مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان/ دوره چهاردهم/ زمستان ۱۳۸۸/ ۳۹-۲۹

بررسی تنوع ژنتیکی سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس جدا شده از بیمارستان مسیح دانشوری تهران با استفاده از تکنیک MIRU –VNTR

مهدی جعفریان[۱]، پریسا فرنیا[۲]، محمد کارگر[۳]، موئد اغالی میرزا[۴]، رشید رمضان زاده[۵]، مجتبی احمدی[۶]، محمد رضا مسجدی[۷]، علی اکبر ولایتی[۸]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم (مؤلف مسؤول)، مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی- تهران، تهران، ایران تلفن ۰۲۱-۲۶۱۰۹۵۰۵ mehdijafariandormency@gmail.com

۲- دانشیار گروه میکروبیولوژی، علوم پزشکی و خدمات پزشکی بهداشتی درمانی شهید بهشتی- تهران، مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی، تهران، ایران

۳- استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم، تهران، ایران

۴- دانشجوی دوره دکترای پزشکی، دانشگاه اربیل، اربیل، عراق

۵- استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی کردستان، تهران، ایران

۶- کارشناس میکروب شناسی، آزمایشگاه رفرانس سل کشوری، مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی، تهران، ایران

۷- استاد گروه داخلی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی - تهران، مرکز تحقیقات سل و بیماری‌های ریوی، تهران، ایران

۸- استاد گروه اطفال، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی- تهران، مرکز تحقیقات سل و بیماری‌های ریوی، تهران، ایران

چکیده

زمینه و هدف: امروزه پیدایش سویه‌های MDR به عنوان یک مشکل جدی در برابر برنامه کنترل بیماری سل در اغلب کشورها و در سطح جهانی مطرح است. از سال ۱۹۹۰ تاکنون موارد متعددی از گسترش سل MDR در مناطق مختلف جهان گزارش شده است، که عمدتاً به دلیل استفاده نابجا و نادرست از داروهای سل است. از علل اصلی بروز مقاومت دارویی به عنوان یک عارضه ساخت دست بشر می‌توان به اشتباه در طبقه‌بندی، عدم پایش حین درمان بیماران و عدم نظارت در مصرف داروهای ضد سل اشاره نمود. هدف این مطالعه بررسی تنوع ژنتیکی سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس جدا شده از بیماران با استفاده از تکنیک MIRU-VNTR می‌باشد.

روش بررسی: در این مطالعه از ۹۶ سویه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس جدا شده از بیماران مبتلاء به سل ریوی تست‌های حساسیت دارویی به عمل آمد و تنوع ژنتیکی سویه‌ها براساس لوکوس‌های MIRU-VNTR محاسبه گردید. اختلاف آللی هر کدام از لوکوس‌ها با استفاده از فرمول آماری HGDI بدست آمد.

یافته‌ها: بررسی الگوی ژنتیکی سویه‌های حساس نشان داد که این سویه‌ها متعلق به خانواده‌های Dehli/CAS، Haarlem، LAM، H37RV، Caprae می‌باشند. در صورتیکه در سویه‌های مقاوم به دارویی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بیشتر الگوی ژنتیکی خانواده‌های Haarlem و LAM به چشم می‌خورد. اختلاف آللی لوکوس‌های سویه‌های حساس و مقاوم معنی‌دار نمی‌باشد. به طور کلی لوکوس‌هاس 2، 4، 20، 24، 27 به عنوان کمترین اختلاف آللی به میزان (HGDI $\leq$۳) و لوکوس های 10، 16، 26، 31 و 40 بیشترین اختلاف آللی به میزان (HGDI $\geq$ ۶) را در بین لوکوس ها سویه‌های حساس و مقاوم شناسائی شدند.

نتیجه گیری: نتایج نشان داد که بیشترین تنوع ژنتیکی سویه‌های حساس و مقاوم به دارو به خانواده‌های Haarlem و Dhli/CAS تعلق داشتند و تکنیک استفاده شده MIRU-VNTR در این مطالعه برای بررسی تنوع ژنتیکی سویه‌های مایکوباکتریوم روشی سریع، دقیق و ارزان می‌باشد و در جمعیت‌های با فراوانی بالا به راحتی می‌توان از این تکنیک استفاده نمود.

کلید واژه ها: مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، مولکولار اپیدمیولوژی، الگوی ژنتیکی، MIRU-VNTR

وصول مقاله: ۸۸/۹/۳۰ اصلاحیه نهایی: ۸۸/۱۲/۵ پذیرش مقاله: ۸۹/۱/۹

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-09]

مقدمه

امروزه سل MDR[1] با شیوع روز افزون خود کنترل سل در دنیا را با مشکل مواجه ساخته است. از یک طرف فقدان داروهای جدید ضد سل و از طرف دیگر مقاومت رو به افزایش به داروهای ضد سل خط دوم موجود بر پیچیدگی موضوع افزوده است. لذا تحقیقات گسترده‌ای در حال حاضر در دنیا در مورد تشخیص درمان و تولید داروهای جدید ضد سل در حال انجام است. انگشت نگاری DNA از سویه‌های مایکوباکتریوم ابزاری مناسب برای مطالعه اپیدمی انتشار عفونت‌های ناشی از این سویه می‌باشد. غالباً از روش انگشت نگاری RFLP[2] برای بررسی شیوع عفونت‌های سلی در بیمارستانها، زندان‌ها و همچنین مطالعات اپیدمیولوژی در یک کشور استفاده می‌شود (۱). اما روش انگشت نگاری RFLP که بر پایه قطعه IS6110 استوار است، دارای یک سری محدودیت‌هایی از قبیل: کمبود بودن مقدار DNA و کم بودن تعداد کپی‌های قطعه IS6110 در نمونه‌ها می‌باشد (۲). با این که روشهای زیادی از انگشت نگاری DNA طی سالهای اخیر برای سویه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس ارائه شده است، اما برخی از این روشها بی‌فایده و تنها تعداد کمی از آنها هستند که در اکثر آزمایشگاه‌های مورد استفاده قرار می‌گیرند (۳). یکی از روشهایی که اخیراً ارائه شده روشی است که بر پایه توالی‌های تکراری و متغیر که تحت عنوان (VNTR[3]) می‌شناسند استوار است. به توالی‌های تکراری متغیر و پراکنده‌ای که به طور تصادفی در ژنوم مایکوباکتریوم قرار گرفته‌اند، (MIRU) می‌گویند (۴). بر اساس همین توالی‌ها است که الگوی ژنتیکی هر سویه در تکنیک MIRU-VNTR[1] مشخص می‌شود. هر سویه دارای یک الگوی ژنتیکی خاص خود می‌باشد که به این ترتیب می‌توان خانواده هر سویه را مشخص و طبقه‌بندی نمود (۵). تاکنون ۴۱ لوکوس MIRU[4] در ژنوم H37RV (سویه استاندارد مایکوباکتریوم توبرکلوزیس) شناسائی شده است، ۲۹ لوکوس آن قبلاً توسط دکتر supply و همکارانش در سال ۱۹۹۷ و مابقی آنها اخیراً گزارش شده، لوکوس‌های MIRU توالی‌های حدود ۴۰ تا ۱۰۰ نوکلئوتیدی هستند که به صورت تصادفی و تکراری در ژنوم مایکوباکتریوم قرار گرفته‌اند (۶). MIRU بر اساس طبقه‌بندی به ۳ نوع اصلی تقسیم می‌شود. نوع اول شامل توالی‌های حدود ۷۷ نوکلئوتید نوع دوم و سوم توسط شکافهای ۱۵ و ۲۴ نوکلئوتیدی به انتهای ۳ و ۵ توالی‌های نوع اول متناظر می‌شوند. ترکیب MIRU ۲ و ۳ که شامل شکافهایی از هر دو نوع می‌باشند را می‌توان در لوکوس ۸ و ۲۰ یافت (۷). اغلب لوکوس‌های MIRU با ژنهای مجاور یا با ژنهای نواحی شروع خواندن و کدونهای پایانی همپوشانی دارند، برخی از این لوکوس‌های MIRU را می‌توان در درون این نواحی یافت. اطلاعات مربوط به این لوکوس‌ها را می‌توان در جدول ۱ مشاهده نمود (۸). هدف از این مطالعه بررسی تنوع ژنتیکی سویه‌های مایکوباکتریوم جدا شده از بیماران مراجعه به بیمارستان مسیح دانشوری، با استفاده از تکنیک MIRU-VNTR بود.

1. Multi Drugs Resistance
2. Restrictio Fragment Length Polymorphism
3. Variable Number Tandem Repeat
4. Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-09]

جدول ۱: اطلاعاتی در خصوص ۱۲ لوکوس MIRU-VNTR ، موقعیت لوکوس‌ها، تعداد تکرار و اندازه توالی‌های تکراری بر روی ژنوم سویه استاندارد H37RV

نام لوکوس	آلل لوکوس	موقعیت لوکوس بر روی ژنوم H37RV	تعداد تکرارها	اندازه توالی‌های تکراری (bp)
H37RV 0157-53 bp	MIRU2	154111	4 (1 - 4)	53
H37RV 0580-77 bp	MIRU4	580546	11(0-7 , 9 , 11,3)	77
H37RV-0959-53bp	MIRU10	959868	8(1-5 , 7-9)	53
H37RV-1644-53 bp	MIRU16	1644026	4 (1 – 4)	53
H37RV-2059-77bp	MIRU 20	2059429	2	77
H37RV-2531-53 bp	MIRU23	2531560	6 (1 – 6)	53
H37RV-2387-54 bp	MIRU24	2684427	2 (1 – 2)	52
H37RV-2996-51 bp	MIRU26	2996002	10 (1- 10)	51
H37RV-3006-53 bp	MIRU27	3006875	5 (0 – 4)	53
H37RV-3192-53bp	MIRU31	3192168	5 (2 – 6)	53
H37RV-4348-53bp	MIRU39	4348401	4 (1 – 4)	53
H37RV-0802-54 bp	MIRU40	802194	6 (1-4 , 6 – 7)	54

روش بررسی

از ۹۴ بیمار سل ریوی که در بین سالهای ۸۸-۸۷ به مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی، آزمایشگاه رفرانس سل کشوری (بیمارستان مسیح دانشوری) مراجعه کرده بودند الگوی ژنتیکی MIRU-VNTR مورد بررسی قرار گرفت. جداسازی اولیه سویه‌های مایکوباکتریوم با روش پتروف ۴٪ و با استفاده از محیط (LJ[1]) انجام شد. حساسیت داروئی در برابر ایزونیازید (2% µg/ml)، ریفامپین (40µg/ml)، استرپتومایسین (10µg/ml) و اتامبوتول (2µg/ml) به روش تناسبی انجام شد و سویه‌ها به گروه‌های حساس و مقاوم به دارو تقسیم شدند.

DNA که برای واکنشهای زنجیره‌ای پلیمراز استفاده می‌شد از محیط کشت حاوی مایکوباکتریوم جداسازی می‌گردید. به این طریق که با لوپ از کلنی که بر روی محیط کشت قرار دارد برداشته و در400 µL ، TE بافری که حاوی (۱۰ میلی مولار Tris – Hcl، ۱ میلی مولار EDTA با ۸ =pH) اضافه می‌کردیم. برای غیر فعال کردن باکتریها، آنها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده می‌شدند. DNA به وسیله مراحل چندگانه CTAB استخراج و در 100 میکرولیتر TE بافر حل می‌شد. واکنشهای MIRU-NTR PCR[2] در یک حجم ۲۵ میکرولیتر تهیه می‌گردید که ۱ میکرولیتر از آن حاوی DNA، بقیه حجم واکنش را d NTP، Mgcl2، PCR buffer و پرایمرهای اختصاصی MIRU که در جدول ۲ نیز نشان داده شده است تشکیل می‌داد. همه واکنشهای زنجیره‌ای پلیمراز، MIRU به مدت ۵ مرحله denaturizing و مرحله extension را نیز در مدت ۱۰ دقیقه طی می‌شد، کل واکنشهای PCR ، MIRU در 35 سیکل انجام می‌شد. دمای annealing که در مدت ۱ دقیقه برای همه لوکوس‌های MIRU بوده به ترتیب لوکوس‌های 2، 4، 10، 16، 20، 23 ، 24، 26، 27، 31، 39 و 40 عبارتند از: 61، 60، 64،67، 65، 64، 64،65، 58، 63 و 61 می‌باشد.

1. Lowenstein Jensen
2. Polymerase Chain Reaction

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-09]

جدول ۲: مشخصات پرایمرهای مورد استفاده و طول توالی تکثیر شونده مطابق با سویه استاندارد H37RV

Locus of MIRU	Primer sequence (5' ⟶ 3')	اندازه محصولات PCR
2	TGGACTTGCAGCAATGGACCAACT F TACTCGGACGCCGGCTCAAAA` R	508 bp
4	GCGCGAGAGCCCGAACTGC F GCGCAGCAGAAACGTCAGC R	353 bp
10	GTTCTTGACCAACTGCAGTCGTCC F GCCACCTTGGTGATCAGCTACCT R	643 bp
16	TCGGTGATCGGGTCCAGTCCAAGTA F CCCGTCGTGCAGCCCTGGTAC R	671 bp
20	TCGGAGAGATGCCCTTCGAGTTAG F GGAGACCGCGACCAGGTACTTGTA R	591 bp
23	CAGCGAAACGAACTGTGCTATCAC F CGTGTCCGAGCAGAAAAGGGTAT R	873 bp
24	CGACCAAGATGTGCAGGAATACAT F GGGCGAGTTGAGCTCACAGAA R	447 bp
26	CCCGCCTTCGAAACGTCGCT F TGGACATAGGCGACCAGGCGAATA R	614 bp
27	TCGAAAGCCTCTGCGTGCCAGTAA F GCGATGTGAGCGTGCCACTCAA R	657 bp
31	ACTGATTGGCTTCATACGGCTTTA F GTGCCGACGTGGTCTTGAT R	651 bp
39	CGCATCGACAAACTGGAGCCAAAC F CGGAAACGTCTACGCCCCACACAT R	646 bp
40	GGGTTGCTGGATGACAACGTGT F GGGTGATCTCGGCGAAATCAGATA R	408 bp

آنالیز آماری سویه‌های حساس و مقاوم به دارو در این مطالعه به وسیله سایت رفرانس MIRU-VNTR plus انجام شد که در این مطالعه الگوی ژنتیکی هر سویه به صورت جداگانه و با ID اختصاصی خود به سایت داده شد. سایت رفرانس نیز الگوی ژنتیکی دریافتی را بر اساس پارامترهای موجود در خود مقایسه و آنالیز می‌کند. همچنین در این مطالعه اختلاف آللی برای هر ۱۲ لوکوس MIRU به وسیله فرمول آماری HGDI[3] محاسبه گردید.

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^{s} x_j(x_j - 1)$$

در فرمول HGDI:

N: تعداد کل سویه‌های است که مورد مطالعه قرارگرفته.

S: تعداد کل نمونه‌های که الگوی ژنتیک MIRU-VNTR آنها با همدیگر متفاوت است.

Xj: تعداد سویه‌های که متعلق به الگوی ژنتیکی jام می‌باشد.

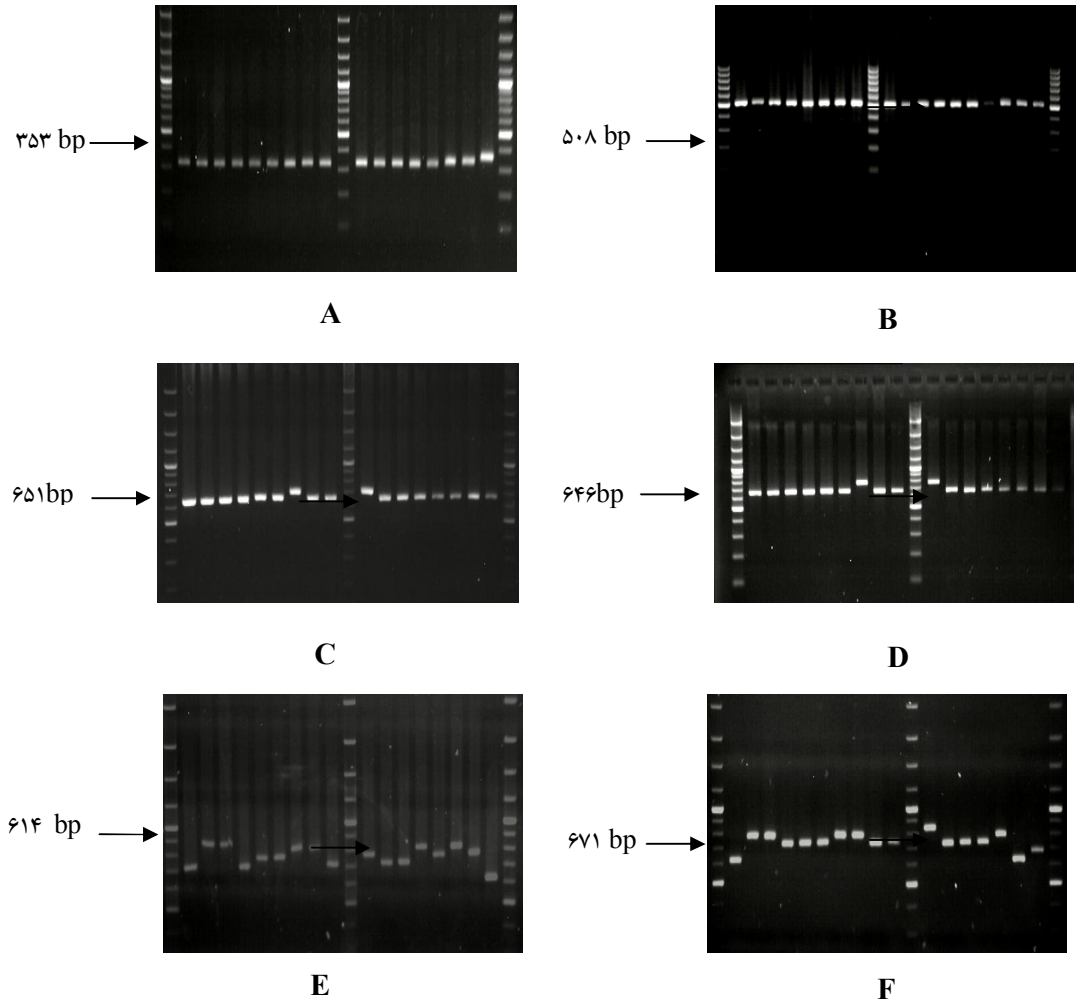
یافته‌ها

از ۹۴ بیمار مراجعه‌کننده به مرکز بیمارستان در بین سال‌های ۸۸-۸۷ که ۴۲ نفر از آنها زن و ۵۲ نفر از آنها مرد بودند. پس از انجام نمونه‌گیری و بررسی تست حساسیت داروئی ۶۱ نفر (۶۵٪) از آنها بیماران مقاوم به دارو و ۳۳ نفر (۳۵٪) حساس به دارو تشخیص داده شد. بررسی مقاومت به داروهای ایزونیازید، ریفامپین، استرپتومایسین و اتامبوتول نشان داد که از ۶۱ بیمار مقاوم به دارو همه آنها به داروی ایزونیازید، ۶۰ نفر (۹۸/۳٪) به داروی ریفامپین، ۲۸ نفر (۴۲/۹٪) به داروی

3. Hunater-Gaston Discriminatory Index

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-09]

استرپتومایسین و ۴۶ نفر (۷۵/۴٪) به داروی اتامبوتول مقاوم می باشند. همچنین اختلاف آللی برای هر لوکوس نیز مطابق با فرمول ذکر شده در قسمت بالا برای هر دو سویه حساس و مقاوم به دارو محاسبه گردید که در آن لوکوس‌های شماره ۲، ۴، ۲۰، ۲۳ و ۲۴ کمترین اختلاف آللی را در بین لوکوس‌های دیگر، به خود اختصاص داده بودند (HGDI ≤۰/۳) لوکوس‌های ۲۷، ۳۱، ۳۹ و ۴۰ لوکوس‌هایی هستند که اختلاف آللی حد واسط می‌باشد (۰/۶ ≤ HGDI ≤۰/۳) اما لوکوس‌های ۱۰، ۱۶، ۲۶ بیشترین اختلاف آللی را در بین لوکوس‌ها MIRU داشتند (HGDI≥۰/۶) که در شکل ۱ نمونه‌ای از لوکوس‌هایی که بیشترین و کمترین اختلاف آللی را هم برای سویه‌های حساس و هم مقاوم به دارو دارند، نشان داده شده است.



شکل ۱: الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگاروز ۱ درصد را نشان می‌دهد که در این تصویر شکل‌های A و B به ترتیب لوکوس‌های ۲ و ۴ کمترین اختلاف آللی به مقدار (HGDI ≤ 3)، شکل C و D لوکوس‌های ۳۱ و ۳۹ که اختلاف آللی آنها در حد متوسط می‌باشد (۶/ ≤ HGDI ≤ ۴/) و اشکال E و F لوکوس‌های ۲۶ و ۱۶ با بیشترین پلی فرفیسم آللی در بین لوکوس‌های MIRU به میزان (۶/ ≤ HGDI) می‌باشد.

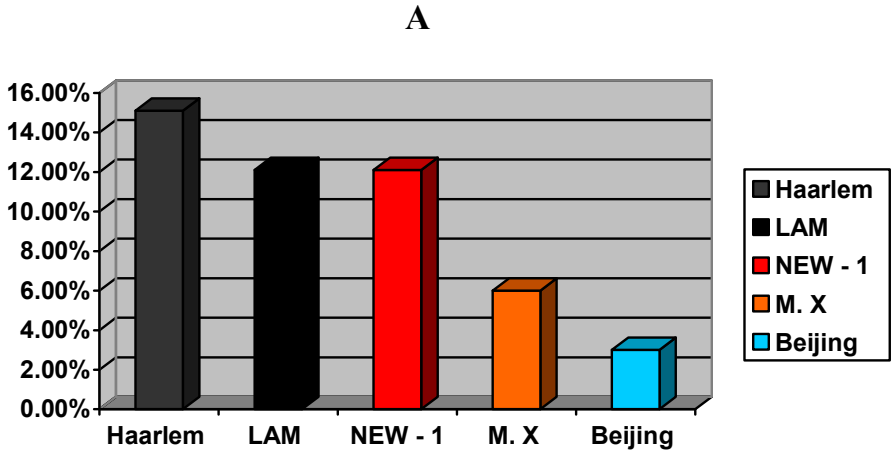
[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-09]

در بخشی دیگر از این مطالعه تعداد تکرار آلل‌ها در سویه‌های حساس و مقاوم که به صورت جداگانه برای هر لوکوس محاسبه گردیده است را در جدول ۳ می‌توان مشاهده نمود. مطابق اطلاعات موجود در جدول کمترین پلی مورفیسم و فراوانی آللی، هم برای سویه‌های حساس و هم برای سویه‌های مقاوم متعلق به لوکوس‌های شماره ۲، ۴ و ۲۴ می‌باشند در حالیکه بیشترین پلی‌مورفیسم به لوکوس‌های ۱۰ ، ۱۶ و ۲۶ تعلق دارند.

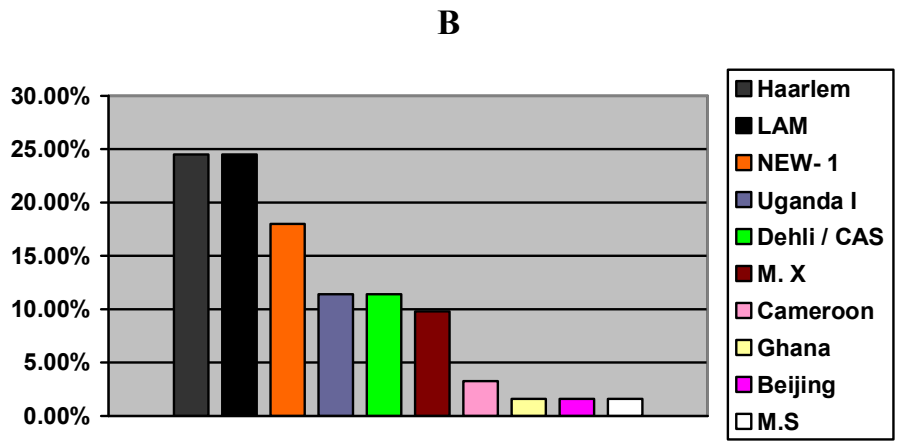
جدول ۳: این جدول نحوه توزیع پروفایل آللی، سویه‌های حساس و مقاوم برای هر لوکوس و همچنین اختلاف آللی هر لوکوس را به صورت جداگانه نشان می‌دهد.

لوکوس	2		4		10		16		20		23		24		26		27		31		39		40	
پروفایل آللی	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S
1	1				1		4	2	2	3			61	33									3	1
2	60	33	61	33	18	16	16	2	59	30					2		3		1			1	5	4
3					14	5	32	18							2		3	1	1		44	20	41	25
4					11		8	10				1			6	7	55	30	40	20	17	12	12	3
5					13	8	1	1			6				24	10		2	8	6				
6					4	3					55	32			13	1			11	7				
7						1									8	9								
8															5	6								
9															1									
HGDI	0	0	0	0	70%	66%	64%	59%	10.00%	14%	16%	10.00%	0.02%	0	78%	76%	17%	14%	51%	54%	42%	52%	50%	38%

آمار نشان داد که تعداد زیادی از سویه های مقاوم به دارو، الگوی ژنتیکی آنها به الگوی ژنتیکی خانواده LAM، Haarlem و Dehli/CAS تشابه بیشتری دارد. در خصوص سویه‌های حساس به دارو نیز نشان داده شد که این سویه‌ها نیز بیشترین تشابهات ژنتیکی را با خانواده NEW-1، Haarlem و خانواده LAM دارند.



[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-09]



نمودار ۱ : نمودارهای A و B هر کدام به ترتیب توزیع فراوانی سویه‌های حساس و مقاوم به داروئی مطالعه شده در این مقاله را نشان می‌دهند که در هر دو نمونه حساس و مقاوم خانواده Haarlem و LAM بیشترین فراوانی توزیع را نسبت به خانواده‌های دیگر دارند.

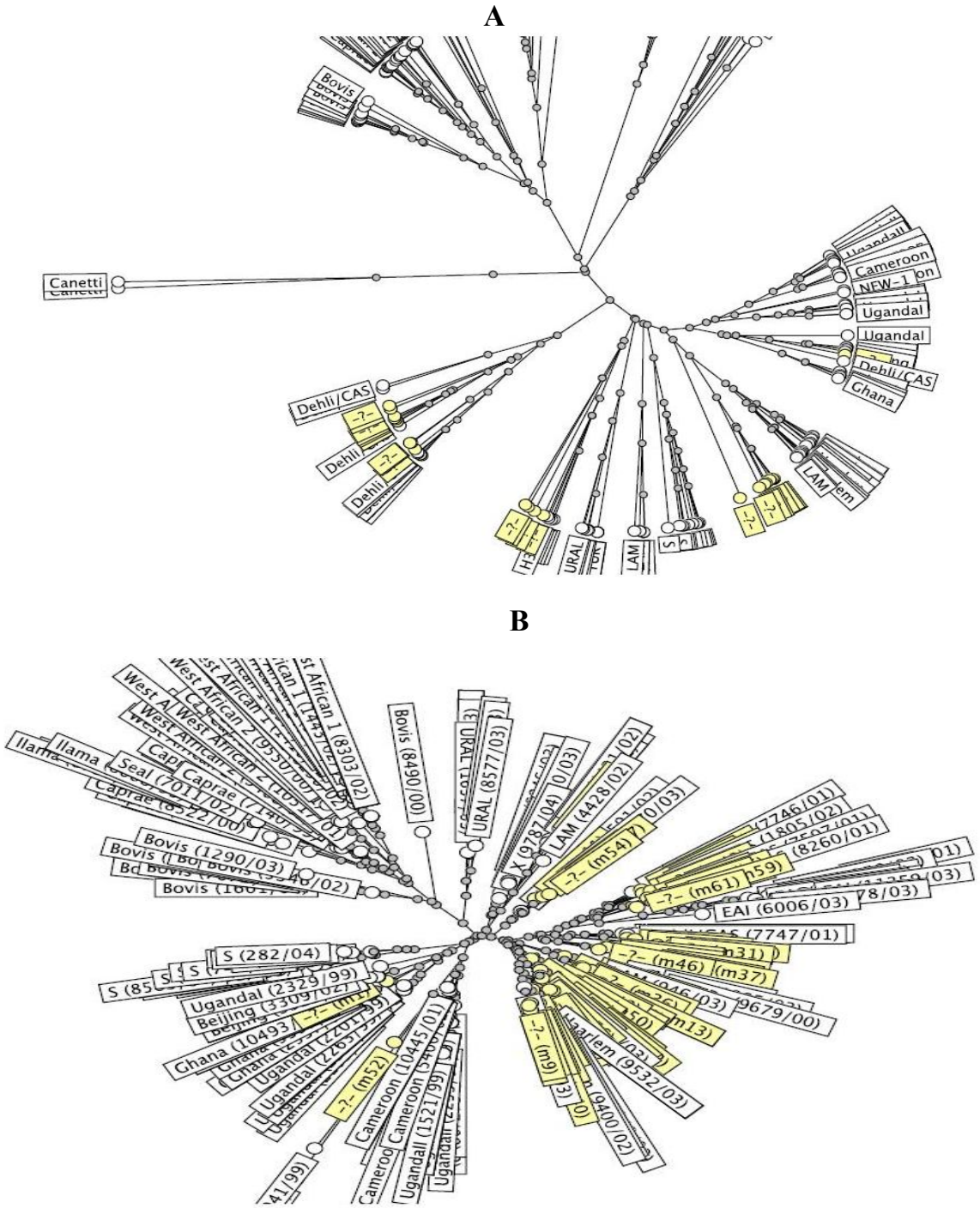
بررسی و مقایسه نمودار درختی سویه‌های حساس و مقاوم به دارو که در آن الگوی ژنتیکی نمونه به طور مستقیم به بانک اطلاعاتی داده شده بود با نمودارهای جعبه‌ای شماره ۱ که در آن الگوی ژنتیکی داده شده به صورت تشابهی با پروفایل‌های استاندارد موجود در بانک مورد مقایسه قرار گرفته بودند، نشان داد که اختلاف چندانی بین آنها وجود نداشت و خانواده پیشنهادی از طرف سایت در هر دو قسمت با همدیگر همخوانی دارند.

بحث

الگوی ژنتیکی هر سویه در هنگام استفاده از ۱۲ لوکوس MIRU به صورت یک فایل ۱۲ رقمی استفاده می‌شد که این ارقام از راست به چپ به ترتیب نشان‌دهنده لوکوس‌های ۲، ۴، ۱۰، ۱۶، ۲۰، ۲۳، ۲۴، ۲۶، ۲۷ ، ۳۱ ، ۳۹ و ۴۰ می‌باشد. به عنوان مثال الگوی ژنتیکی که برای سویه استاندارد H37RV ارائه شده است به ترتیب از راست به چپ عبارتند از ۲، ۳، ۲، ۲، ۶، ۱، ۳، ۳، ۳، ۲ و ۱ می‌باشد (۹). وقتی محصولات PCR نمونه‌های آماده شده را بر روی ژل آگاروز انتقال می‌دادیم، الگوی ژنتیکی هر سویه را بر اساس موقعیت قرارگیری باند مورد نظر محاسبه گردید. انتقال داده‌های محاسبه شده به سایت رفرانس www.MIRU-VNTRplus.org و بررسی داده‌های دریافتی با پارامترهای استاندارد موجود در بانک اطلاعاتی خود سایت نشان داد که، ۱۳/۱٪ از آنها به خانواده LAM، ۶/۵۶٪ از سویه‌های مقاوم به دارو به خانواده NEW-1، ۶/۵۶٪ سویه‌ها به خانواده Haarlem، ۸/۲٪ سویه به خانواده Dehli/Cas، ۳/۲۸٪ به خانواده M.Tb X و ۱/۶۴٪ نیز به خانواده Beijing و باقیمانده سویه‌ها نیز به مقدار کم به سویه‌های canetti، Ghana تعلق داشتند. بررسی الگوی ژنتیکی با همین روش برای سویه‌های حساس به دارو نیز نشان داد که این سویه‌ها به میزان ۵۱٪ به خانواده‌های Haarlem، S و ۳۰٪ از آنها به خانواده Dehli/CAS، ۱۲٪ از سویه‌ها به خانواده H37RV و سویه‌های باقیمانده دیگر با درصد پائین به (میزان ۳٪) به خانواده‌های Caprae و Beijing تعلق

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-09]

داشتند. که نمودار دایره‌ای سویه‌های مقاوم و حساس به شده است.
دارو به ترتیب در اشکال A و B تصویر ۲ نشان داده



شکل ۲: قسمت A و B : شجره درختی و نحوه پراکندگی سویه‌های مقاوم و حساس که بر اساس الگوی ژنتیکی نمونه‌های موجود در سایت MIRU- VNTR plus مقایسه و به گروه های خاص خود توزیع شده است را نشان می‌دهد.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-09]

پس از بدست آوردن پروفایل ژنتیکی هر سویه، سایت رفرانس MIRU-VNTR این امکان را فراهم آورده بود که الگوی ژنتیکی بدست آمده را با الگوهای ژنتیکی جمع‌آوری شده در بانک اطلاعاتی خود مورد مقایسه قرار دهد که فراوانی و درصد تشابهات الگوی‌های ژنتیکی سویه‌های حساس و مقاوم به دارو مطابق نمودار ۱ می‌باشد.

در مطالعه supply و همکارانش در سال ۲۰۰۱ با استفاده از ۱۲ لوکوس MIRU برای ۹۰ سویه که از ۳۰ کشور جداسازی شده بود نشان داد که این متد، روش کاملاً اختصاصی و حساس مربوط به M.tuberculosis می‌باشد. Supply در مقاله خود بیان کرد که از MIRU می‌توان در بخش‌های مختلف برای تنوع ژنتیکی سویه‌های مایکوباکتریوم استفاده نمود. همچنین آنالیز الگوی ژنتیکی سویه‌هایی را می‌توان با استفاده از وب سایتplus MIRU-VNTR انجام داد. ما نیز در تحقیقات خودمان پس از بدست آوردن الگوی ژنتیکی MIRU-VNTR سویه‌های حساس و مقاوم به دارو الگوی ژنتیکی آنها جهت تشخیص فامیلی سویه‌ها توسط وب سایت ذکر شده در این قسمت بررسی و محاسبه گردید (۱۰).

در مطالعه‌ای هم که توسط آقای kai man kam در شهر هنگ کنگ انجام شد از مجموع ۳۵۵ نمونه‌ای که در بین سالهای ۲۰۰۲ و ۲۰۰۳ جداسازی شده بود با استفاده از MIRU-VNTR ۱۲ لوکوسی پس از بدست آوردن الگوهای ژنتیکی سویه‌ها، ۲۴۳ نمونه (۶۸/۵) متعلق به خانواده Beijing بودند. همچنین در این مطالعه نیز اختلاف آللی هر لوکوس با استفاده از فرمول آماری HGDI محاسبه گردید که با نتایج مطالعه ما هماهنگی داشت. در مطالعه kai man kam نیز لوکوس‌های ۱۰، ۱۶ و ۲۶ بیشترین لوکوس‌های افتراق‌دهنده و لوکوس‌های ۲، ۴، ۲۰ و ۲۴ به عنوان لوکوس‌های افتراق دهنده کم معرفی شدند (۱۱).

در مطالعه‌ای هم که در بین سال‌های ۲۰۰۲ و ۲۰۰۳ توسط اصغرزاده و همکارانش در منطقه شرق آذربایجان ایران صورت گرفت، نشان داد که از ۱۲۷ نمونه که از بیماران آن منطقه جداسازی کرده بودند، الگوی ژنتیکی ۱۲ لوکوسی، MIRU-VNTR آنها تهیه گردید. ۲۱ الگوی ژنتیکی مشترک و ۷۲ الگوی ژنتیکی اختصاصی جدا گردید. الگوی‌های ژنتیکی مشترک بین بیماران ایران و نخجوان نشان‌دهنده وجود منابع انتشاراتی مشترک در منطقه می‌باشد. سفرهایی که بین این دو منطقه صورت می‌گیرد وجود الگوهای ژنتیکی مشترک دور از انتظار نمی‌باشد (۱۲).

در مطالعه‌ای که توسط Sola و همکارانش در سال ۲۰۰۳ صورت گرفت از ۱۱۶ نمونه جدا شده از بیماران، الگوی ژنتیکی سویه‌ها با استفاده از تکنیک MIRU-VNTR محاسبه گردید، که الگوی ژنتیکی حاصل نشان داد که بیشتر سویه‌ها به خانواده‌های LAM، X، Haarlem و CAS1 تعلق داشتند (۱۳). که در مطالعه ما نیز در هر دو سویه حساس و مقاوم خانواده‌های Haarlem، LAM به چشم می‌خورد (۱۳).

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۸ در کره جنوبی توسط Won Yun انجام شد نشان داد که اختلاف آللی که آنها برای لوکوس‌های MIRU-VNTR به وسیله فرمول آماری HGDI بدست آوردند مانند مطالعه صورت گرفته ما لوکوس‌های ۱۰، ۱۶، ۲۳ و ۲۶ به عنوان لوکوس‌های افتراق‌دهنده بالا و لوکوس‌های ۲، ۴، ۲۰ و ۲۴ به عنوان لوکوس‌های افتراق‌دهنده پائین شناسائی شده‌اند (۱۴).

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-09]

مطالعه‌ای که Mokrousov و همکارانش در سال ۲۰۰۴ انجام دادند، نشان داد که لوکوس MIRU توانائی افتراق سویه‌های مایکوباکتریوم و همچنین تشخیص ریشه‌ای مناطق را از همدیگر دارد (۱۵). در مطالعه‌ای هم که توسط Park و همکارانش در سال ۲۰۰۰ انجام شد، نشان داد با استفاده از تکنیک‌هایی که بر اساس PCR می‌باشد می‌توان افتراق سویه‌ها را خیلی سریع و آسانتر از روش RFLP انجام داد و امکان آنالیز نمونه‌هایی هم که دارای مقادیر کم IS6110 می‌باشد با تکنیک‌هایی از قبیل MIRU-VNTR انجام داد (۱۶).

نتیجه‌گیری

نتایج نشان می‌دهد که در سویه‌های مقاوم به دارو جدا شده از بیماران مسلول مراجعه‌کننده به بیمارستان مسیح دانشوری، تنوع ژنتیکی آنها متعلق به خانواده‌های LAM، Haarlem و Dhli/CAS و سویه‌های حساس جدا شده از بیماران متعلق به NEW-1 ، Haarlem و Dehli/CAS بودند. بنابراین ایجاد مقاومت داروئی ارتباط با خانواده سویه خاصی ندارد و هر سویه قابلیت مقاومت به دارو را می‌تواند داشته باشد. از آنجائی که پیدایش سویه‌های مقاوم به دارو به عنوان یک معضل در کنترل و درمان بیماری سل محسوب می‌گردد توصیه می‌شود تا حتی‌الامکان با تشخیص سریع الگوی ژنتیکی سویه‌های مقاوم به دارو از انتشار آنها جلوگیری نمود. امروزه می‌توان با تکنیک‌های اپیدمیولوژی از قبیل MIRU-VNTR انتشار این سویه‌ها را تحت کنترل خود داشته باشیم (۱۷).

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از همکاری مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی آزمایشگاه رفرانس سل کشوری واقع در بیمارستان مسیح دانشوری جهت فراهم نمودن منابع مالی و همچنین از پرسنل آزمایشگاه رفرانس سل کشوری به خاطر انجام آزمایشهای روتین تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

1. Caroline Allix, Philip Supply and Maryes Fauville-Dufax. Utility of fast mycobacterial interspersed repetitive unit-variable number tandem repeat genotyping in clinical mycobacteriological analysis. CID 2004; 39: 783-9.
2. Ann G Lee, Lynnl H Tang, Irene HK. Lim, Richard Bellamy and Sin-Yew Wong. Discrimination of single-copy IS6110 DNA fingerprints of mycobacterium tuberculosis isolates by high-resolution minisatellite-based typing. J Clinical Microbiology 2002; 40: 657-659.
3. Philip Supply, Edith Mazars, Sarah Lesjean, Veronigue Vincent, Brigitte Gicquel and Camille Locht. Variable human mini satellite-like regions in the mycobacterium tuberculosis genom. J Molecular Microbiology 2000; 36: 762-771.
4. Filliol I, Ferdinand S, Negroni L, Sola C, Rastogi N. Molecular typing of mycobacterium tuberculosis based on variable number of tandem DNA repeats used alone and in association with spoligotyping. J Clin Microbiol 2000; 38: 2520-2524.
5. Philip Supply, Sarah Lesjean, Evqueni Savine, Kristin Kremer, Dick van Soolingen and Camille Locht. Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of mycobacterium tuberculosis based mycobacterial interspersed repetitive unit. JCM 2001; 39: 3563-3571.
6. Mazars E, Warren RM, Van Der Spuy GD, Beyers N, Van Helden PD, Locht C, and et al. Stability of spoligotyping. J Clin Microbial 2005; 43: 314-320.
7. JW Dale, D Brittain, AA Cataldi, D Cousins, JT CrawFord, T Lille Baek and Spacer oligonucleotide typing of bacteria of the mycobacterium tuberculosis complex: recommenddation for standardized nomenclature. J Tuberc Lung Dis, 2001; 5: 216-219.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-09]

8. Lu Zhang, Jing chen, Xin shen, Xiaohong Gui, Jian Mei, Kathryn Derimer and, et al. Highly polymorphic Variable-Number Tandem Repeats loci for differentiating Beijing genotype strains of mycobacterium tuberculosis in Shanghai, China, FEMS Microbial Lett, 2008; 282: 22-31.
9. MI Romano, AAmadio, F Bigi, L klepp, I Etchechoury, M Nato Liana, and et al. Further analysis of VNTR and MIRU in the genome of Mycobacterium avium complex, and application to molecular epidemiology of isolates from south America J Vetmic 2005; 110: 221-237.
10. Philip Supply, Sarah Lesjean, Evgueni Savine, Kristin Kremer, Dick van Soolingen and Camile Lockt. Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of mycobacterium tuberculosis based on mycobacterial interspersed repetitive unit. JCM 2001; 39: 3563-3571.
11. Kai Man Kam, Chi Wai Yip, Lai Wa Tse, Kin Lai Wong, Tak Kam Lam, Kristin Kremer and et al. Utility of mycobacterial interspersed repetitive unit typing for differentiating multidrug-resistant mycobacterium tuberculosis isolates of the Beijing family: JCM 2005; 43: 306-313.
12. Mohammad Asgharzadeh,Mansour Khakpour, Taghi Zahraei Salehi and Hossein Samadi Kafil. Use of mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat Typing to study mycbacterium tuberculosis isolates from East Azarbaijan province of Iran: Pakistan Journal of Biological Sciences 2007; 10: 3769-3777.
13. Cowan LS, Diem L, Monson T, Wand P, Temporado D, Oemig TV, and et al. Evaluation of a two-step approach for large-scale, prospective genotyping of mycobacterium tuberculosis isolates in the United States. J Clin Microbiol 2005; 43: 688-695.
14. Kyung Won Yun, Eun Ju Song, Go Eun Choi, In Kyung Hwang, Eun Yup Lee. Mycobacterial interspersed repetitive unit-variable number of tandem repeat. J Clinical Microbiology 2009; 29: 314-319.
15. Mokrousov I, Narvskaya O, Limeschenko E, Vyazovaya A, Otten T and Vyshnevskiy B: Analysis of the allelic diversity of the mycobacterial interspersed repetitive units in Mycobacterium tuberculosis strains of the Beijing family: practical implications and evolutionary considerations. J Clin Microbiol 2004; 42: 2438-2444.
16. Park YK, GH Bai, and SJ Kim. Restriction fragment length polymorphism analysis of mycobacterium tuberculosis isolated from countries in the western Pacific region. J Clin Microbiol 2000; 38: 191-197.
17. Christophe Sola, Ingrid Filliol, Eric Legrand, Sarah Lesjean, Camille Locht, Philippe Supply and et al. Genotyping of the mycobacterium tuberculosis complex using MIRUs: association with VNTR and spoligotyping for molecular epidemiology and evolutionary genetics: infection, genetics and evolution: 2003; 125-133.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-09]