Downloaded from journal.bums.ac.ir at 9:25 IRDT on Thursday March 22nd 2018

Comparison of Molecular methods in the Identification of Mycobacterium tuberculosis strains

Masoud Keikha [1]

Tuberculosis is one of the priorities of the World Health Organization of which millions of people in the world die annually. For the control and eradication of the disease, in addition of strategies like treatment of patients and identification of those with drug-resistant TB, We also need to detect the source of infection and track the disease's transmission manner. Molecular epidemiology is one of the most important means to achieve this goal. The present study aimed at declaring the need of molecular identification and differentiation between strains of Mycobacterium tuberculosis, as one of the TB control strategies.

Key Words: Tuberculosis; Molecular Epidemiology; Tuberculosis transmission.

Journal of Birjand University of Medical Sciences. 2017; 24 (1): 79-83.

Received: February 11, 2017 ***Accepted: May 7, 2017***

[1]***Corresponding Author;*** *Department of Medical Microbiology, Isfahan Medical School, Isfahan, Iran. Email: masoudkeikha@outlook.com Tel: +98323440388 Fax: +98323440388:*

Downloaded from journal.bums.ac.ir at 9:25 IRDT on Thursday March 22nd 2018

نامه به سردبیر

مقایسه روش‌های مولکولی در شناسایی سویه‌های مایکوباکتریوم‌توبرکلوزیس

مسعود کیخا[1]

چکیده

بیماری سل یکی از اولویت‌های سازمان جهانی بهداشت است که سالانه جان میلیون‌ها نفر را در سراسر دنیا می‌گیرد. برای کنترل و ریشه‌کنی این بیماری علاوه بر استراتژی‌هایی نظیر درمان بیماران و شناسایی بیماران مبتلا به سل مقاوم به دارو، نیاز است تا منشأ عفونت و سیر انتقال بیماری شناسایی گردد. اپیدمیولوژی مولکولی، یکی از مهم‌ترین ابزارها برای رسیدن به این هدف است. هدف از این نامه، بیان ضرورت شناسایی و افتراق مولکولی سویه‌های مایکوباکتریوم‌توبرکلوزیس به‌عنوان یکی از راهکارهای کنترل بیماری سل بود.

واژه‌های کلیدی: سل، اپیدمیولوژی مولکولی، انتقال سل.

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند. 1396؛ 24 (1): 79-83.

دریافت: 1395/11/23 پذیرش: **1396/02/17**

[1] **نویسنده مسئول:** دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب‌شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

آدرس: اصفهان- خیابان هزارجریب- دانشگاه علوم پزشکی اصفهان- دانشکده پزشکی- گروه میکروب‌شناسی پزشکی

تلفن: 09386836425 پست الکترونیک: masoudkeikha@outlook.com

Downloaded from journal.bums.ac.ir at 9:25 IRDT on Thursday March 22nd 2018

بیماری سل یکی از مهم‌ترین معضلات سلامت عمومی است. این بیماری سالانه جان دو میلیون انسان را در سراسر جهان می‌گیرد. گزارشات موجود حاکی از آن است که یک‌سوّم جمعیّت جهان آلوده به مایکوباکتریوم‌توبرکلوزیس هستند؛ هر چند علایمی از بیماری سل را از خود بروز نمی‌دهند (1، 2). ایران یکی از کشورهای واقع در شرق مدیترانه است که با دو کشور آذربایجان و ارمنستان هم‌مرز می‌باشد؛ از طرف دیگر کشور ما با دو کشور افغانستان و پاکستان نیز همسایه است. براساس گزارش‌های سازمان جهانی بهداشت هر چهار کشور همسایه ایران، از جمله کشورهای با شیوع تقریباً بالای سل هستند. ایران در طول دو دهه گذشته شاهد افزایش ورود مهاجرانی از کشورهای همسایه شرقی خود به‌خصوص افغانستان بوده است. با توجه به اینکه این کشور از جمله کشورهای با شیوع نسبتاً بالای بیماری سل است، بنابراین این موضوع در برنامه کنترل سل کشوری حائز اهمیت بالایی است. شیوع سل در ایران 26000 مورد می‌باشد. بروز این بیماری در کشورمان سالانه 22 مورد از هر 100000نفر می باشد. همچنین میزان مرگ و میر ناشی از این بیماری 3/5 مورد در هر 100000 نفر گزارش شده است (3-5).

مایکوباکتریوم‌توبرکلوزیس سویه‌های متعدّدی دارد. یکی از معروف‌ترین این سویه‌ها تحت عنوان بیجینگ شناخته شده است. این سویه مسئول 25درصد از کل موارد سل در سراسر جهان می‌باشد و برای اولین بار در منطقه بیجینگ پکن شناسایی شد. اما اپیدمی‌های آن از کشورهای آمریکا، آفریقای جنوبی، آلمان، جزایر قناری، روسیه، تایلند و کره جنوبی نیز گزارش شده است. مقاومت‌های دارویی، عدم پاسخ به درمان، قدرت بالای انتشار و انتقال و توانایی تکثیر بالا در ماکروفاژهای انسانی، از مهم‌ترین خصوصیات این سویه می‌باشد (1).

برای درک بیشتر ارتباط بین سل و عوامل دخیل در ایجاد این بیماری، نیازمند توسعه علم اپیدمیولوژی هستیم. اپیدمیولوژی سل به‌عنوان یک ابزار مهم برای درک بیشتر ما در خصوص منشأ عفونت، انتقال این بیماری، نحوه جلوگیری از انتشار آن و تمایز بین موارد عفونت اخیر و عود مجدّد، از اهمیت زیادی برخوردار است (5، 6). در گذشته، تنها ابزارهای در دسترس برای مطالعات اپیدمیولوژی سل محدود به روش‌هایی چون: پروفایل‌های حساسیّت دارویی و تیپ‌بندی براساس فاژ (Phage typing) بود که هر دوی این روش‌ها محدود و ناقص هستند؛ به‌طوری‌که در روش پروفایل حساسیت دارویی، سویه‌های مایکوباکتریوم‌توبرکلوزیس در طول درمان دچار جهش‌های ژنی و در نتیجه نسبت به داروهای درمان سل، مقاوم می‌شوند. اعتبار روش فاژ تایپینگ نیز محدود است؛ زیرا تعداد محدودی فاژ بین سویه‌های مایکوباکتریوم‌توبرکلوزیس شناسایی شده است (6). در طول سال‌های اخیر روش‌های مولکولی، قدرت و اعمال نفوذ اینگونه مطالعات را بهبود بخشیدند. در اپیدمیولوژی مولکولی، پراکندگی و انتشار بیماری در میان جمعیت‌های انسانی با به‌کارگیری روش‌های مولکولی مورد ارزیابی قرار می‌گیرند (5-7).

از جمله روش‌های مولکولی که برای انجام این مطالعات استفاده می‌شود، می‌توان به روش‌هایی چون: 1) تجزیه و تحلیل محل‌های برش آنزیم‌های محدودگر (Restriction Site Analysis of Genomic DNA)، 2) Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)، 3) تجزیه و تحلیل IS*6110*-RFLP، 4) اسپولیگوتایپینگ (Spoligotyping)، 5) روش‌های مبتنی بر توالی‌های Mini satellite، 6) روش‌های بر اساس توالی غنی از بازهای گوانین و سیتوزین، 7) PCR توالی تکراری، 8- تجزیه و تحلیل Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)، 9) تجزیه و تحلیل قطعات چندشکلی Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)، 10) تکنیک Multilocus Sequence Typing (MLST)، 11) تیپ‌بندی بر اساس پلی‌مورفیسم تک‌نوکلئوتیدی، 12)

Downloaded from journal.bums.ac.ir at 9:25 IRDT on Thursday March 22nd 2018

تیپ‌بندی بر اساس مناطق حذف‌شده (Deligotyping)، 13) Multiplex-PCR و 14) MIRU-VNTR اشاره کرد (7، 8). از میان روش‌های ذکرشده، روش‌های اسپولیگوتایپینگ بر اساس پلی‌مورفیسم لوکوس DR، MIRU-VNTR typing و IS*6110*-RFLP، از جمله روش‌هایی هستند که توسط محقّقان کشور ایران در مطالعات متعدد استفاده شده است (1، 3، 5، 9، 10).

در روش انگشت‌نگاری مبنی بر ژن *IS6110*، شناسایی سویه‌ها با توجه به تفاوت در جایگاه و تعداد نسخه‌های *IS6110* صورت می‌گیرد؛ الگوهای یکسان نشان‌دهنده انتقال اخیر است و الگوهای متفاوت نشان‌دهنده فعال‌شدن عفونت گذشته است (5). تمایز سویه‌های مایکوباکتریوم‌توبرکلوزیس بر پایه انگشت‌نگاری ژن *IS6110* در مورد گونه‌هایی که تعداد کم و یا یکسانی از این ژن را داشته باشند، کارساز نیست (6). در روش اسپولیگوتایپینگ بر اساس DR، تمایز سویه‌ها بر اساس پلی‌مورفیسم لوکوس DR (Direct Repeat) صورت می‌گیرد. این توالی‌های تکراری، به یک یا دو توالی غیر تکراری متصل هستند که حذف و اضافه‌شدن هر یک از این توالی‌ها موجب افتراق بین سویه‌ها می‌شوند. قدرت این روش در تمایز سویه‌های مایکوباکتریوم‌توبرکلوزیس محدود است (3، 6). روش MIRU-VNTR Typing در مقایسه با اسپولیگوتایپینگ روشی مطمئن‌تر، سریع‌تر و ساده‌تری است و به لحاظ قدرت تشخیص، مشابه روش IS*6110*-RFLP است. این روش با استفاده از واحدهای تکراری پراکنده مایکوباکتریومی (MIRU) است. در این روش واحدهای تکراری هر لوکوس بر اساس اندازه محصول PCR محاسبه شده و در نهایت با عددی مشخص می‌شود (3).

به‌طور کلی، تکنیک‌های IS6110-RFLP، Spoligotyping و MIRU-VNTR بهترین روش‌های مولکولی تمایز سویه‌های کمپلکس مایکوباکتریوم‌توبرکلوزیس هستند. هر چند روش IS6110-RFLP از حساسیّت بالاتری برخوردار است و به‌عنوان روش مرجع شناخته می‌شود؛ اما به‌دلیل هزینه بالا و زمان‌بربودن، می‌توان از روش‌های اسپولیگوتایپینگ و MIRU-VNTR نیز در مطالعات اپیدمیولوژی مولکولی سل استفاده کرد.

منابع:

1- Kazempour M, Masjedi MR, Velayati AA, Tajeddin E, Farnia P, Kargar M, et al. Identification of Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype using three different molecular methods. Koomesh. 2009;11(1):7-14. [Persian]

2- Blanc L, Bleed D, Dye C, Floyd K, Palmer K. Global tuberculosis control: surveillance planning financing. WHO report 2003. Geneva: World Health Organization; 2003.

3- Riyahi Zaniani F, Moghim S, Mirhendi H, Ghasemian Safaei H, Fazeli H, Salehi M, et al. Genetic Lineages of Mycobacterium tuberculosis Isolates in Isfahan, Iran. Curr Microbiol. 2017; 74(1): 14-21.

4- Zumla A, George A, Sharma V, Herbert RH; Baroness Masham of Ilton, Oxley A, et al. The WHO 2014 global tuberculosis report—further to go. Lancet Glob Health. 2015; 3(1): e10-2.

5- Nasiri B. Evaluation and Molecular Comparison of Mycobacterium tuberculosis Strains Isolated from Iranian and Afghan Immigrants in Tehran. Iran J Med Microbiol. 2014; 8(2):22-7. [Persian]

6- Ahmadi M, Farnia P, Tajedin E, Tabarsi P, Baghaei P, Masjedi M, et al. Mycobacterium tuberculosis Complex Strains Identification with Spoligotyping Method in Patients Attending to Masih Daneshvari Hospital. J Zanjan Univ Med Sci. 2009; 17(67): 23-32. [Persian]

7- Jagielski 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: ID 645802.

8- Nakajima C, Tamaru A, Rahim Z, Poudel A, Maharjan B, Aye KS, et al. Simple multiplex PCR assay for identification of Beijing family Mycobacterium tuberculosis isolates with a lineage-specific mutation in Rv0679c. J Clin Microbiol. 2013; 51(7): 2025-32.

9- Mozafari M, Farnia P, Jafarian M, Razavi Deligani MR, Kazempour M, Masjedi MR, et al. Comparison of Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype with other Mycobacterium tuberculosis strains Using MIRU-VNTR method. Iranian South Medical Journal (ISMJ). 2012; 15(1): 1-12. [Persian]

10- Hashemi A, Shojaei H, Heidarieh P, Aslani MM, Naser AD. Genetic diversity of Iranian clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis. New Microbiol. 2012; 35(1): 61-5.

Downloaded from journal.bums.ac.ir at 9:25 IRDT on Thursday March 22nd 2018