مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره پنجم ـ شماره دوم ـ تابستان ۹۰
صفحات۳ الی ۱۱

مقاله پژوهشی
(Original Article)

بررسی الگوی ژنتیکی مایکوباکتریوم‌های غیرتوبرکلوزیس با استفاده از روش VNTR

فضه حیدری[۱]، پریسا فرنیا[۲]، جمیله نوروزی[۳]، احمد مجد[۴]

[۱]کارشناس ارشد میکروب‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی تهران واحد شمال، تهران، ایران.
[۲]دانشیار میکروب‌شناسی، مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.
[۳]استاد میکروب‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی تهران واحد شمال، تهران، ایران.
[۴]استاد زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی تهران واحد شمال، تهران، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: الگوی مقاومت دارویی و انتشار جهانی مایکوباکتریوم‌های آتیپیک (Non- Tuberculosis Mycobacterium , NTM)، نقش و اهمیت مطالعات اپیدمیولوژیکی این دسته را بیشتر کرده است. یکی از روش‌های انگشت‌نگاری ژنتیکی که بدین منظور مورد استفاده قرار می‌گیرد، روش توالی‌های تکراری پشت سرهم (Variable Number Tandem Repeat , VNTR) نام دارد. در این مطالعه الگوی ژنتیکی مایکوباکتریوم‌های آتیپیک با استفاده از روش VNTR به‌منظور مطالعات اپیدمیولوژیکی این دسته بررسی گردید.

روش بررسی: ۴۸ نمونه ریوی و خارج ریوی جداشده از بیماران با علایم سل ریوی که با استفاده از تست‌های افتراقی (شامل احیای نیترات، آزمایش فعالیت کاتالاز، آزمایش نیاسین، سرعت رشد و تولید پیگمان) و روش PCR-RFLP به‌عنوان مایکوباکتریوم‌های غیرتوبرکلوزیس شناسایی شده بودند، انتخاب و با استفاده از ۷ لوکوس ژنتیکی شامل: MPTR-A, ETR-A, ETR-B, ETR-C, ETR-D, ETR-E, ETR-F از نظر الگوی VNTR بررسی شدند. لازم به ذکر است که روش VNTR علاوه بر نمونه‌های کلینیکی به‌طور همزمان بر روی سویه‌های استاندارد مایکوباکتریوم‌های آتیپیک نیز انجام شد.

یافته‌ها: نتایج به دست آمده از روش VNTR نشان داد ۷ لوکوس مورد بررسی در هیچ‌کدام از سوش‌های استاندارد مایکوباکتریوم‌های آتیپیک دارای پلی‌مورفیسم نبودند؛ در حالی‌که برخی از این توالی‌های تکراری پشت سرهم در ۴۲ نمونه از مایکوباکتریوم‌های غیرتوبرکلوزیس جداشده از بیماران، پلی‌مورفیک بودند. در ۶ نمونه باقیمانده محصول PCR (برای هیچ‌کدام از لوکوس‌ها) مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: با وجود کارآمد بودن لوکوس‌های ژنی نام برده برای مطالعات اپیدمیولوژیکی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس، این لوکوس‌ها در مایکوباکتریوم‌های غیرتوبرکلوزیس پلی‌مورفیک نبوده و قادر به تعیین تنوع ژنتیکی و در پی آن مطالعات اپیدمیولوژیکی این دسته نمی‌باشند. لذا بررسی لوکوس‌های دیگر با استفاده از روش VNTR ضروری به‌نظر می‌رسد.

کلید واژه‌ها: مایکوباکتریوم؛ مطالعات اپیدمیولوژیکی؛ لوکوس‌های VNTR.

نویسنده مسئول مکاتبات: دانشگاه آزاد اسلامی تهران واحد شمال، تهران، ایران؛
تلفن: ۰۹۱۹۶۲۱۰۴۵۴ آدرس پست الکترونیکی: fzheidari@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۸۸/۱۰/۱۹ تاریخ پذیرش: ۸۹/۹/۱۵

مقدمه

مایکوباکتریوم‌ها به سه دسته کلی تقسیم می‌شوند: مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس که عامل اصلی سل ریوی به حساب می‌آید، مایکوباکتریوم لپرا عامل جذام و مایکوباکتریوم‌های آتیپیک (Atypical Mycobacteria)، غیرسلی یا محیطی که اصطلاحاً به آنها MOTT (Mycobacteria other Than Tuberculosis) NTM (Non-Tuberculosis Mycobacteria) یا EM (Environmental Mycobacteria) گفته می‌شود. در مقابل دو

دسته اول که طی چند دهه اخیر از نظر تعداد، تغییر چندانی نداشته‌اند، تعداد مایکوباکتریوم‌های آتیپیک شناسایی‌شده از حدود ۴۰ گونه در سال ۱۹۸۱ به بیش از ۱۰۰ گونه در سال ۲۰۰۹ افزایش یافته است (۱). براساس مطالعات اخیر، بیش از یک‌سوم مایکوباکتریوم‌های غیرتوبرکلوزیس مرتبط با بیماری‌های انسانی بوده و در نقاط مختلفی از بدن مانند ریه، پوست، مغز و ... قادر به ایجاد بیماری هستند (۲). مایکوباکتریوم‌های آتیپیک ساکنین رایج طبیعت بوده و به‌طور وسیعی در جهان انتشار یافته‌اند، ضمن اینکه این دسته به اکثر داروهای ضد سلی متداول مقاوم می‌باشند (۳). بنابراین با توجه به الگوی مقاومت دارویی و انتشار جهانی مایکوباکتریوم‌های غیرتوبرکلوزیس، مطالعات اپیدمیولوژیکی این دسته از نقش و اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

در سال‌های اخیر، روش‌های مولکولی متعددی برای مطالعه اپیدمیولوژیکی مایکوباکتریوم‌ها مطرح شده است که از این میان می‌توان به روش IS6110-RFLP، اسپولیگوتایپینگ و VNTR اشاره نمود (۱۴،۴). در دهه ۱۹۹۰، روش IS6110-RFLP به‌عنوان روش تایپینگ استاندارد برای اپیدمیولوژی بیماری سل معرفی شد. این روش براساس PCR نبوده و وقت‌گیر می‌باشد، در مقابل روش‌های VNTR و Spoligotyping براساس PCR بوده و سریع‌تر می‌باشند (۱۵،۵). روش VNTR ابزار قدرتمندی برای بررسی الگوی ژنتیکی (ژنوتایپ) مایکوباکتریوم‌های آتیپیک به حساب می‌آید؛ زیرا آنالیز در آن براساس لوکوس‌های اختصاصی و اندک صورت می‌گیرد که در مقایسه با روش‌های استاندارد مولکولی دیگر مانند اسپولیگوتایپینگ از حساسیت بالاتری برخوردار است (۶). در روش VNTR، ۱۱ لوکوس در ژنوم مایکوباکتریوم توبرکلوزیس شناسایی شده است، که شامل ۵ لوکوس MPTR (Major Polymorphic Tandem Repeats) (MPTR-A, MPTR-B, MPTR-C, MPTR-D, MPTR-E) و ۶ لوکوس ETR(Exact Tandem Repeats) (ETR-A, ETR-B, ETR-C, ETR-D, ETR-E, ETR-F) می‌باشد. محققان در سال‌های اخیر نشان دادند از بین ۱۱ لوکوس موردنظر، ۷ لوکوس (MPTR-A, ETR-A, ETR-B, ETR-C, ETR-D, ETR-E, ETR-F) دارای پلی‌مورفیسم طولی به‌علت وجود الحاق (Insertion) و یا حذف (Deletion) توالی‌های تکرارشونده پشت سرهم می‌باشد (۷). لوکوس‌های MPTR حاوی توالی تکرارشونده ۱۵جفت بازی به همراه یک توالی منفرد محافظت‌شده هستند که بین توالی تکرارشونده مجاور هم، تنوع توالی مشاهده می‌شود. هرکدام از لوکوس‌های ETR در ژنوم مایکوباکتریوم توبرکلوزیس حاوی توالی تکرارشونده ۷۹-۵۳ جفت باز با توالی DNA مشابه در توالی مجاور خود می‌باشند. MPTR-A و ETR-A، درطول مناطق کدکننده ژنی قرارگرفته‌اند و باقیمانده لوکوس‌ها، شامل ETR-C, ETR-B ,ETR-D, ETR-E, ETR-F در نواحی بین ژنی قرار دارند. لوکوس‌های ETR-C, ETR-D, ETR-E, ETR-F به‌عنوان تنظیم‌کننده و لوکوس ETR-B به‌عنوان خاتمه‌دهنده عمل می‌کنند (۸،۷). با وجود اینکه این لوکوس‌های ژنی به‌طور وسیعی با استفاده از روش VNTR برای مطالعات اپیدمیولوژیکی و تمایز سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس استفاده می‌شوند، اما این روش در مایکوباکتریوم‌های آتیپیک از قدمت کمتری برخوردار بوده و با توجه به اهمیت تحقیقات اپیدمیولوژیکی در این دسته، در سال‌های اخیر تلاش برای یافتن لوکوس‌های پلی‌مورفیک بیشتر شده است (۱۱)، تا به این طریق بتوان به تعیین ژنوتایپ‌ها، تمایز سویه‌های حساس و مقاوم و نحوه شیوع دسترسی پیدا کرد (۹). در این مطالعه، ۷ لوکوس ژنی با استفاده از روش VNTR به‌منظور یافتن لوکوس‌های پلی‌مورفیک و مطالعات اپیدمیولوژیکی مایکوباکتریوم‌های غیرتوبرکلوزیس مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی

این مطالعه بر روی ۴۸ نمونه ریوی و خارج ریوی جداشده از بیماران با علائم سل ریوی، مراجعه‌کننده به مرکز آموزشی- پژوهشی سل و بیماری‌های ریوی (بیمارستان مسیح دانشوری، تهران) از تیر ماه سال ۱۳۸۶ تا اردیبهشت ماه سال ۱۳۸۷ انجام شد. جداسازی اولیه این نمونه‌ها با روش پتروف ۴٪ و با استفاده از محیط LJ (Lowenstein Jensen) صورت گرفت. تست‌های افتراقی شامل احیای نیترات، آزمایش فعالیت کاتالاز، آزمایش نیاسین، سرعت رشد و تولید پیگمان بود. حساسیت دارویی در برابر ایزونیازید (۰/۲µg/ml)، ریفامپین (۴۰µg/ml)، استرپتومایسین (۱۰µg/ml)، اتامبوتول (۲µg/ml) و پیرازینامید (۲µg/ml) به روش تناسبی انجام و سویه‌ها به سه گروه حساس MDR و غیرMDR تقسیم‌بندی شدند. استخراج DNA از کلنی‌های مثبت با روش فنل- کلروفرم صورت گرفت. روش hsp65 PRA (Heat Shock Protein 65KD PCR Restriction Analysis) با

استفاده از ۳ آنزیم Ava II، Hph I، Hpa II و طبق پروتوکل‌های استاندارد برای تشخیص و تأیید گونه‌های آتیپیک انجام شد (۱۹،۲۰).

علاوه بر ۴۸ نمونه کلینیکی، الگوی VNTR سوش‌های استاندارد Myco. Simiae (ATCC 25275T). Myco. Fortuitum (ATCC 49404). Myco. Chelonae Abscessus (ATCC 19977T). Myco. Chelonae Chelonae (ATCC 35749T). Myco. Intracellular (ATCC 13950T). Myco. Parascrofulaceum (ATCC 19981T). Myco. Malmoens (ATCC 29571T). Myco. Gordonae (ATCC 14470T). Myco. Kansasii (ATCC 12478T) نیز به‌طور همزمان و مطابق مراحل زیر بررسی شد.

برای انجام PCR از پرایمرهای مربوطه استفاده گردید (جدول شماره۱) (۷).

سیکل PCR مورد استفاده برای همه لوکوس‌ها به‌صورت زیر انجام گرفت: مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴°C، سپس ۳۰ سیکل شامل: ۹۴°C به مدت ۳۰ ثانیه و ۶۵°C–۵۳ به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه.

محصولات PCR به دست آمده روی ژل ۱/۷٪، الکتروفورز گردید. تعداد دقیق توالی تکرارشونده پشت سرهم برای هرسویه به‌وسیله اندازه محصول PCR بر روی ژل تعیین و با استفاده از پروتوکل استاندارد آنالیز شد (۷).

جدول شماره ۱: مشخصات لوکوس‌های ژنی مورد مطالعه در سویه استاندارد $H_{37}RV$

رفرنس پرایمرها	اندازه محصولات PCR (bp)	تعداد و اندازه واحدهای تکرارشونده(bp)*	توالی پرایمرها('۵-'۳)	نام لوکوس
Frothingham (۱۹۹۵)	۳۴۳	(۱۶×۱۵)	GGTTACCACTTCGATGCGTCTGCC AGCCGCCGAAACCCATC	MPTR-A
Goyal et al. (۱۹۹٤)	۴۲۰	(۳×۷۵)+۲۳	AAATCGGTCCCATCACCTTCTTAT CGAAGCTGGGGTCGCCCGCGATTT	ETR-A
Frothingham and Meeker O Connell (۱۹۹۸)	۲۹۲	(۳×۵۷)+۸	GCGAACACCAGGACAGCATCATG GGCATGCCGGTGATCGAGTGG	ETR-B
	۲۷۶	(۴×۵۸)–۲۱	GTGATGCGCTGCAGAACCTGCAG GGCGTCTTGACCTCCACGAGCT	ETR-C
	۳۱۰	(۳×۷۷)+۷	CAGGTCACAACGAGAGGAAGAGC GCGGATCGGCCAGCGACTCCTC	ETR-D
	۲۲۴	(۳×۵۳)–۱	CTTCGGCGTCGAAGAGAGCCTC CGGAACGCTGGTCACCACCTAAG	ETR-E
	۴۷۶	(۳×۷۹)+۱۳	CTCGGTGATGGTCCGGCCGGTCAC GGAAGTGCTCGACAACGCCATGCC	ETR-F

تعداد کپی‌های موجود برای هر سویه به‌صورت یک عدد ۷ رقمی که نشان‌دهنده پروفایل اللی به ترتیب (از چپ به راست) شامل: MPTR-A, ETR-A, ETR-B, ETR-C, ETR-D, ETR-E, ETR-F به دست می‌آید. برای مثال پروفایل سویه استاندارد H37RV بدین صورت است: ۶۳۳۴۳۳۳ که چپ به راست نشان می‌دهد. ۶ کپی از واحد تکرارشونده پشت سرهم در لوکوس MPTRA، ۳ کپی از واحد تکرارشونده پشت سرهم در لوکوس ETR-A، ۳ کپی از واحد تکرارشونده پشت سرهم در لوکوس ETR-B، ۴ کپی از واحد تکرارشونده پشت سرهم در لوکوس ETR-C، ۳ کپی از واحد تکرارشونده پشت سرهم در لوکوس ETR-D، ۳ کپی از واحد تکرارشونده پشت سرهم در لوکوس ETR-E، ۳ کپی از واحد تکرارشونده پشت سرهم در لوکوس ETR-F وجود دارد (۷).

یافته‌ها

از بین ۴۸ نمونه مورد بررسی، ۲۰ نفر (۴۱/۶٪) زن و ۲۸ نفر (۵۸/۳٪) مرد بودند. از نظر ملیت نمونه‌های مورد آزمایش، ۳۵ نمونه (۷۲/۹٪) ایرانی و ۱۳ نمونه (۲۷٪) افغانی بودند. دامنه سنی بیماران مورد مطالعه از ۸۵–۱۸ سال و میانگین دامنه سنی آنها ۱±۵۲ سال بود. میانگین سن

افراد ایرانی ۵۴/۷ سال و افراد افغانی ۳۰/۳ سال گزارش شد.

از کل نمونه‌های مورد بررسی، ۴۶ مورد (۹۵/۸٪) نمونه ریوی و ۲ مورد (۴/۲٪) نمونه خارج ریوی مربوط به ادرار و خون بود. از مجموع ۴۸ نمونه، ۸ نمونه (۱۶/۶٪) MDR، ۴ نمونه (۸/۳٪) حساس و ۳۶ نمونه (۷۵٪) غیرMDR بودند. نتایج به دست آمده از ۲ روش فنوتیپی و hsp65 PRA با یکدیگر همخوانی داشتند، همچنین ۱۳ نمونه (۲۷٪) تند رشد و سایر نمونه‌ها (۷۳٪) کند رشد بودند (جدول شماره ۲).

جدول شماره ۲: تشخیص گونه‌های مختلف مایکوباکتریوم‌های غیرتوبرکلوزیس با استفاده از تست‌های افتراقی و روش hsp65 PRA

	مایکوباکتریوم‌های آتیپیک	
	گونه	**تعداد گونه**
تند رشد	مایکوباکتریوم کلونی زیرگونه کلونی	۳
	مایکوباکتریوم فورچوئیتوم	۳
	مایکوباکتریوم کلونی زیرگونه آبسسوس	۷
کند رشد	مایکوباکتریوم سیمیه	۱۸
	مایکوباکتریوم کانزاسی	۸
	مایکوباکتریوم گوردونی	۱
	مایکوباکتریوم اسکروفولاسئوم	۴
	مایکوباکتریوم مالموئنس	۱
	مایکوباکتریوم اینتراسلولار	۳
تعداد کل		۴۸

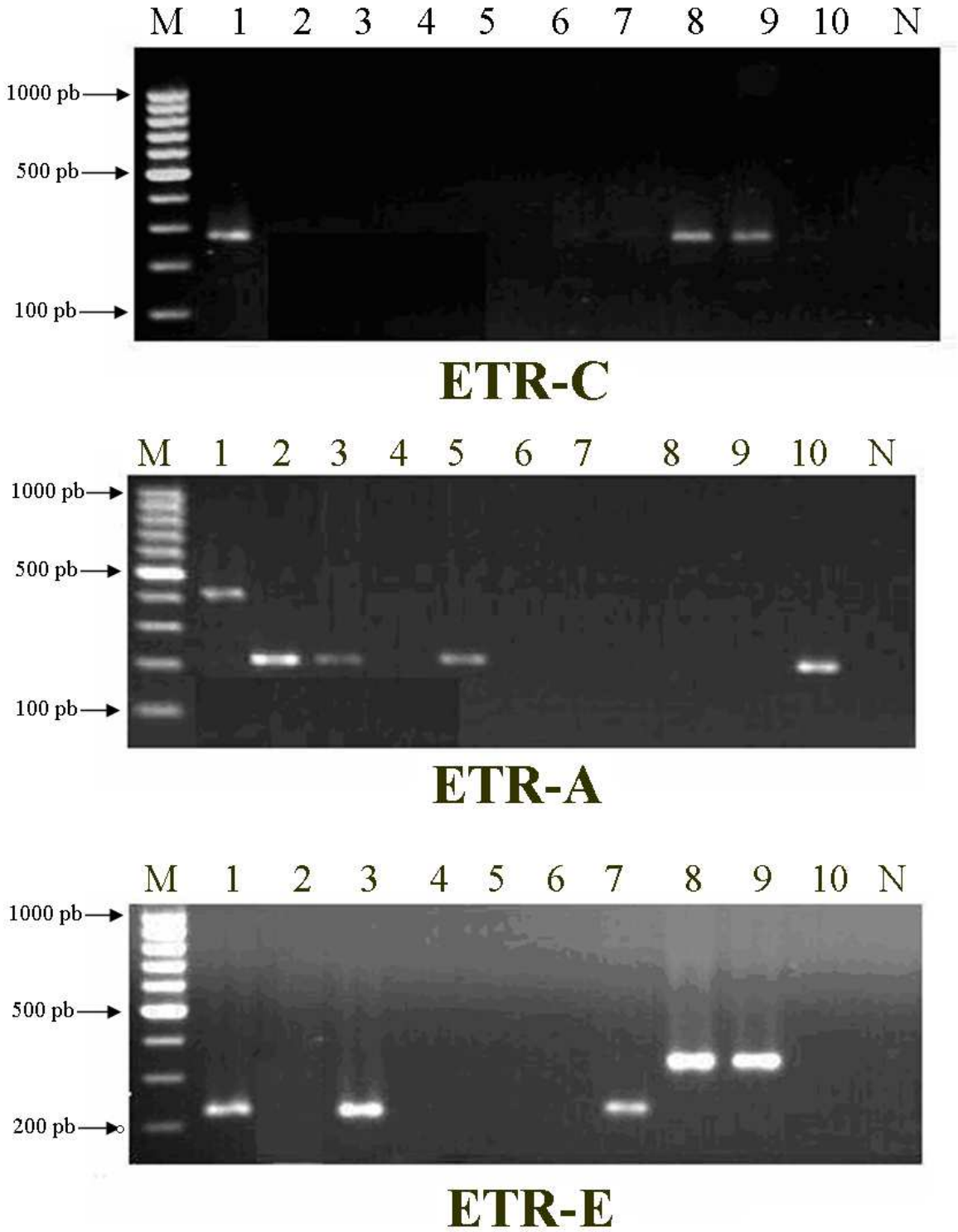
نتایج به دست آمده از روش VNTR نشان داد از ۴۸ نمونه مایکوباکتریوم آتیپیک مورد بررسی که از بیماران مبتلا به سل ریوی جدا شده بود، در ۴۲ نمونه، لوکوس‌هایی با ۲ یا ۳ تکرار مشاهده گردید (جدول شماره ۳)، درحالی‌که برای هیچ‌کدام از سوش‌های استاندارد مایکوباکتریوم‌های آتیپیک همانند ۶ نمونه کلینیکی باقیمانده محصول PCR به دست نیامد و لوکوسی با پلی‌مورفیسم قابل قبول دیده نشد (شکل شماره ۱). نمونه‌های کلینیکی از نظر طبقه‌بندی دارای الگوی VNTR ناقص بودند (الگوی ناقص بدین معنی است که در بعضی از لوکوس‌های موردنظر، محصول PCR به دست نیامده است).

بالاترین پروفایل عددی برای لوکوس‌های MPTR-A, ETR-A, ETR-B, ETR-C, ETR-D, ETR-E, ETR-F به ترتیب ۶۴۲۵۵۳۶۲ و پایین‌ترین پروفایل عددی برای لوکوس‌های فوق به ترتیب ۵۲۱۲۱۳۳۲ گزارش شد (جدول شماره ۳).

جدول شماره ۳: تعیین پروفایل VNTR **در نمونه‌های کلینیکی مورد بررسی**

ردیف	MPTR-A	ETR-A	ETR-B	ETR-C	ETR-D	ETR-E	ETR-F
۱	۶	۴	۲	–	۱	۴	۳
۲	۶	–	–	۴	۱	–	–
۳	–	–	–	–	–	–	–
٤	–	–	–	–	–	–	–
٥	۶	۳	۲	۴	۱	۳	–
٦	۶	۳	۲	۴	۳	۳	۶
۷	–	–	–	–	۱	۳	–
۸	۶	۴	۲	–	۱	–	–
۹	۶	–	۲	۵	۳	۳	–
۱۰	–	۳	۱	۴	۱	۳	۶
۱۱	–	۳	۲	–	۱	۳	۶
۱۲	–	–	۱	۴	۳	–	–
۱۳	۶	–	–	–	–	–	–

١٤	-	-	-	-	-	-	-
١٥	۶	-	-	-	-	۳	-
١٦	۶	۲	-	۴	۱	۳	۳
١٧	-	۴	۲	۵	-	۲	-
١٨	-	-	۱	۴	۳	۳	-
١٩	-	-	-	-	-	-	-
٢٠	-	۳	-	-	۳	۳	۳
٢١	۷	۳	۲	۴	۱	۳	۱
٢٢	-	-	۲	-	-	-	-
٢٣	-	-	۲	-	-	-	۶
٢٤	۶	-	-	-	-	-	-
٢٥	-	-	۲	۴	-	-	
٢٦	-	-	-	-	-	-	-
٢٧	-	-	-	۴	-	-	-
٢٨	۶	۴	-	۴	-	۳	-
٢٩	-	-	۲	-	-	-	-
٣٠	-	-	-	۴	۳	-	-
٣١	۶	-	۲	-	۱	۳	-
٣٢	۵	-	۲	-	-	۳	-
٣٣	۶	۳	-	-	-	-	-
٣٤	-	-	۲	-	۴	-	-
٣٥	۶	۳	۲	-	۴	۱	۲
٣٦	-	۳	۳	۴	-	۱	۳
٣٧	۶	۲	۱	-	۳	۳	۳
٣٨	۶	-	۲	۴	۳	۲	-
٣٩	-	-	۲	۴	۱	۳	-
٤٠	۶	-	-	-	۳	۵	-
٤١	-	۳	۲	۲	۵	۳	-
٤٢	-	-	-	۴	-	۳	-
٤٣	-	-	-	۴	۳	۳	-
٤٤	-	-	-	۴	۵	-	-
٤٥	۶	۴	-	۴	۵	۵	-
٤٦	-	-	۲	-	۵	-	-
٤٧	-	-	-	-	-	-	-
٤٨	۶	۲	-	۴	۳	-	۳



شکل شماره ۱: عدم حضور لوکوس‌های ETR-C, ETR-A, ETR-E در سویه استاندارد Myco.Simiae و حضور این لوکوس‌ها در برخی از نمونه‌های کلینیکی Myco.Simiae

N: سویه استاندارد مایکوباکتریوم سیمیه‌ای M: مارکر DNA (100 bp Ladder)

اعداد ۱۰-۱: نمونه‌های کلینیکی Myco.Simiae

بحث

بیماری سل یکی از مهم‌ترین بیماری‌های عفونی قرن حاضر است که توانایی درگیر نمودن کلیه اعضای بدن را دارد. امروزه این بیماری بیش از دیگر بیماری‌های عفونی در جهان موجب مرگ و میر بالغین و افراد جوان می‌شود (۱۰). اگرچه گونه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس به‌عنوان عامل اصلی بیماری‌های ریوی در انسان شناخته شده‌اند، اما امروزه بسیاری از محققین قدرت بیماری‌زایی مایکوباکتریوم‌های آتیپیک را کمتر از این دسته نمی‌دانند (۲). در مطالعه‌ای که در سال ۱۹۰۸ توسط Duvall صورت گرفت، پتانسیل بیماری‌زایی در مایکوباکتریوم‌های محیطی برای اولین بار مطرح شد و امروزه بیش از یک‌سوم مایکوباکتریوم‌های آتیپیک، مرتبط با بیماری‌های انسانی گزارش شده‌اند. مقاوم بودن این دسته از مایکوباکتریوم‌ها به اکثر داروهای ضدسلی (مانند ایزونیازید، ریفامپین، استرپتومایسین، اتامبوتول و پیرازینامید) و انتشار وسیع آنها در طبیعت، اهمیت مطالعه بر روی مایکوباکتریوم‌های آتیپیک را بیشتر کرده است (۱۲). آنالیز توالی‌های ژنومی در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با استفاده از روش VNTR ، کمپلکس لوکوس‌های متعددی را شناسایی می‌کند، که به‌علت دارا بودن پلی‌مورفیسم طولی می‌تواند در مطالعات اپیدمیولوژیکی مورد استفاده قرار گیرد، از این میان می‌توان به لوکوس‌های ETR و MPTR اشاره نمود (۱۶،۱۳). در مطالعه‌ای که توسط Meeker-O و Frothingham در سال ۱۹۹۸ صورت گرفت، روش VNTR به‌عنوان روشی جدید برای بررسی تنوع ژنتیکی (ژنوتایپ) مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس معرفی شد. در این مطالعه، ۱۱ لوکوس VNTR در ژنوم $H_{37}RV$ شناسایی شد که شامل ۵ لوکوس (MPTR-A, MPTR-B, MPTR-C, MPTR-E, MPTR-F) و ۶ لوکوس (ETR-A, ETR-B, ETR-C, ETR-D, ETR-E, ETR-F) بود. یکی از ۵ لوکوس MPTR و ۶ لوکوس ETR دارای پلی‌مورفیسم طولی به‌علت وجود الحاق (Inserting) و یا حذف (Deletion) توالی‌های تکرارشونده پشت سرهم بودند که از این لوکوس‌ها برای مطالعات اپیدمیولوژیکی ۲۵ گونه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس و ۲۳ زیرگونه مایکوباکتریوم بوویس زیرگونه BCG استفاده شد و در پایان ۲۲ نمای عددی برای گونه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس و ۵ نمای عددی برای زیرگونه‌های مایکوباکتریوم بویس (BCG) شناسایی گردید (۷). مطالعه‌ای که در مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی ایران طی سال‌های ۲۰۰۸-۲۰۰۷ با استفاده از روش VNTR برای متمایز کردن الگوی ژنتیکی سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس ایرانی و افغانی بر پایه لوکوس‌های ETR و MPTR انجام شد، نشان داد که تمام لوکوس‌های مورد بررسی دارای پلی‌مورفیسم می‌باشند و از لوکوس ETR-A نیز می‌توان به‌عنوان لوکوس بسیار افتراق‌دهنده در مطالعات اپیدمیولوژیکی استفاده نمود (۱۷). با وجود اینکه از لوکوس‌های ETR و MPTR با استفاده از روش VNTR برای تایپینگ سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و مطالعات اپیدمیولوژیکی این دسته به‌طور وسیعی استفاده شده است، اما عدم حضور مایکوباکتریوم‌های آتیپیک در بررسی‌های فوق مانع از تعمیم و استفاده از نتایج حاصل از این تحقیقات برای مطالعه حاضر شد. به‌طورکلی روش VNTR در مایکوباکتریوم‌های آتیپیک از قدمت کمتری برخوردار بوده و تعداد لوکوس‌های شناسایی‌شده که دارای پلی‌مورفیسم مناسب برای مطالعات اپیدمیولوژیکی این گروه باشد، بسیار اندک است و بیشتر بررسی‌های انجام‌شده در این زمینه محدود به M. ulceranse می‌باشد. Ablordey و همکارانش در سال ۲۰۰۵ از روش VNTR برای ژنوتایپ مایکوباکتریوم اولسرانس استفاده کردند. در این مطالعه، از ۱۹ لوکوس مورد بررسی، ۹ لوکوس شناسایی شد که در ژنوم این گونه، دارای پلی‌مورفیسم بوده و در مطالعات اپیدمیولوژیکی M. ulceranse حایز اهمیت می‌باشند (۱۸). در پژوهشی که توسط Hilty در سال ۲۰۰۷ صورت گرفت، لوکوس جدیدی در ژنوم مایکوباکتریوم اولسرانس برای روش VNTR شناسایی گردید. در این مطالعه، با بررسی ۳۴ لوکوس از نظر پلی‌مورفیسم، در بسیاری از نمونه‌ها لوکوس‌هایی با ۱ یا ۲ تکرار مشاهده گردید و فقط یک لوکوس دارای پلی‌مورفیسم قابل قبول در مایکوباکتریوم اولسرانس Agy99 گزارش شد (۶). با وجود کارآمد بودن این تحقیقات برای تعیین ژنوتایپ مایکوباکتریوم اولسرانس، عدم حضور این گونه باکتری در نمونه‌های آتیپیک در این پژوهش، استفاده از لوکوس‌های پلی‌مورفیک شناسایی‌شده را در مطالعه حاضر محدود ساخت، ضمن اینکه لوکوس‌های شناسایی‌شده در M. ulceranse اختصاصی می‌باشد. پلی‌مورفیک

بودن لوکوس‌های ETR و MPTR در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس و محدود بودن مطالعات انجام‌شده بر روی مایکوباکتریوم‌های آتیپیک باعث گردید که در مطالعه حاضر این لوکوس‌ها برای اولین بار در مورد گونه‌های مختلف مایکوباکتریوم‌های غیرتوبرکلوزیس مورد بررسی قرار گیرد. در مطالعه حاضر، الگوی VNTR ۴۸ گونه مختلف مایکوباکتریوم‌های آتیپیک با استفاده از ۷ لوکوس ژنی شامل MPTR-A, ETR-A, ETR-E, ETR-D, ETR-C, ETR-B, ETR-F برای یافتن لوکوس‌های پلی‌مورفیک و در پی آن مطالعات اپیدمیولوژیکی بررسی شد. عدم مشاهده قطعات PCR حاصل از این لوکوس‌ها در سویه‌های استاندارد مایکوباکتریوم‌های غیرتوبرکلوزیس نشان داد لوکوس‌های ژنی ETR و MPTR در ژنوم این دسته حضور نداشته و دارای پلی‌مورفیسم نمی‌باشند، اگرچه در جدول شماره ۴، لوکوس‌هایی با ۲ یا ۳ تکرار در نمونه‌های کلینیکی قابل مشاهده است، اما این موضوع نشان‌دهنده پلی‌مورفیک بودن این لوکوس‌ها نبوده و نیاز به بررسی‌های بیشتری دارد.

نتیجه‌گیری

با توجه به اینکه لوکوس‌های ETR و MPTR، برای بررسی تنوع ژنتیکی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس به‌طور وسیعی مورد استفاده قرار می‌گیرند، اما این لوکوس‌ها در مایکوباکتریوم‌های آتیپیک دارای پلی‌مورفیسم نبوده و نمی‌توانند در مطالعات اپیدمیولوژیکی این دسته مفید واقع شوند و همچنان تلاش برای آنالیز توالی‌های ژنومی مایکوباکتریوم‌های غیرتوبرکلوزیس با استفاده از روش VNTR به‌منظور یافتن لوکوس‌های پلی‌مورفیک مناسب ادامه دارد.

References:

1. Hartmans S, Bont AM. The Genus Mycobacterium Nonmedical. In the Prokaryotes. Dwrkin M, editor. New York: Springer; 2006. p. 889-918 (Vol 3).

2. Katoch VM. Infection Due to Non-Tuberculous Mycobacteria. Indian J Med Res 2004;120:290-304.

3. AI-Mahruqi SH, Van Ingen J, Busaidys-AI, Boeree MJ, AI-Zadjalis, Patel A, et al. Clinical Relevance of Non Tuberculous Mycobacteria. Oman Emery Infect Dis 2009;15:292-294.

4. Mostrom P, Gordon M, Sola C, Ridell M. Methods Used In The Molecular Epidemiology of Tuberculosis. J Clin Microbiol 2002;8(11):694-704.

5. Doroudchi M, Kremer K, Basiri EA. IS6110- RFLP and Spoligotyping of Mycobacterium Tuberculosis Isolates in Iran. J Infect Dis 2000;32:663-668.

6. Hilty M, Kaser M, Zinsstag J, Stinear T, Pluschke G. Analysis of the Mycobacterium Ulcerans Genome Sequence Reveals New Loci for Variable Number Tandem Repeats (VNTR) Typing. Microbiol 2007;153:1483-1487.

7. Frothingham R, Meeker O, Connell W. Genetic Diversity In The Mycobacterium Tuberculosis Complex Based On Variable Number of Tandem DNA Repeats. J Clin Microbiol 1998;144:1189-1196.

8. Skuce RA, McCorry TP, McCarroll JF, Roring SM, Scott AN, Brittain D, et al. Discrimination of Mycobacterium Tuberculosis Complex Bacteria Using Novel VNTR-PCR Targets. J Clin Microbiol 2002;148:519-528.

9. Stragier P, Ablordey A, Meyers WM, Portaels F. Genotyping Mycobacterium Ulcerans and Mycobacterium Marinum by Using Mycobacterial Interspersed Repetitive Units. J Bacteriol 2005;187:1639-47.

10. Demort M, Chaulet P. Treatment of Tuberculosis: Guidelines For National Programmes. Geneva: WHO; 1997. p. 218-251.

11. Hidarei F, Farnia P, Nowroozi J, Majd A, Tajeddin E, Masjedi MR, Velayati AA. The Rapid Identification Atypical Mycobacterium Pulmonary in Tuberculosis Patients: Avaluation of QUB3232 Locus Using the VNTR Method. J Zanjan University 2009;17(67):29-40. [Full Text in Persian]

12. Sriyabhaya N, Wonswatana S. Pulmonary Infection Caused by Atypical Mycobacteria: A Report of 24 Cases in Thailand. Rev Infect Dis 1981;3:1085-1089.

13. Portaels F, Stragier P, Ablordey A, Meyers WM. Genotyping Mycobacterium Ulcerans and Mycobacterium Marinum by Using Mycobacterium Interspersed Repetitive Units. J Bacter 2005;187(5):1639-1647.

14. Farnia P, Masjedi MR, Varahram M, Mirsaeidi M, Ahmadi M, et al. The Recent-Transmission of Mycobacterium Tuberculosis Strains Among Iranian and Afghan Relapse Cases: A DNA- Fingerprinting Using RFLP and Spoligityping. BMC Infect Dis 2008;8:109.

15. Kam K, Yip CW, Tse W, et al. Optimization of Variable Tandem Repeat Typing Set for Diferentiating Mycobacterium Tuberculosis Strains in the Beijing Family. FEMS Microbiol Lett 2006;256:258-65.

16. Mazars E, Lesjean S, Banuls AL, et al. High-Resolution Minisatellite-Based Typing as a Portable Approach to Global Analysis of Mycobacterium Tuberculosis Molecular Epidemiology. Proc Natl Acad Sci USA 2001;98:1901-6.

17. Tajeddin E, Farnia P, Nowroozi J, Masjedi MR, Velayati AA. Evaluation of Genetic Pattern of Mycobacterium Tuberculosis Separated of Iranian and Afgan TB Patients: Using the VNTR Typing Method. J Kurdestan University 2008;31:53-61. [Full Text in Persian]

18. Ablordey A, Swings J, Hubans C, Chemlal K, Locht C, Portaels F, Supply Ph. Multilocus Variable-Number Tandem Repeat Typing of Mycobacterium Ulcerans. J Clin Microbial 2005;43(4):1546-1551.

19. Kim H, Kim SH, Shim TS, et al. PCR Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis (PRA)-Algorithm Targeting 644 bp Heat Shock Protein 65(hsp65) Gene for Gifferentiation of Mycobacterium Spp. J Microbiol Methods 2005;62:199-209.

20. Hafner B, Haag H, Geiss HK, Nolte O. Different Molecular Methods for the Identification of Rarely Isolated Non-Tuberculous Mycobacteria and Description of New hsp65 Fragment Length Polymorphism Patterns. Mol Cell Probes 2004;18:59-65.