مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد
سال ۶۷، شماره ۲
خرداد-تیر ۱۴۰۳ صفحه ۳۴۰-۳۳۲

www.mums.ac.ir
Medical Journal of Mashhad
University of Medical Sciences
Vol. 67, No.2, P: 332-340
May-Jul2024

مقاله اصلی

بررسی تنوع ژنتیکی جدایه های *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* بیماران مبتلا به سل در کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۹/۲۰- تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۱۹

مرصع السادات فرناد[۱]
حسن ممتاز[۱*]
کیوان تدین[۱و۲]
نادر مصوری[۲]
یحیی خسروی[۳]

[۱]گروه میکروبیولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
[۲] بخش تولید توبرکولین و مالئین، موسسه تحقیقات و سرم سازی کرج، کرج، ایران
[۳]گروه بهداشت حرفه‌ای، دانشکده بهداشت، مرکز تحقیقات بهداشت، ایمنی و محیط، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران

نویسنده مسئول: دکتر حسن ممتاز، *گروه میکروبیولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.*
Email: hamomtaz@iaushk.ac.ir

خلاصه

مقدمه: سل معضلی قدیمی است که هم اکنون به عنوان چالشی جدید مطرح است. مطالعه حاضر با هدف بررسی تنوع ژنتیکی سویه های *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* جدا شده از بیماران مبتلا به سل در کرج، ایران انجام شد.

روش کار: هفده جدایه *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* از سال ۲۰۱۲ تا ۲۰۱۳ جمع‌آوری شد و تحت آنالیز پلی‌مورفیسم طول قطعه محدود (IS6110-RFLP) IS6110 قرار گرفتند. از نظر جمعیت شناختی، ۶ زن و ۱۴ مرد دارای تابعیت ایرانی در این مطالعه وارد شدند.

نتایج: ۱۶ نوع ژنتیکی مختلف پس از هضم آنزیمی و تجزیه و تحلیل RFLP به دست آمد. تعداد کپی IS6110 در هر ایزوله از ۰ تا ۱۲ متغیر بود. اکثر ایزوله ها (۶۶٪) دارای اعداد کپی بین ۶ تا ۱۲ بودند. هر ایزوله دارای ۶,۹ کپی از نشانگر IS6110 بود. 9 جدایه دارای ۱۰ تا ۱۲ نسخه از نشانگر IS6110، 5ایزوله دارای ۶ تا ۱۰ نسخه، و ۲ ایزوله دیگر دارای نسخه های کمتر از ۶ بودند. هیچ نسخه ای از IS6110 در بین ۴ ایزوله یافت نشد. هیچ رابطه ای بین جنسیت و تعداد کپی یافت نشد.

نتیجه‌گیری: تنوع ژنتیکی بالای موجود در جدایه های *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* ممکن است منابع مختلف عفونت و اهمیت ظهور مجدد سل را نشان دهد.با این حال، بررسی های بیشتر باید برای ارزیابی سایر جنبه های اپیدمیولوژیک مولکولی *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* در ایران انجام شود.

کلمات کلیدی: *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس*، تنوع ژنتیکی، IS6110-RFLP، ایران.

پی نوشت: این مطالعه فاقد تضاد منافع می‌باشد.

Doi: 10.22038/MJMS.2023.69504.4124

مقدمه

سل (TB) یک تهدید بهداشتی در سطح جهانی است. بر اساس گزارش سازمان جهانی بهداشت(WHO) ، 10میلیون مورد جدید سل (۵,۶ میلیون مرد، ۳,۲ میلیون زن و ۱,۲ میلیون کودک) وجود دارد که منجر به مرگ ۱,۴ میلیون نفر در سال ۲۰۲۰ شده است [۱] علیرغم کاهش بروز سل در ایران از ۳۶ مورد در هر ۱۰۰۰۰۰ نفر در سال ۱۹۹۰ به ۱۷ مورد در هر ۱۰۰۰۰۰ نفر در سال ۲۰۱۰ [۲]، سل همچنان به عنوان یک تهدید مهم بهداشت عمومی در میان ایرانیان باقی مانده است. [۳]سل یک بیماری پیچیده و چند شکلی است [۴، ۵]. درمان های ترکیبی مختلفی برای درمان سل در دسترس است [۶]با این حال، ظهور سل مقاوم به چند دارویی (MDR-TB) وجود دارد [۷]. در حال حاضر، MDR-TB دارای نرخ بروز تجمعی در سطح جهانی است. علاوه بر این، MDR-TBیک تهدید سلامت عمومی در کنترل و پیشگیری از سل است [۸]. بنابراین، استفاده از روش‌های تشخیصی سریع و حساس سل و ارزیابی جنبه‌های اپیدمیولوژیک جدید سل در منطقه‌ای با میزان بروز بالا ضروری است [۱۰، ۹]. ژنوتیپ سویه های *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* با استفاده از IS*6110* RFLP یک رویکرد عملی در اپیدمیولوژی مولکولی سل در نظر گرفته می شود [۱۲، ۱۱]. این روش به کنترل سل کمک می کند و امکان شناسایی و شیوع غیرقابل پیش بینی و آلودگی متقابل آزمایشگاهی را فراهم می کند و به تمایز عفونت مجدد اگزوژن از فعال سازی مجدد درون زا کمک می کند، به این ترتیب امکان درک تنوع ژنتیکی سویه را فراهم می کند [۱۳]. با توجه به شیوع بالای سل در بین ایرانیان و وضعیت نامشخص الگوهای ژنوتیپی جدایه ها در برخی از مناطق ایران، مطالعه حاضر با هدف بررسی ویژگی‌های مولکولی جدایه‌های *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* از نمونه‌های خلط بیماران مراجعه‌کننده به مرکز سل البرز با استفاده از روش RFLP انجام شد.

روش کار

مسائل اخلاقی

رضایت آگاهانه کتبی از بیماران داوطلب یا والدین آنها گرفته شد. مقامات مربوطه تاییدیه اخلاقی این کار ژنوتایپینگ گذشته نگر را در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی البرز صادر کردند. اصول نظرسنجی حاضر از نظر اخلاقی توسط گروه سل و مالین، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، کرج، ایران تایید شده است.

نمونه ها و آماده سازی

۲۰ نمونه خلط از ۲۰ بیمار سرپایی مشکوک به سل ریوی به طور تصادفی انتخاب شد. این بیماران از آذر ۱۳۹۱ تا مهر ۱۳۹۲ به بیمارستان‌های دانشگاهی البرز مراجعه کرده بودند. اطلاعات دموگرافیک بیماران جمع‌آوری شد و رضایت آنها از طریق پرسشنامه در درمانگاه تکمیل شد. نمونه ها بلافاصله برای تجزیه و تحلیل بیشتر به موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی کرج، ایران منتقل شدند. نمونه ها برای هضم/ضد آلودگی تحت پروتکل Petroff قرار گرفتند.

کشت مایکوباکتریوم توبرکلوزیس

نمونه‌های فرآوری‌شده برای تلقیح دامنه‌های محیط ساده (گلیسیرینه) و محیط Lowenstein-Jensen (LJ) همراه با پیروات سدیم و گلیسرولMerck)) ، آلمان) مورد استفاده قرار گرفتند. کشت ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۲ هفته انکوبه شدند. بازرسی هفتگی برای یافتن هرگونه رشد باکتری انجام شد. رنگ آمیزی اسید فست برای ارزیابی میکروسکوپی کشت های دارای ویژگی های بصری کمپلکس .M tuberculosis (MTC) استفاده شد [۱۴]. کلیه اصول طبق دستورالعمل گروه سل موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی کرج، ایران انجام شد. شناسایی جدایه های *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* با استفاده از تقویت PCR ژن *16srRNA* و نشانگر IS6110 انجام شد [۱۶، ۱۵].

استخراج DNA و ارزیابی کیفیت

برای استخراجDNA ، ۳ کلنی پر *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* برداشت شدند، به میکروتیوب حاوی ۴۰۰ میکرولیتر TE منتقل شد. به مدت ۲۰ دقیقه داخل بن ماری در دمای ۸۵ درجه سانتیگراد قرار داده شد و سپس به مدت ۳۰ دقیقه با محلول TB lysis (به نسبت ۱ به ۱) در ۳۷° انکوبه گردید و غیرفعال شد.

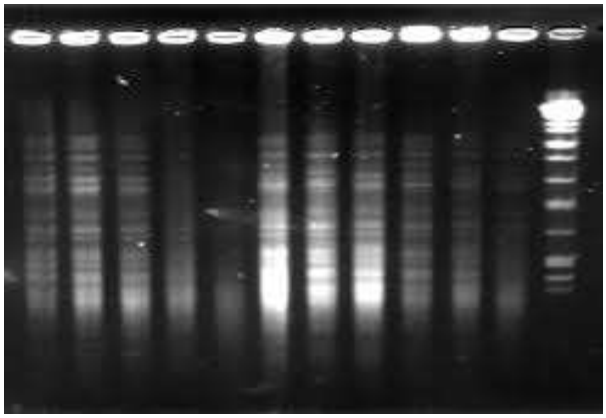
سپس، ۵۰ میکرولیتر لیزوزیم ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اضافه شد، و به مدت ۲۴ ساعت (۳۷ درجه سانتیگراد) انکوبه شد. ۷۵ میکرولیتر مخلوط پروتئیناز K و SDS ۱۰٪ به هر میکروتیوب اضافه و خیلی کوتاه ورتکس شده و به مدت ۱۰ دقیقه در ^{o}C ۶۵ انکوبه گردید. به میکروتیوب‌ها ۱۰۰ میکرولیتر NaCl ۵ مولار اضافه شد. و به هر میکروتیوب ۱۰۰ میکرولیتر محلول CTAB/NaCl که قبلا به مدت ۱۵ دقیقه در فور ^{o}C ۶۵ قرار داده شده بود اضافه گردید و انکوبه شد. . حجم مساوی از کلروفرم: ایزوآمیل الکل (v/v ۲۴:۱) به مخلوط اضافه شد. پس از سانتریفیوژ به مدت ۵ دقیقه، ۰,۶ حجم ایزوپروپانول به مایع رویی اضافه شد تا DNA رسوب کند. پس از انکوباسیون به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد و سانتریفیوژ به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۰۰۰ × گرم و ۴ درجه سانتی گراد، رسوب یک بار با اتانول ۷۰ درصد (v/v) شسته شد و بعد از خشک شدن در دمای اتاق در ۲۰ میکرولیتر بافر Tris-EDTAحل شد[۱۷]. سپس خلوص (A260/A280) و غلظت DNA استخراج شده بررسی شد (NanoDrop، Thermo Scientific، Waltham، MA، USA). کمیت DNA بر روی ژل آگارز ۲٪ رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot, Germany) (۰,۵ میکروگرم در میلی لیتر) ارزیابی شد [۱۹، ۱۸].

تجزیه و تحلیل پلی مورفیسم طول قطعه محدود (RFLP)

انگشت نگاری DNA با روش استانداردی که قبلاً توضیح داده شد انجام شد . به طور خلاصه، DNAکروموزومی (۲-۳,۵ میکروگرم) با *Pvu*II در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت یک شب هضم آنزیمی شد. قطعات هضم شده با الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ (وزنی/حجمی) در بافر ۱ Tris-borate-EDTA × جدا شدند. قطعات با استفاده از روش مویرگی بر روی غشاهای نایلونی با بار مثبت منتقل شدند. تجزیه و تحلیل RFLP با استفاده از یک روش استاندارد بین المللی همانطور که قبلا توضیح داده شد [۲۰] انجام شد. الگوهای اثر انگشت IS6110 با استفاده از نرم افزار GelCompar II نسخه ۶,۵ ,Applied Maths) (Sint-Martens-Latem, Belgiumتجزیه و تحلیل شد.

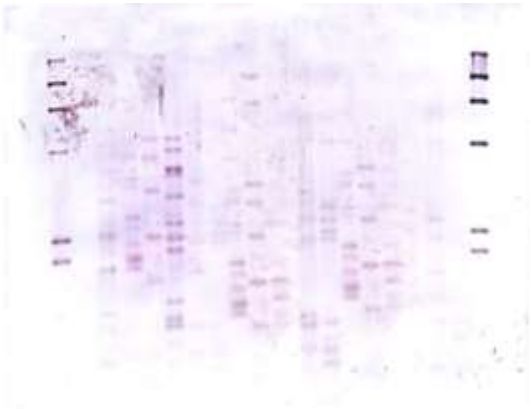
نتایج

بیماران این مطالعه شامل ۶ زن و ۱۴ مرد دارای تابعیت ایرانی بودند. با توجه به پرونده بیماران، تمامی نمونه های خلط از بیماران دریافت شد. تمامی سویه های *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* و شاهد استاندارد (سویه M. tuberculosis H37Rv) از نظر انگشت نگاری ژنومی و پلی مورفیسم در استان البرز مورد بررسی قرار گرفتند. به دلایل فنی از جمله کیفیت ماده ژنومی استخراج شده از نمونه، DNA استخراج شده از ۲۰ جدایه برای این آزمایش مناسب بود. در این مطالعه، ۱۷ جدایه توسط آنزیم *Pvu*II به صورت آنزیمی هضم و در RFLP مورد ارزیابی قرار گرفتند. شکل ۱ الگوی RFLP جدایه های *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* را با استفاده از آنزیم *Pvu*II نشان می دهد.



شکل ۱. الگوی RFLP جدایه های *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* با استفاده از آنزیم *Pvu*II.

مقایسه بصری نوارهای با وزن مولکولی بالا (۲۰۲۷ تا ۲۳۱۳۰ جفت باز) و با استفاده از نرم افزار Gel Pro) تجزیه و تحلیل بر اساس تعداد و اندازه باند)، از ۲۰ سویه هضم شده با آنزیم *Pvu*II، پس از RFLP و هیبریداسیون با پروب IS6110 و ۱۶ تیپ ژنتیکی مختلف به دست آمد (شکل ۲) که HPIS1 تا HPIS12نامگذاری و شناسایی شد و تعداد ژنوتیپ های منحصر به فرد در این روش ۱۶ ژنوتیپ تعیین شد.



شکل ۲. یافته های آزمون RFLP بر اساس نشانگرهای IS6110 و آنزیم Pvu*II*

تعداد نسخه های IS6110 در هر ایزوله از ۰ تا ۱۲ متغیر بود. با این حال، اکثر ایزوله ها (۶۶٪) دارای تعداد کپی بین ۶ تا ۱۲ بودند. به طور متوسط، هر ایزوله دارای ۶,۹ نسخه از IS6110 بود. ۹ سویه حاوی ۱۰ تا ۱۲ نسخه از IS6110، 5 سویه حاوی ۶ تا ۱۰ نسخه، و ۲ سویه دارای کپی کمتر از ۶ بودند. هیچ کپی از IS6110 در بین ۴ سویه یافت نشد. هیچ رابطه ای بین جنسیت و تعداد کپی یافت نشد.

بحث

اپیدمیولوژی مولکولی *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* در مناطق مختلف ایران مورد بررسی قرار گرفت [۲۳-۲۱]. به طور مشابه، اپیدمیولوژی مولکولی *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* در کشورهای دیگر از جمله ایالات متحده [۲۴]، لهستان [۲۵]، بلژیک [۲۶]، چین [۲۷]، برزیل [۲۸]، آفریقا [۲۹]، هند [۳۰] ، عربستان سعودی [۳۱] و روسیه [۳۲] مورد بررسی قرار گرفت. این مطالعات نیز تنوع ژنتیکی مشابهی را با توجه به روش های انجام شده و منبع عفونت گزارش کردند. مطالعه حاضر بر اساس یافته هایRFLP-IS6110 ، ۱۷ نوع متفاوت ژنتیکی را در سویه های *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* جدا شده از بیماران در کرج، ایران نشان داد. این نتایج نشان دهنده تنوع ژنتیکی قابل توجه این پاتوژن در استان البرز ایران است. افزایش تعداد جدایه ها در تحقیقات تکمیلی آتی احتمالاً پلی مورفیسم مشاهده شده را حتی بیشتر از مقادیر فعلی افزایش می دهد. موارد فعال سل در این استان احتمالاً به دلیل فعال شدن مجدد عفونت بوده و انتقال اخیر نقش بسیار کمتری داشته است. در مطالعه حاضر درصد زیادی از جدایه ها دارای شماره کپی بین ۶ تا ۱۲ بودند که میانگین تعداد کپی نشانگر IS6110 مشابه نتایج مطالعه دورودچی و همکاران(۲۰۰۰) بود [۳۳]. در بسیاری از مطالعات در سرتاسر جهان [۳۶-۳۴]، برخی از جدایه های *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* قطعه IS6110 را نداشتند. در مطالعه حاضر نیز، ۴ ایزوله کپی نشانگر IS6110 را نداشتند. در مطالعه دیگری در ویتنام [۳۷]، از تکنیک‌های RFLP-IS6110 و مایکوباکتریال متقابل واحد تکراری تعداد متغیر پشت سر هم-MIRU) (VNTRبرای ارزیابی خصوصیات ژنتیکی ۲۶۶۴ جدایه استفاده شد. تعداد زیادی از جدایه ها در هر دو روش وجود داشت که منجر به عود عفونت سل نهفته در ویتنام شد. علاوه بر این، بسیاری از جدایه‌های ویتنام حاوی هیچ کپی از نشانگر

IS6110نبودند که در برابر آنتی بیوتیک ها، به ویژه استرپتومایسین، مقاومت کمتری داشتند. طبق گزارش تحقیقات متعدد ، IS6110 رایج ترین نشانگر ژنتیکی برای شناسایی و شناسایی ژنتیکی *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* با وضوح بالا برای انگشت نگاری DNA سویه های جدا شده در جمعیت مورد مطالعه است [۳۹، ۳۸]. بنابراین، این قطعه می تواند مبنایی برای مطالعات اپیدمیولوژیک مولکولی آینده در مورد سل باشد. تنوع ژنتیکی بالای IS6110 در مطالعات قبلی ایران گزارش شده است [۴۴-۴۰]. تنوع ژنتیکی بالای IS6110 در سویه‌های مختلف *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* احتمالاً نشان می‌دهد که بیشتر افراد با منشأهای متفاوت آلوده شده‌اند. در نتیجه فعال شدن مجدد عفونت نقش مهمی در گسترش سل در ایران داشته است. اگرچه فعال شدن بیماری به دلیل عفونت بیماران در سال‌های قبل از شروع بیماری به عنوان عامل مهمی در تبیین این یافته اپیدمیولوژیک معرفی شده است، اما علل یا دلایل قطعی این وضعیت ناشناخته باقی مانده است. با توجه به محدود بودن تعداد نمونه های مورد مطالعه در مطالعه حاضر، اظهار نظر با قطعیت در مورد مایکوباکتریومی غیر از کمپلکس *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* بدون توالی IS6110 در استان البرز، ایران غیرممکن است. بنابراین در این مورد نیاز به مطالعه بیشتر است.

در مورد تشخیص مایکوباکتری آتیپیک در ایران، تنها یک گزارش در سال ۲۰۰۹ منتشر شد که نشان داد از مجموع ۳۷۱ نمونه (۱۱/۵٪)، ۴۳ مورد به عنوان مایکوباکتری غیر سلی تشخیص داده شد.

نتیجه گیری

در مجموع، تنوع ژنتیکی بالایی در بین سویه های *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* جدا شده از بیماران در استان البرز، بر اساس تکنیک IS6110-RFLP مشاهده شد. در این مطالعه ۱۷ سویه در RFLP شناسایی شد. این تکنیک مولکولی به عنوان یک روش پایه در ارزیابی اپیدمیولوژی مولکولی *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* شناخته شده است. یافته‌ها نشان داد که *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* عامل اصلی سل در منطقه است. با توجه به سن بیماران و تنوع ژنتیکی سویه ها، فرض هموپلازی مطرح می شود. در پایان، این تحقیق می تواند زمینه مناسبی برای مطالعات آتی در منطقه، مقایسه نتایج به دست آمده با یکدیگر و تحلیل بهتر وضعیت اپیدمیولوژیک سل در استان البرز ایران باشد.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر بخشی از پایان نامه دکتری میکروبیولوژی دانشگاه آزاد شهرکرد بوده و بدینوسیله از همکاری معاونت تحقیقات و فناوری این دانشگاه و از زحمات اساتید محترم و پرسنل محترم آزمایشگاه گروه میکروب شناسی، و نیز پرسنل محترم آزمایشگاه بیمارستان های شهرکرد صمیمانه تشکر و قدردانی می شود.

References

1. World Health Organization (WHO). Global Tuberculosis report. WHO 2020.
2. World Health Organization (WHO). Global tuberculosis control. WHO 2011.
3. Kazerooni PA, Khazaei Z, Mousavi M, Khazaei S, Sohrabivafa M, Dehghani SL, Adineh HA, Delam H, Nejat M, Behzadi B, Esfahani MV. Prevalence of human immunodeficiency virus and tuberculosis among homeless individuals. Immunopathologia Persa. 2018;4(1):4.
4. Ahmad S, Majid Z, Mehdi M, Mubarak M. Cerebral salt wasting syndrome due to tuberculous meningitis; a case report. Journal of renal injury prevention. 2016;5(1):53.
5. Balwani MR, Kute VB, Shah PR, Wakhare P, Trivedi HL. Secondary renal amyloidosis in a patient of pulmonary tuberculosis and common variable immunodeficiency. Journal of nephropharmacology. 2015;4(2):69.
6. Makarov V, Lechartier B, Zhang M, Neres J, van der Sar AM, Raadsen SA, Hartkoorn RC, Ryabova OB, Vocat A, Decosterd LA, Widmer N. Towards a new combination therapy for

tuberculosis with next generation benzothiazinones. EMBO molecular medicine. 2014 Mar;6(3):372-83.
7. Brown TS, Eldholm V, Brynildsrud O, Osnes M, Stennis N, Stimson J, Colijn C, Alexandru S, Noroc E, Ciobanu N, Crudu V. Evolution and emergence of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis in Chisinau, Moldova. medRxiv. 2021 Jan 1.
8. Fox GJ, Schaaf HS, Mandalakas A, Chiappini E, Zumla A, Marais BJ. Preventing the spread of multidrug-resistant tuberculosis and protecting contacts of infectious cases. Clinical Microbiology and Infection. 2017 Mar 1;23(3):147-53.
9. Makki SS, Ghorbani F, Najafizadeh K, Shafaghi S, Reza H, Vishteh K. Assessment of diagnostic value of different methods (culture, PCR and biopsy) for the diagnosis of tuberculosis in patients with bronchial anthracosis. Immunopathologia Persa. 2020 May 6;6(2):e24-.
10. Zahedi Bialvaei A, Asgharzadeh M, Aghazadeh M, Nourazarian M, Samadi Kafil H. Challenges of Tuberculosis in Iran, Jundishapur J Microbiol. 2017 ; 10(3):e37866.
11. Almeida SM, Malaspina AC, Leite CQ, Saad MH. Usefulness of 3'-5'IS6110-RFLP genotyping and spoligotyping of Mycobacterium tuberculosis isolated in a tertiary hospital: a retrospective study detecting unsuspected epidemiological events. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. 2019;61.
12. Peres RL, Vinhas SA, Ribeiro FK, Palaci M, do Prado TN, Reis-Santos B, Zandonade E, Suffys PN, Golub JE, Riley LW, Maciel EL. Risk factors associated with cluster size of Mycobacterium tuberculosis (Mtb) of different RFLP lineages in Brazil. BMC infectious diseases. 2018 Dec;18(1):1-0.
13. Ansarin K, Sahebi L, Aftabi Y, Khalili M, Seyyedi M. Comparing IS6110-RFLP, PGRS-RFLP and IS6110-Mtb1/Mtb2 PCR methods for genotyping of Mycobacterium tuberculosis isolates. Journal of applied microbiology. 2020 Oct;129(4):1062-70.
14. Farnad MS, Momtaz H, Mosavari N, Khosravi Y, Tadayon K. Insight into population structure of Mycobacterium tuberculosis isolates in the multiethnic province of Alborz, Iran. Iranian Journal of Microbiology. 2021 Feb 10;13(1):58-64.
15. Huard RC, de Oliveira 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;41:1637-1650.
16. McHugh TD, Gillespie SH. Nonrandom association of IS6110 and Mycobacterium tuberculosis: implications for molecular epidemiological studies. J Clin Microbiol 1998;36:1410-1413.
17. Van Soolingen D, Hermans P, De Haas P, Soll D, Van Embden J. Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. J Clin Microbiol 1991; 29:2578-2586.
18. Abdolmaleki Z, Mashak Z, Dehkordi FS. Phenotypic and genotypic characterization of antibiotic resistance in the methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains isolated from hospital cockroaches. Antimicrobial Resistance & Infection Control. 2019 Dec;8(1):1-4.
19. Ranjbar R, Farsani FY, Dehkordi FS. Phenotypic analysis of antibiotic resistance and genotypic study of the vacA, cagA, iceA, oipA and babA genotypes of the Helicobacter pylori strains isolated from raw milk. Antimicrobial Resistance & Infection Control. 2018 Dec;7(1):1-4.
20. Van Soolingen D, Qian L, De Haas P, Douglas JT, Traore H, Portaels F, et al. Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of east Asia. J Clin Microbiol 1995; 33:3234-3238.
21. Ramazanzadeh R, Shakib P, Rouhi S, Mohammadi B, Mohajeri P, Borji S. Molecular epidemiology of Mycobacterium tuberculosis isolates in Iran using spoligotyping. New Microbes and New Infections. 2020 Nov 1;38:100767.

22. Pourostadi M, Rashedi J, Poor BM, Kafil HS, Kazemi A, Asgharzadeh M. Tuberculosis control and role of molecular epidemiology studies in Iran: a systematic review. Tanaffos. 2017;16(3):190.
23. Sahebi L, Ansarin K, Hoffner S, Farajnia S, Seyyedi M, Khalili M, Monfaredan A. Molecular Epidemiology of Mycobacterium Tuberculosis Strains in the North-West and West of Iran. Annals of medical and health sciences research. 2015;5(5):334-9.
24. Munsiff SS, Bassoff T, Nivin B, Li J, Sharma A, Bifani P, Mathema B, Driscoll J, Kreiswirth BN. Molecular epidemiology of multidrug-resistant tuberculosis, New York City, 1995–1997. Emerging infectious diseases. 2002 Nov;8(11):1230.
25. Jagielski T, Minias A, Van Ingen J, Rastogi N, Brzostek A, Żaczek A, Dziadek J. Methodological and clinical aspects of the molecular epidemiology of Mycobacterium tuberculosis and other mycobacteria. Clinical microbiology reviews. 2016 Apr 1;29(2):239-90.
26. Vluggen C, Soetaert K, Groenen G, Wanlin M, Spitaels M, Arrazola de Oñate W, Fauville-Dufaux M, Saegerman C, Mathys V. Molecular epidemiology of Mycobacterium tuberculosis complex in Brussels, 2010–2013. PLoS One. 2017 Feb 21;12(2):e0172554.
27. Chen L, Pang Y, Ma L, Yang H, Ru H, Yang X, Yan S, Jia M, Xu L. First insight into the molecular epidemiology of Mycobacterium tuberculosis isolates from the minority enclaves of southwestern China. BioMed research international. 2017 May 17;2017.
28. Verza M, Scheffer MC, Salvato RS, Schorner MA, Barazzetti FH, de Melo Machado H, Medeiros TF, Rovaris DB, Portugal I, Viveiros M, Perdigão J. Genomic epidemiology of Mycobacterium tuberculosis in Santa catarina, Southern Brazil. Scientific reports. 2020 Jul 30;10(1):1-1.
29. Chisompola NK, Streicher EM, Muchemwa CM, Warren RM, Sampson SL. Molecular epidemiology of drug resistant Mycobacterium tuberculosis in Africa: a systematic review. BMC infectious diseases. 2020 Dec;20:1-6.
30. Joseph BV, Soman S, Radhakrishnan I, Hill V, Dhanasooraj D, Kumar RA, Rastogi N, Mundayoor S. Molecular epidemiology of Mycobacterium tuberculosis isolates from Kerala, India using IS6110-RFLP, spoligotyping and MIRU-VNTRs. Infection, genetics and evolution. 2013 Jun 1;16:157-64.
31. 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. Infection, Genetics and Evolution. 2013 Jun 1;16:362-8.
32. Mokrousov I. Molecular structure of Mycobacterium tuberculosis population in Russia and its interaction with neighboring countries. International journal of mycobacteriology. 2015 Mar 1;4:56-7.
33. Doroudchi M, Kremer K, Basiri EA, Kadivar MR, Van Soolingen D, Ghaderi AA. IS6110-RFLP and spoligotyping of Mycobacterium tuberculosis isolates in Iran. Scandinavian journal of infectious diseases. 2000 Jan 1;32(6):663-8.
34. Roychowdhury T, Mandal S, Bhattacharya A. Analysis of IS 6110 insertion sites provide a glimpse into genome evolution of Mycobacterium tuberculosis. Scientific reports. 2015 Jul 28;5(1):1-0.
35. Howard ST, Oughton MT, Haddad A, Johnson WM. Absence of the genetic marker IS6110 from a strain of Mycobacterium tuberculosis isolated in Ontario. Canadian Journal of Infectious Diseases. 1998 Jan 1;9(1):48-53.
36. Steensels D, Fauville-Dufaux M, Boie J, De Beenhouwer H. Failure of PCR-Based IS6110 analysis to detect vertebral spondylodiscitis caused by Mycobacterium bovis. Journal of clinical microbiology. 2013 Jan 1;51(1):366-8.

37. Huyen MN, Tiemersma EW, Kremer K, de Haas P, Lan NT, Buu TN, Sola C, Cobelens FG, van Soolingen D. Characterisation of Mycobacterium tuberculosis isolates lacking IS6110 in Viet Nam. The International journal of tuberculosis and lung disease. 2013 Nov 1;17(11):1479-85.
38. Millán-Lou MI, López-Calleja AI, Colmenarejo C, Lezcano MA, Vitoria MA, del Portillo P, Otal I, Martín C, Samper S. Global study of IS6110 in a successful Mycobacterium tuberculosis strain: clues for deciphering its behavior and for its rapid detection. Journal of clinical microbiology. 2013 Nov 1;51(11):3631-7.
39. Zhou L, Ma C, Xiao T, Li M, Liu H, Zhao X, Wan K, Wang R. A new single gene differential biomarker for Mycobacterium tuberculosis complex and non-tuberculosis mycobacteria. Frontiers in microbiology. 2019 Aug 13;10:1887.
40. Asgharzadeh M, Khakpour M, Salehi TZ, Kafil HS. Use of mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing to study Mycobacterium tuberculosis isolates from East Azarbaijan province of Iran. Pakistan journal of biological sciences: PJBS. 2007 Nov 1;10(21):3769-77.
41. Rohani M, Farnia P, Nasab MN, Moniri R, Torfeh M, Amiri MM. Beijing genotype and other predominant Mycobacterium tuberculosis spoligotypes observed in Mashhad city, Iran. Indian journal of medical microbiology. 2009 Oct 1;27(4):306.
42. Azimi T, Nasiri MJ, Zamani S, Hashemi A, Goudarzi H, Fooladi AA, Feizabadi MM, Fallah F. High genetic diversity among Mycobacterium tuberculosis strains in Tehran, Iran. Journal of clinical tuberculosis and other mycobacterial diseases. 2018 May 1;11:1-6.
43. Soleimanpour S, Hamedi Asl D, Tadayon K, Farazi AA, Keshavarz R, Soleymani K, Seddighinia FS, Mosavari N. Extensive genetic diversity among clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis in central province of Iran. Tuberculosis research and treatment. 2014 Jan 1;2014.
44. Vaziri F, Kohl TA, Ghajavand H, Kamakoli MK, Merker M, Hadifar S, Khanipour S, Fateh A, Masoumi M, Siadat SD, Niemann S. Genetic diversity of multi-and extensively drug-resistant Mycobacterium tuberculosis Isolates in the capital of Iran, revealed by whole-genome sequencing. Journal of clinical microbiology. 2019 Jan 1;57(1).
45. Heidari F, Farnia P, Noroozi J, Majd A, Tajedin E, Masjedi MR, Velayati A. The rapid identification of atypical mycobacterium in pulmonary tuberculosis (ptb) patients: evaluation of qub3232 locus using the vntr method. J Adv Med Biomed Res. 2009;17(67):33-44.

Original Article

Genetic diversity assessment of the *Mycobacterium tuberculosis* isolates of patients with tuberculosis in Karaj, Iran

Received: 11/12/2023 - Accepted: 08/02/2024

Morassa Sadat Farnad[1]
Hassan Momtaz[1*]
Keyvan Tadayon[1,2]
Nader Mosavari[2]
Yahya Khosravi[3]

[1]*Department of Microbiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Sharekord, Iran.*
[2]*Department of Tuberculin & Mallein, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.*
[3]*Department of Occupational Health and Safety Engineering, Non-communicable Diseases, Research Center, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran.*

***Corresponding author:** Hassan Momtaz; Department of Microbiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran, PO. Box: 166, TelFax: +983833361064

Email: hamomtaz@iaushk.ac.ir

Abstract

Introduction and purpose: Tuberculosis (TB) is an old issue that is presently measured as a significant challenge. The present survey was aimed to assess the genetic diversity of *M. tuberculosis* strains isolated from patients with TB in Karaj, Iran.

Methodology: Seventeen *M. tuberculosis* isolates from 2012 to 2013 were collected and subjected to an IS6110 restriction fragment length polymorphism (IS6110-RFLP) analysis. Demographically, 6 females and 14 males who had Iranian citizenship were included in this study.

Findings: Sixteen different genetic types were obtained after enzymatic digestion and RFL analysis. Copy numbers of IS6110 in each isolate ranged from 0 to 12. The majority of isolates (66%) harbored copy numbers between 6 and 12. Each isolates harbored 6.9 copies of the IS6110 marker. Nine isolates harbored 10 to 12 copies of the IS6110 marker, 5 isolates harbored 6 to 10 copies, and 2 others harbored copies less than 6. No copy of IS6110 was found among the 4 isolates. No relationship was found between gender and copy numbers.

Conclusion: The high genetic diversity found amongst the *M. tuberculosis* isolates maybe show different sources of infection and the importance of reemerging of the TB. However, further surveys should perform to assess other molecular epidemiologic aspects of *M. tuberculosis* in Iran.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, Genetic diversity, IS6110-RFLP, Iran.

Acknowledgement: There is no conflict of interest