توبرکلوزیس با روش تناسبی (Proportional) طبق دستورالعمل CDC (The Center for Disease Control and Prevention) استفاده شد. آنتی بیوتیک ها، ایزونیاژید (غلظت نهایی ۰/۲ μg/mL)، استرپتومایسین (غلظت نهایی ۴ μg/mL)، ریفامپین (غلظت نهایی ۴۰ μg/mL)، و اتامبتول (غلظت نهایی ۲ μg/mL) بودند.

استخراج DNA و PCR

استخراج DNA از سویه های بالینی با استفاده از کیت DNA-Prep-NA/NA DNA and RNA Extraction Kit (DNA-TECHNOLOGY) طبق دستورالعمل شرکت مربوطه انجام شد.

در این مطالعه از روش MIRU-VNTR ۲۴ لوکوسی که روشی بر پایه PCR است، استفاده شد. بدین منظور از ۲۴ جفت پرایمر اختصاصی برای تکثیر واحد های تکراری پراکنده میکوباکتریایی

ارتباط ژنتیکی سویه‌های میکوباکتریوم توبرکلوزیس ترسیم شد (شکل ۱).

بر اساس MST رسم شده، شش سویه در سه کلونال کمپلکس قرار گرفتند و ۴۴ جدایه singleton بودند (شکل ۲). از بین ۵۰ سویه بررسی شده که در پایگاه داده‌های TBminer مورد آنالیز قرار گرفتند، ژنوتایپ‌های شناسایی شده عبارت از CAS/Delhi (۲۱ سویه)، Haarlem (۱۲ سویه)، NEW-1 (۵ سویه)، LAM (۴ سویه)، Cameroon (۲ سویه)، Beijing (۴ سویه)، EAI (۱ سویه)، S (۱ سویه) بودند. تعداد کپی‌های ۲۴ لوکوس MIRU-VNTR برای هر سویه در جدول ۲ ذکر شده است.

از بین سویه‌های مورد مطالعه، دو سویه مقاوم به ریفامپین متعلق به ژنوتایپ Haarlem، سه سویه مقاوم به ایزونیزید متعلق به ژنوتایپ‌های Cameroon، CAS/Delhi و Haarlem، و در سه سویه تایید شده MDR، دو سویه متعلق به ژنوتایپ Beijing و یک سویه ژنوتایپ Cameroon بودند. سویه‌های حساس به دارو شامل ژنوتایپ‌های CAS/Delhi، Haarlem، NEW-1، LAM، Beijing، EAI و S بودند. رابطه بین ژنوتایپ و حساسیت دارویی در شکل ۳ نشان داده شده است. الگوی سویه‌های مورد مطالعه با الگوهای موجود در پایگاه داده‌های MIRU-VNTRplus مقایسه شدند و در نهایت ۴ جدایه در این مطالعه با سویه-های پایگاه database جهانی مشابهت داشتند (۳ سویه NEW-1 و یک سویه Haarlem).

میزان HGDI برای MIRU-VNTR تایپینگ برابر با ۰/۹۲۹ به دست آمد که نشان دهنده قدرت تمایز بالا بود. در این مطالعه، شاخص افتراقی HGDI در لوکوس‌های MIRU-VNTR قدرت های افتراق مختلفی را نشان داد که از بالاترین ۰/۹۱۸ برای QUB26 تا کمترین ۰/۱۵۷ برای MIRU20 متغیر بود. یازده لوکوس (ETRB، Mtub21، MIRU26، MIRU16، MIRU10، Mtub04، MIRU39، QUB4156، QUB26، MIRU39، ETRC، HGDI بالاتر از ۰/۶ را نشان دادند که بیانگر قدرت افتراق بالایی این لوکوس‌ها است. در حالی که ده لوکوس (MIRU02، QUB11b، MIRU04، MIRU40، ETRA، Mtub30، MIRU23، Mtub34، MIRU27، MIRU31) قدرت افتراق متوسطی را نشان دادند (HGDI بین ۰/۳ تا ۰/۶) و سه لوکوس (MIRU20، Mtub29، MIRU24) قدرت افتراق ضعیف را نشان دادند (HGDI < ۰/۳) (جدول ۱).

(MIRU: Mycobacterial Interspersed Repeat Units) استفاده شد (۱۳). در این مطالعه از سوش استاندارد H37Rv با کدهای مشخص MIRV-VNTR به عنوان کنترل مثبت و از آب مقطر به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

برنامه واکنش PCR شامل دناتوراسیون اولیه دردمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۱ دقیقه، ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۴۰ ثانیه، دمای اتصال پرایمرها بر اساس هر یک از لوکوس‌ها متغیر بود و دمای گسترده‌گی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه و در نهایت ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، جهت تکثیر نهایی بود.

پس از تکثیر واحدهای تکراری پراکنده میکوباکتریایی، تعداد کپی‌های هر لوکوس با الکتروفورز محصولات PCR مشاهده شد. در نهایت یک کد عددی ۲۴ رقمی حاصل شد که هر کدام معرف یک تایپ MIRU-VNTR بودند.

تفسیر نتایج حاصل از محصولات PCR

سایز باندهای حاصل برای هر لوکوس با مارکر مقایسه شدند. تعداد تکرارها برای هر لوکوس با استفاده از جدول استاندارد تعیین شدند (۱۳). نتایج به دست آمده برای هر سویه به صورت کد ۲۴ رقمی در فایل اکسل ذخیره شدند. سپس کد ۲۴ رقمی که نشان دهنده الگوی MIRU-VNTR برای هر سویه است، برای آنالیز در سایت <http://info-demo.lirmm.fr/tbminer> به صورت آنلاین وارد و ژنوتایپ سویه‌ها تعیین شدند (۱۴). همچنین، از سایت <https://www.miru-vntrplus.org> برای رسم دندروگرام و MST و هم چنین تنوع آلی استفاده شد.

از سایت <http://www.comparingpartitions.info> برای محاسبه قدرت افتراق (Regeneration) لوکوس‌های MIRU-VNTR توسط شاخص افتراقی (HGDI: Hunter Gaston) (فاصله اطمینان ۰/۹۵) استفاده شد. همچنین برای محاسبه قدرت افتراق MIRU-VNTR تایپینگ از فرمول زیر استفاده شد (۱۵).

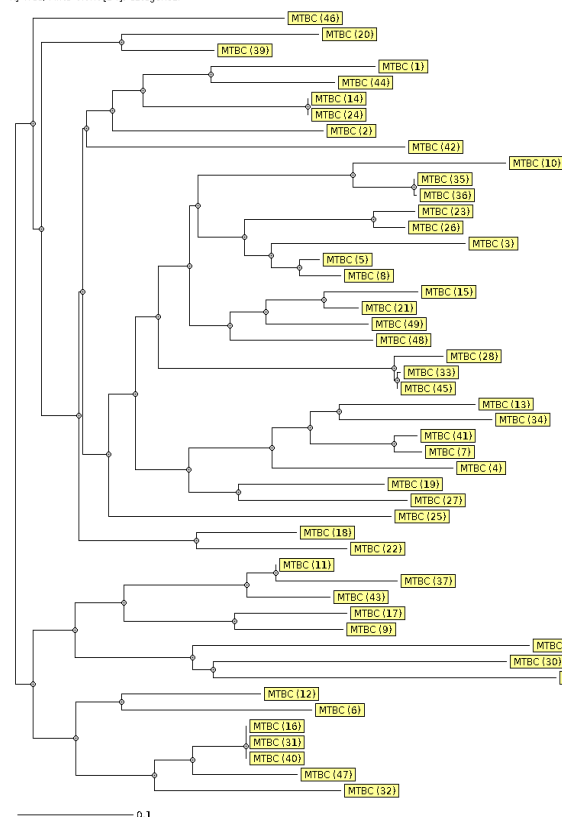
$$D = 1 - \left[\frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^s n_j(n_j - 1) \right]$$

در فرمول فوق، N تعداد کل جدایه‌ها، s تعداد تایپ‌ها و n_j تعداد جدایه‌های متعلق به تایپ j ام است. مقادیر HGDI بین صفر تا یک متغیر است و به ترتیب نشان دهنده غیر قابل افتراق و قابل افتراق بودن سویه‌ها از یکدیگر هستند (۱۵، ۱۶).

یافته‌ها

با استفاده از پایگاه داده‌های MIRU-VNTRplus، درخت فیلوژنتیک بر اساس الگوریتم UPGMA، برای بررسی

NJ-Tree, MIRU-VNTR (24): Categorical



1 1 2 1 3 5 2 5 2 2 3 4 2 2 5 1 5 3 3 5 1 8 3
 2 * 2 3 3 4 2 3 2 2 4 4 5 2 3 1 2 3 5 3 3
 2 2 2 3 3 4 2 4 2 2 4 4 2 2 6 1 7 3 3 5 3
 2 4 2 2 3 7 5 4 0 2 4 4 2 2 5 1 6 3 3 6 3 8 4 4
 2 5 2 2 4 7 5 4 2 2 4 4 2 2 5 1 5 3 3 5 3 9 4 4
 2 5 2 2 2 6 3 4 2 2 4 4 2 2 5 1 6 3 3 3 3 3 3
 2 5 2 2 2 6 3 4 2 2 4 4 2 2 5 1 6 3 3 3 3 3 3
 2 1 2 2 3 6 2 4 2 2 3 4 2 2 5 1 7 3 3 6 2 7 4 4
 2 2 2 2 4 5 6 4 2 2 5 4 4 2 6 1 7 3 3 3 5 9 2
 1 4 2 5 5 2 3 2 2 1 4 1 2 6 1 5 3 3 3 2 8 4 2
 1 2 4 3 5 4 2 3 2 2 4 2 2 6 5 3 3 3 2 4 2
 1 2 4 3 5 4 2 3 2 2 4 2 2 6 5 3 3 3 2 8 4 2
 1 4 3 3 2 5 2 2 4 2 2 6 1 6 3 2 2
 0 1 4 3 3 2 5 2 3 4 2 2 6 1 6 3 3 3 2
 2 1 4 3 3 2 4 2 5 2 3 4 2 2 6 1 3 1 3 2 2
 2 1 4 3 3 2 5 2 2 3 4 2 2 6 1 5 3 3 3 2
 2 1 4 3 3 2 4 5 2 2 3 4 2 2 6 1 5 3 3 3 3
 2 3 2 4 3 3 2 3 2 4 3 4 2 2 6 1 3 3 3 3 2
 2 4 3 3 3 2 3 2 3 4 2 2 6 5 3 3 3 2
 * 2 5 3 3 2 4 2 2 3 4 2 2 6 1 5 3 3 3 2
 1 2 4 3 3 3 2 4 2 2 3 4 2 1 5 1 2 3 3 3 2
 0 1 3 3 3 4 2 3 1 6 3 4 5 2 5 1 5 3 3 3 2
 0 1 3 3 3 4 2 3 2 6 3 4 5 2 5 1 5 3 3 3 8 2
 0 1 3 3 3 4 2 3 2 6 3 4 5 2 5 1 5 3 3 3 2
 2 2 4 3 4 2 3 5 2 2 2 4 2 1 5 1 5 3 3 4 1 2 2
 2 2 4 3 2 3 5 2 2 3 3 2 1 5 1 5 2 2 5 7 2 2
 2 2 4 2 3 2 3 5 2 2 3 4 2 1 5 1 6 3 2 3 6 2
 2 2 4 2 3 2 3 5 2 2 3 4 2 1 5 1 6 3 2 3 7 2 2
 2 2 3 2 3 3 3 2 1 4 4 4 2 1 5 1 5 3 2 3 8 2
 2 5 3 2 3 2 3 2 2 2 3 4 4 2 5 1 5 3 3 3 3 4 4
 2 2 3 2 3 3 3 2 3 2 4 4 2 5 1 5 3 3 3 3 7 3 2
 2 4 2 2 3 6 4 6 1 1 3 4 2 2 5 1 5 3 3 3 6 3 3
 2 2 2 3 5 4 4 4 2 2 3 4 2 2 5 1 5 1 3 3 3 8 3 4
 2 2 2 3 5 4 4 4 2 2 3 4 2 2 5 1 7 3 2 5 3 8 4
 2 1 2 3 3 6 3 2 2 4 4 5 3 6 1 5 3 3 3 4 3
 2 1 2 3 3 6 1 3 2 4 4 2 5 3 6 5 3 3 3 4 3
 2 1 2 3 3 6 3 2 2 4 4 5 3 6 1 3 5 3 3 4 3
 2 1 3 3 3 1 5 2 6 4 4 5 3 6 1 5 3 3 5 3 3
 2 1 4 3 3 3 2 2 2 6 4 4 5 3 6 1 5 1 5 3 3 3
 1 1 4 3 4 3 1 2 2 6 3 4 3 6 1 3 3 1 3 3 6 2 2
 1 2 4 3 3 3 4 1 2 3 4 2 1 5 2 3 3 3 3 2
 2 1 2 3 3 6 1 4 2 3 4 2 6 1 7 3 3 3 5 1 3 2
 1 2 3 3 7 2 6 2 2 3 1 2 3 6 1 5 3 3 3 8 3
 2 * 2 3 3 6 5 6 2 2 3 4 2 3 6 1 5 1 5 3 1 8 3
 2 1 2 3 3 6 1 4 2 2 3 4 2 3 6 1 7 3 3 5 1 3
 2 1 2 3 3 6 1 4 2 2 3 4 2 3 6 1 7 3 3 5 1 3
 2 1 2 3 3 6 1 4 2 2 3 4 2 3 6 1 7 3 3 5 1 3
 1 2 1 3 3 6 1 4 2 2 3 4 2 3 6 1 7 3 3 5 1 3
 2 1 2 3 3 6 1 4 2 2 3 4 2 3 6 2 7 3 5 1 4 3 2

شکل ۱. بررسی ارتباط ژنتیکی ۵۰ جدایه مایکوباکتریوم توپرکلوزیس توسط الگوریتم UPGMA برای الگوهای حاصل از MIRU-VNTR تایپینگ. تعداد آلل‌های هر لوکوس در مقابل دندروگرام رسم شده است.

جدول ۱. HGDI هر کدام از لوکوس‌های MIRU-VNTR

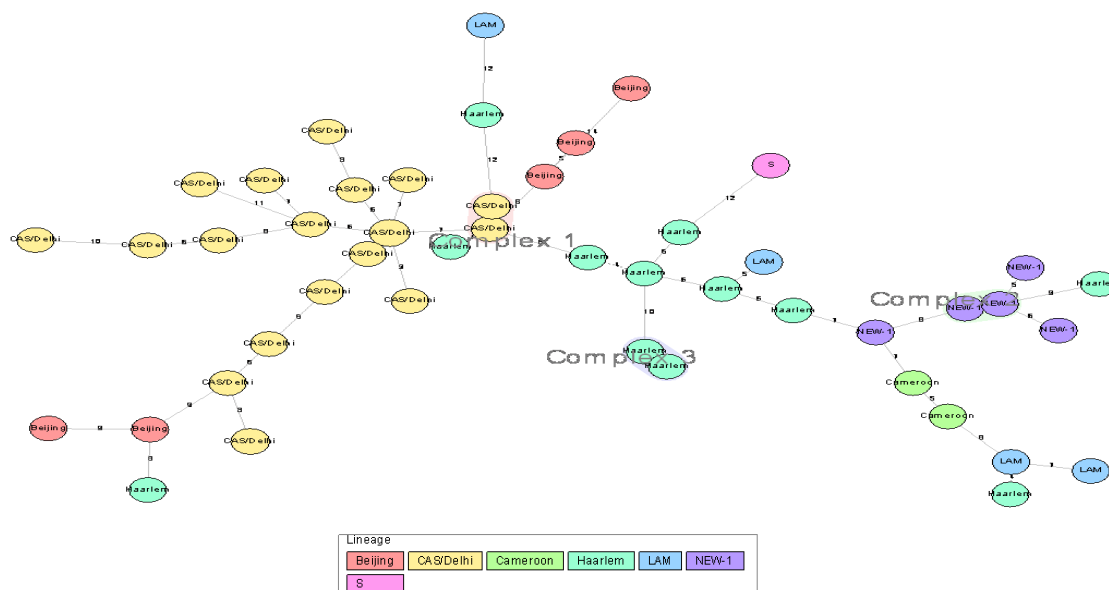
لوکوس	HGDI	لوکوس	HGDI	لوکوس	HGDI
MIRU02	۰/۴۲۸	MIRU20	۰/۱۵۷	MIRU26	۰/۶۹۶
Mtub04	۰/۶۴۷	QUB11b	۰/۴۷۳	MIRU27	۰/۳۵۱
ETRC	۰/۶۴۴	ETRA	۰/۵۶۳	Mtub34	۰/۳۰۱
MIRU04	۰/۴۸۳	Mtub29	۰/۲۲۹	MIRU31	۰/۴۹۲
MIRU40	۰/۴۰۱	Mtub30	۰/۵۳۱	Mtub39	۰/۶۲۳
MIRU10	۰/۸۰۴	ETRB	۰/۶۲۰	QUB26	۰/۹۱۸
MIRU16	۰/۷۵۹	MIRU23	۰/۵۸۳	QUB4156	۰/۸۳۲
Mtub21	۰/۷۵۸	MIRU24	۰/۲۰۶	MIRU39	۰/۶۵۳

MIRU23, Mtub30, MIRU40, MIRU04, QUB11b, Mtub34, MIRU27, MIRU24, MIRU31) تنوع آلی متوسطی را نشان دادند (HGDI بین ۰/۳ تا ۰/۶) و سایر لوکوس‌ها (MIRU20, Mtub29) تنوع آلی ضعیفی داشتند ($HGDI < 0.3$). تنوع آلی لوکوس‌های MIRU-VNTR در جدول ۲ نشان داده شده است.

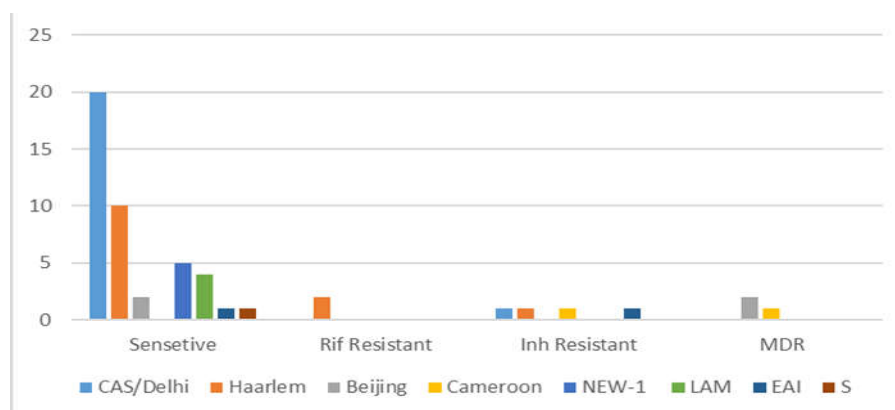
همچنین تنوع آلی برای هر کدام از لوکوس‌های MIRU-VNTR محاسبه شد که QUB26 بالاترین میزان تنوع را داشت ($h=0.98$). در بین لوکوس‌های مورد بررسی، دوازده لوکوس (MIRU16, MIRU10, Mtub04, ETRB, MIRU26, Mtub21, ETRC, QUB26, MIRU39, QUB4156, MIRU39) تنوع آلی بالایی را نشان دادند ($h>0.6$). همچنین ۱۰ لوکوس (MIRU02)

جدول ۲. تنوع آلی (h) هر کدام از لوکوس های MIRU-VNTR

لوکوس	تنوع آلی	لوکوس	تنوع آلی	لوکوس	تنوع آلی
MIRUo2	۰/۵	MIRU20	۰/۱۸	MIRU26	۰/۶۸
Mtubo4	۰/۶۸	QUB1b	۰/۴۸	MIRU27	۰/۴۶
ETRC	۰/۶۳	ETRA	۰/۶	Mtub34	۰/۳۷
MIRUo4	۰/۴۷	Mtub29	۰/۲۵	MIRU31	۰/۵
MIRU40	۰/۴۶	Mtub30	۰/۵۲	Mtub39	۰/۶۹
MIRU10	۰/۷۹	ETRB	۰/۶۱	QUB26	۰/۹۸
MIRU16	۰/۷۷	MIRU23	۰/۵۹	QUB4156	۰/۹۴
Mtub21	۰/۷۶	MIRU24	۰/۳۲	MIRU39	۰/۶۵



شکل ۲. Minimum spanning tree (MST) رسم شده بر اساس ۲۴ لوکوس MIRU-VNTR که نشان دهنده ارتباط فیلوژنیک ۵۰ جدایه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس است.



شکل ۳. رابطه بین ژنوتایپ های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و حساسیت دارویی

بحث

عبارتند از: هند (۲۶٪)، اندونزی (۸/۵٪)، چین (۸/۴٪)، فیلیپین (۶٪)، پاکستان (۵/۷٪)، نیجریه (۴/۴٪)، بنگلادش (۳/۶٪) و آفریقای جنوبی (۳/۶٪). همچنین ایران در همسایگی کشورهایی مانند آذربایجان و پاکستان با میزان

سل نوعی بیماری عفونی است و سالیانه سلامت میلیون ها انسان را در جهان به خطر می اندازد. از نظر جغرافیایی، هشت کشور دو سوم از کل موارد مبتلا به سل را شامل می شوند که

بالای بروز MDR است (۳). بر طبق گزارش سازمان بهداشت جهانی و سایت مرکز مدیریت بیماری های واگیر اداره کنترل سل و جذام، میزان شیوع سل در ایران ۹/۶۹ نفر در هر ۱۰۰۰۰ جمعیت بوده است (۳). امروزه تعیین ژنوتایپ های سویه های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در ردیابی زنجیره انتقال، یافتن منشأ عفونت و در کنترل بیماری بسیار مهم است. یکی از روش های ژنوتایپینگ اختصاصی و حساس برای تایپینگ مایکوباکتریوم توبرکلوزیس که امروزه مورد توجه قرار گرفته است، روش MIRU-VNTR است. Supply و همکارانش در سال ۲۰۰۱ نشان دادند که این روش برای ژنوتایپ مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کاملاً اختصاصی و حساس است (۱۷). در این مطالعه از روش تایپینگ مولکولی MIRU-VNTR استفاده شد که قدرت افتراقی ۰/۹۲۹ به دست آمد که نشان دهنده قدرت تمایز بالای این روش بود.

در مطالعه بابایی و همکارانش نیز قدرت افتراق ۰/۹۹۹ گزارش شد (۱۸). Almaraz و همکارانش قدرت افتراقی این روش را ۰/۹۶۱ به دست آوردند (۱۹). هم چنین منصوری و همکارانش نیز قدرت افتراقی را ۰/۹۹۲ اعلام کردند که نشان دهنده کارایی تایپینگ مولکولی MIRU-VNTR است (۲۰).

در این مطالعه، تعداد ۵۰ سویه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس جهت بررسی مورد مطالعه قرار گرفتند. در مطالعه حاضر ژنوتایپ غالب، CAS/Delhi گزارش شد. در مطالعه ای که توسط منصوری و همکارانش در استان گلستان انجام شد، یک سوم سویه های مورد مطالعه مربوط به ژنوتایپ CAS/Delhi بودند. در مطالعه مذکور نشان داده شد که اکثر جدایه های خانواده CAS متعلق به بیمارانی بودند که از استان سیستان و بلوچستان به استان گلستان مهاجرت کرده بودند (۲۱). این موضوع حائز اهمیت است که ژنوتایپ CAS/Delhi به عنوان ژنوتایپ غالب در کشورهای اطراف ایران نظیر عربستان سعودی، افغانستان، پاکستان و هند شیوع فراوانی دارد و ممکن است این امر با مهاجرت و مسافرت و تجارت با شیوع آن در ایران ارتباط داشته باشد (۲۴-۲۱).

ژنوتایپ Haarlem، بعد از ژنوتایپ CAS/Delhi بیشترین فراوانی (۲۴ درصد) را در مطالعه ما نشان داد. دو سویه مقاوم به ریفامپین و یک سویه مقاوم به ایزونیازید در مطالعه فوق متعلق به این ژنوتایپ بودند. در مطالعه ولایتی و همکارانش ژنوتایپ های CAS، Haarlem و Beijing غالب ترین ژنوتایپ ها در میان موارد مقاوم به ریفامپین بودند. با این حال، این ژنوتایپ ها نیز در میان جدایه های حساس یافت شدند. بنابراین، این ژنوتایپ ها ممکن است رایج ترین سویه های در

حال گردش باشند و لزوماً در ارتباط با سویه مقاوم به ریفامپین نیستند (۲۵).

در مطالعه ما ۱۰ درصد از ژنوتایپ های مورد بررسی متعلق به ژنوتایپ New-1 بود. در یک مطالعه متاآنالیز، این ژنوتایپ در بین ۸۳۲۹ نمونه بالینی در ایران، به عنوان سویه غالب در حال گردش در ایران (۲۱/۹۴٪) شناخته شد (۲۶). از آنجایی که ژنوتایپ های New-1 و CAS/Delhi به ویژه در کشورهای آسیایی به عنوان ژنوتایپ های در حال گردش مایکوباکتریوم توبرکلوزیس شناخته شده اند، این نتایج دور از ذهن نیست (۲۷).

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که سویه های مورد بررسی، متعلق به دودمان های یک تا چهار مایکوباکتریوم توبرکلوزیس هستند و این نشان دهنده وجود تنوع بالا در سویه های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در مطالعه حاضر است.

ژنوتایپ های Haarlem، NEW-1، LAM و S، Cameroon در مطالعه ما مربوط به دودمان چهار (Euro-American) بودند. دودمان Euro-American به طور گسترده ای در جهان توزیع شده اند و به نظر می رسد که همراه با دودمان دو در مقایسه با دودمان های محدود شده از نظر جغرافیایی دارای قدرت بیماری زایی بالاتری هستند (۳۰-۲۸). در واقع نیمی از سویه های مورد مطالعه ما مربوط به این دودمان بودند. در مطالعه ای Stucki و همکارانش نشان دادند که دودمان Euro-American از نظر ژنتیکی و فنوتیپی تنوع بالایی دارد و این تنوع الگو، انواع مختلف زیر شاخه های این دودمان را در مناطق مختلف جهان تعیین کند (۳۰). در اکثریت سویه های مقاوم به دارو در این مطالعه (۲ نمونه از ۳ سویه مقاوم به دارو)، سویه غالب، ژنوتایپ Beijing بود. ژنوتایپ Beijing دارای انتشار جهانی است و در بیشتر مطالعات، سویه های مقاوم به دارو مربوط به این ژنوتایپ هستند. احتمالاً ژنوتایپ در گردش بین سویه های MDR مربوط به این ژنوتایپ هستند که در کشورهای مجاور ایران در گردش هستند (۲۶، ۳۱).

در مطالعه حاضر، ۴۴ نمونه دارای الگوی ژنتیکی غیر مشابه بودند. هم راستا با این مطالعه، در مطالعه اصغرزاده و همکارانش و همچنین عظیمی و همکارانش، اکثریت سویه ها الگوی ژنتیکی غیر مشابه را نشان دادند (۳۲، ۳۳). عدم تشابه الگوی ژنوتایپی می تواند ناشی از ناهمگونی جمعیت تهران و مهاجرت پذیر بودن این کلان شهر باشد.

تنوع آلی و قدرت افتراقی لوکوس های VNTR در مطالعات مختلف ارزیابی شده است. نتایج این مطالعات نشان داد که قدرت افتراقی ممکن است تحت تاثیر توزیع جغرافیایی ایزوله ها و پلی مورفیسم سویه ها در مناطق خاص باشد. در

در نتیجه، در این مطالعه ژنوتایپ CAS/Delhi و Beijing به ترتیب به عنوان ژنوتایپ‌های غالب در سویه‌های حساس به دارو و MDR معرفی شدند. با توجه به میزان شیوع سل در ایران و به علت مهاجرت پناه جویان افغانستانی و همسایگی با کشورهای با شیوع بالای سل از جمله عراق و ترکمنستان به عنوان کانون‌های سل دنیا، دستیابی به ساختار جمعیتی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می‌تواند به ردیابی زنجیره انتقال، اتخاذ سیاست‌های کنترل، درمان و واکسن‌های جدید کمک شایانی کند.

تشکر و قدردانی

کمال تشکر را از کلیه پرسنل بخش سل و تحقیقات ریوی انستیتو پاستور ایران که در این طرح ما را یاری رساندند، اعلام می‌داریم.

برخی از مطالعات چندین لوکوس از VNTR که دارای تنوع آلی و قدرت افتراقی بالایی هستند، را به عنوان یک روش استاندارد تایپینگ مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و شناسایی ژنوتیپ‌های خاص پیشنهاد داده‌اند (۲۰، ۳۷-۳۴).

در این مطالعه، لوکوس QUB26 بالاترین قدرت افتراقی و تنوع آلی را نشان داده که با مطالعه عظیمی و همکارانش در ایران مطابقت داشت (۳۳). شی و همکارانش در چین بالاترین قدرت افتراقی را، در لوکوس QUB11b برای افتراق سویه Beijing و بالاترین قدرت افتراقی را در لوکوس‌های QUB11b، mtub-21، MIRU-26، MIRU-10 و mtub-04 در سویه‌های غیر Beijing گزارش کردند (۳۸). این امر نشان دهنده ارزش لوکوس‌های مختلف در قدرت افتراق ژنوتایپ‌های متفاوت است.

REFERENCES

1. Zink AR, Sola C, Reischl U, Grabner W, Rastogi N, Wolf H, et al. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* complex DNAs from Egyptian mummies by spoligotyping. *J Clin Microbiol* 2003;41:359-67.
2. Lee H-M, Yuk J-M, Shin D-M, Jo E-K. Dectin-1 is inducible and plays an essential role for mycobacteria-induced innate immune responses in airway epithelial cells. *J Clin Immunol* 2009;29:795.
3. World Health Organization. Global TB report 2019. Geneva, Switzerland: WHO; 2019.
4. Idh J, Andersson B, Lerm M, Raffetseder J, Eklund D, Woksepp H, et al. Reduced susceptibility of clinical strains of *Mycobacterium tuberculosis* to reactive nitrogen species promotes survival in activated macrophages. *PloS one* 2017;12:e0181221.
5. Di Pietrantonio T, Schurr E. Host-Pathogen Specificity in Tuberculosis. The New Paradigm of Immunity to Tuberculosis: *Adv Exp Med Biol* 2013;783:33-44.
6. Gagneux S, Small PM. Global phylogeography of *Mycobacterium tuberculosis* and implications for tuberculosis product development. *Lancet Infect Dis* 2007;7:328-37.
7. Nicol MP, Wilkinson RJ. The clinical consequences of strain diversity in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2008;102:955-65.
8. Yimer SA, Norheim G, Namouchi A, Zegeye ED, Kinander W, Tønjum T, et al. *Mycobacterium tuberculosis* lineage 7 strains are associated with prolonged patient delay in seeking treatment for pulmonary tuberculosis in Amhara Region, Ethiopia. *J Clin Microb* 2015;53:1301-9.
9. Agielski T, van Ingen J, Rastogi N, Dziadek J, Mazur PK, Bielecki J. Current methods in the molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* and other mycobacteria. *Biomed Res Int* 2014;2014:645802.
10. Ravansalar H, Tadayon K, Mosavari N, Derakhshan M, Ghazvini K. Genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from patients in the Northeast of Iran by MIRU-VNTR and spoligotyping. *Jundishapur J Microbiol* 2016; 10: e39568.
11. Kremer K, Arnold C, Cataldi A, Gutiérrez MC, Haas WH, Panaiotov S, et al. Discriminatory power and reproducibility of novel DNA typing methods for *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *J Clin Microb* 2005;43:5628-38.
12. McLernon J, Costello E, Flynn O, Madigan G, Ryan F. Evaluation of mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat analysis and spoligotyping for genotyping of *Mycobacterium bovis* isolates and a comparison with restriction fragment length polymorphism typing. *J Clin Microb* 2010;48:4541-5.
13. 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 Microb* 2006;44:4498-510.

14. Azé J, Sola C, Zhang J, Lafosse-Marin F, Yasmin M, Siddiqui R, et al. Genomics and machine learning for taxonomy consensus: the *Mycobacterium tuberculosis* complex paradigm. PloS one 2015;10:e0130912.
15. Christianson S, Wolfe J, Orr P, Karlowisky J, Levett PN, Horsman GB, et al. Evaluation of 24 locus MIRU-VNTR genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Canada. Tuberculosis 2010;90:31-8.
16. Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. J Clin Microb 1988;26:2465-6.
17. Supply P, Lesjean S, Savine E, Kremer K, Van Soolingen D, Locht C. Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. J Clin Microb 2001;39:3563-71.
18. Babai Kochkarsarai M, Kaboosi H, Ghaemi EA. Genetic variation of the *Mycobacterium tuberculosis* in north of Iran; the Golestan Province. Iran Red Crescent Med J 2019;21: e91553.
19. Almaraz-Velasco R, Munro-Rojas D, Fuentes-Domínguez J, Muñiz-Salazar R, Ibarra-Estela MA, Guevara-Méndez AD, et al. A first insight into the genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in Veracruz, Mexico. Int J Mycobacteriol 2017;6:14.
20. Mansoori N, Yaseri M, Vaziri F, Douraghi M. Genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates circulating in an area with high tuberculosis incidence: Using 24-locus MIRU-VNTR method. Tuberculosis 2018;112:89-97.
21. Mansoori N, Vaziri F, Amini S, Khanipour S, Dizaji SP, Douraghi M. Spoligotype and Drug Susceptibility Profiles of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Isolates in Golestan Province, North Iran. Infect Drug Resist 2020;13:2073.
22. Al-Hajoj S, Varghese B, Al-Habobe F, Shoukri MM, Mulder A, van Soolingen D. Current trends of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology in Saudi Arabia and associated demographical factors. Infect Genet Evol 2013;16:362-8.
23. Shafee M, Abbas F, Tanveer Z, Whitelaw A, Tow LA, Ashraf M, et al. Predominance of Central Asian strain (ST 26) in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Balochistan by spoligotyping. J Infect Dev Ctries 2019;13:619-25.
24. Sharma P, Katoch K, Chandra S, Chauhan DS, Sharma VD, Couvin D, et al. Comparative study of genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* from a Northern Indian setting with strains reported from other parts of India and neighboring countries. Tuberculosis 2017;105:60-72.
25. Velayati AA, Farnia P, Mozafari M, Sheikholeslami MF, Karahrudi MA, Tabarsi P, et al. High prevalence of rifampin-monoresistant tuberculosis: a retrospective analysis among Iranian pulmonary tuberculosis patients. The Am J Trop Med Hyg 2014;90:99-105.
26. Hadifar S, Fateh A, Pourbarkhordar V, Siadat SD, Mostafaei S, Vaziri F. Variation in *Mycobacterium tuberculosis* population structure in Iran: a systemic review and meta-analysis. BMC Infec Dis 2021;21:1-11.
27. Hadifar S, Kamakoli MK, Fateh A, Siadat SD, Vaziri F. Enhancing the differentiation of specific genotypes in *Mycobacterium tuberculosis* population. Sci Rep 2019;9:1-9.
28. Brites D, Gagneux S. The nature and evolution of genomic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Strain Variation in the *Mycobacterium tuberculosis* Complex: Its Role in Biology, Epidemiology and Control. Adv Exp Med Biol 2017; 1-26.
29. Gagneux S, Editor. Strain variation in the *Mycobacterium tuberculosis* complex: its role in biology, epidemiology and control. Switzerland: Springer International Publishing; 2017.
30. Stucki D, Brites D, Jeljeli L, Coscolla M, Liu Q, Trauner A, et al. *Mycobacterium tuberculosis* lineage 4 comprises globally distributed and geographically restricted sublineages. Nat Genet 2016;48:1535-43.
31. Vaziri F, Kohl TA, Ghajavand H, Kamakoli MK, Merker M, Hadifar S, et al. Genetic diversity of multi-and extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates in the capital of Iran, revealed by whole-genome sequencing. J Clin Microb 2019 2;57:01477-18.
32. 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;11:124-31.
33. Azimi T, Shariati A, Fallah F, Imani Fooladi AA, Hashemi A, Goudarzi H, et al. *Mycobacterium tuberculosis* genotyping using MIRU-VNTR typing. J Mazandaran Uni Med Sci 2017;27:40-8.
34. Zhao Y, Feng Q, Tang K, Zhang C, Sun H, Luo T, et al. The population structure of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Sichuan in China. Infect Genet Evol 2012;12:718-24.

- 35.Luo T, Yang C, Pang Y, Zhao Y, Mei J, Gao Q. Development of a hierarchical variable-number tandem repeat typing scheme for *Mycobacterium tuberculosis* in China. PloS one 2014;9:e89726.
- 36.Iwamoto T, Yoshida S, Suzuki K, Tomita M, Fujiyama R, Tanaka N, et al. Hypervariable loci that enhance the discriminatory ability of newly proposed 15-loci and 24-loci variable-number tandem repeat typing method on *Mycobacterium tuberculosis* strains predominated by the Beijing family. FEMS Microbial 2007;270:67-74.
- 37.Shamputa IC, Lee J, Allix-Béguec C, Cho E-J, Rajan V, Lee EG, et al. Genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a tertiary care tuberculosis hospital in South Korea. J Clin Microb 2010;48:387-94.
- 38.Shi J, Zheng D, Zhu Y, Ma X, Wang S, Li H, et al. Role of MIRU-VNTR and spoligotyping in assessing the genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in Henan Province, China. BMC Infec Dis 2018;18:1-12.