

## بررسی الگوی ژنتیکی مایکوباکتریوم‌های غیر توبرکلوزیس با استفاده از روش VNTR

فضه حیدری<sup>۱</sup>، پریسا فرنیآ<sup>۲</sup>، جمیله نوروزی<sup>۳</sup>، احمد مجد<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup> کارشناس ارشد میکروبی‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی تهران واحد شمال، تهران، ایران.

<sup>۲</sup> دانشیار میکروبی‌شناسی، مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

<sup>۳</sup> استاد میکروبی‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی تهران واحد شمال، تهران، ایران.

<sup>۴</sup> استاد زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی تهران واحد شمال، تهران، ایران.

### چکیده

**زمینه و هدف:** الگوی مقاومت دارویی و انتشار جهانی مایکوباکتریوم‌های آتیبیک (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 آتیبیک با استفاده از روش VNTR به منظور مطالعات اپیدمیولوژیکی این دسته بررسی گردید.

**روش بررسی:** ۴۸ نمونه ریوی و خارج ریوی جدا شده از بیماران با علائم 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 به عنوان مایکوباکتریوم‌های غیر توبرکلوزیس شناسایی شده بودند، انتخاب و با استفاده از ۷ لوکوس ژنتیکی شامل: ETR-A, ETR-B, ETR-C, ETR-D, ETR-E, ETR-F, MPTR-A از نظر الگوی VNTR بررسی شدند. لازم به ذکر است که روش VNTR علاوه بر نمونه‌های کلینیکی به طور همزمان بر روی سویه‌های استاندارد مایکوباکتریوم‌های آتیبیک نیز انجام شد.

**یافته‌ها:** نتایج به دست آمده از روش VNTR نشان داد ۷ لوکوس مورد بررسی در هیچ کدام از سوش‌های استاندارد مایکوباکتریوم‌های آتیبیک دارای پلی مورفیسم نبودند؛ در حالی که برخی از این توالی‌های تکراری پشت سرهم در ۴۲ نمونه از مایکوباکتریوم‌های غیر توبرکلوزیس جدا شده از بیماران، پلی مورفیک بودند. در ۶ نمونه باقیمانده محصول PCR (برای هیچ کدام از لوکوس‌ها) مشاهده نشد. **نتیجه‌گیری:** با وجود کارآمد بودن لوکوس‌های ژنی نام برده برای مطالعات اپیدمیولوژیکی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس، این لوکوس‌ها در مایکوباکتریوم‌های غیر توبرکلوزیس پلی مورفیک 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 به نظر می‌رسد.

**کلید واژه‌ها:** مایکوباکتریوم؛ مطالعات اپیدمیولوژیکی؛ لوکوس‌های VNTR.

نویسنده مسئول مکاتبات: دانشگاه آزاد اسلامی تهران واحد شمال، تهران، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی: fzheidari@yahoo.com

تلفن: ۰۹۱۹۶۲۱۰۴۵۴

تاریخ پذیرش: ۸۹/۹/۱۵

تاریخ دریافت: ۸۸/۱۰/۱۹

### مقدمه

(Atypical Mycobacteria)، غیرسلی یا محیطی که اصطلاحاً به آنها MOTT (Mycobacteria other Than Tuberculosis) یا NTM (Non-Tuberculosis Mycobacteria) یا EM (Environmental Mycobacteria) گفته می‌شود. در مقابل دو

مایکوباکتریوم‌ها به سه دسته کلی تقسیم می‌شوند: مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس که عامل اصلی سل ریوی به حساب می‌آید، مایکوباکتریوم لپرا عامل جذام و مایکوباکتریوم‌های آتیبیک

تکرار شونده مجاور هم، تنوع توالی مشاهده می‌شود. هر کدام از لوکوس‌های ETR در ژنوم مایکوباکتریوم توبرکلوزیس حاوی توالی تکرار شونده ۷۹-۵۳ جفت باز با توالی DNA مشابه در توالی مجاور خود می‌باشند. ETR-A و MPTR-A، در طول مناطق کدکننده ژنی قرار گرفته‌اند و باقیمانده لوکوس‌ها، شامل ETR-C, 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 آتیبیک 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 غیر توبرکلوزیس مورد بررسی قرار گرفت.

### روش بررسی

این مطالعه بر روی ۴۸ نمونه ریوی و خارج ریوی جدا شده 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 نترات، آزمایش فعالیت کاتالاز، آزمایش نیاسین، سرعت رشد و تولید پیگمان بود. حساسیت دارویی در برابر ایزونیاژید (۰/۲ μg/ml)، ریفامپین (۴۰ μg/ml)، استرپتوماکسین (۱۰ μg/ml)، اتامبوتول (۲ μg/ml) و پیرازینامید (۲ μg/ml) به روش تناسبی انجام و سویه‌ها به سه گروه حساس MDR و غیر MDR تقسیم‌بندی شدند. استخراج DNA از کلنی‌های مثبت با روش فنل-کلروفرم صورت گرفت. روش PRA hsp65 (Heat Shock Protein 65KD PCR Restriction Analysis) با

دسته اول که طی چند دهه اخیر از نظر تعداد، تغییر چندانی نداشته‌اند، تعداد مایکوباکتریوم‌های آتیبیک شناسایی شده از حدود ۴۰ گونه در سال ۱۹۸۱ به بیش از ۱۰۰ گونه در سال ۲۰۰۹ افزایش یافته است (۱). براساس مطالعات اخیر، بیش از یک سوم مایکوباکتریوم‌های غیر توبرکلوزیس مرتبط با بیماری‌های انسانی بوده و در نقاط مختلفی از بدن مانند ریه، پوست، مغز و ... قادر به ایجاد بیماری هستند (۲). مایکوباکتریوم‌های آتیبیک ساکنین رایج طبیعت بوده و به‌طور وسیعی در جهان انتشار یافته‌اند، ضمن اینکه این دسته به اکثر داروهای ضد سل متداول مقاوم می‌باشند (۳). بنابراین با توجه به الگوی مقاومت دارویی و انتشار جهانی مایکوباکتریوم‌های غیر توبرکلوزیس، 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 (۴،۱۴). 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 (۵،۱۵). روش VNTR ابزار قدرتمندی برای بررسی الگوی ژنتیکی (ژنوتایپ) مایکوباکتریوم‌های آتیبیک 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 تکرار شونده پشت سرهم می‌باشد (۷). لوکوس‌های MPTR حاوی توالی تکرار شونده ۱۵ جفت بازی به همراه یک توالی منفرد محافظت‌شده هستند که بین توالی

برای انجام PCR از پرایمرهای مربوطه استفاده گردید (جدول شماره ۱) (۷).

سیکل PCR مورد استفاده برای همه لوکوس‌ها به صورت زیر انجام گرفت: مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴°C، سپس ۳۰ سیکل شامل: ۹۴°C به مدت ۳۰ ثانیه و ۵۳-۶۵°C 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 تکرار شونده پشت سرهم برای هر سویه به وسیله اندازه محصول PCR بر روی ژل تعیین و با استفاده از پروتوکل استاندارد آنالیز شد (۷).

استفاده از ۳ آنزیم Hpa II، Hph I، Ava II و طبق پروتوکل‌های استاندارد برای تشخیص و تأیید گونه‌های آتپیک 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. Malmoeensis (ATCC 29571T). Myco. Gordonae (ATCC 14470T). Myco. Kansasii (ATCC 12478T) نیز به طور همزمان و مطابق

مراحل زیر بررسی شد.

جدول شماره ۱: مشخصات لوکوس‌های ژنی مورد مطالعه در سویه استاندارد H<sub>37</sub>RV

نام لوکوس	توالی پرایمرها (۵'-۳')	تعداد و اندازه واحدهای تکرار شونده (bp)*	اندازه محصولات PCR (bp)	دفترس پرایمرها
MPTR-A	GGTTACCACTTCGATGCGTCTGCC AGCCGCCGAAACCCATC	(۱۶×۱۵)	۳۴۳	Frothingham (۱۹۹۵)
ETR-A	AAATCGGTCCCATCACCTTCTTAT CGAAGCTGGGGTCGCCCGGATTT	(۳×۷۵)+۲۳	۴۲۰	Goyal et al (۱۹۹۴)
ETR-B	GCGAACACCAGGACAGCATCATG GGCATGCCGGTGATCGAGTGG	(۳×۵۷)+۸	۲۹۲	
ETR-C	GTGATGCGCTGCAGAACCTGCAG GGCGTCTTGACCTCCACGAGCT	(۴×۵۸)-۲۱	۲۷۶	
ETR-D	CAGGTCACAACGAGAGGAAGAGC GCGGATCGGCCAGCGACTCCTC	(۳×۷۷)+۷	۳۱۰	Frothingham and Meeker O Connell (۱۹۹۸)
ETR-E	CTTCGGCGTCGAAGAGAGCCTC CGGAACGCTGGTCACCACCTAAG	(۳×۵۳)-۱	۲۲۴	
ETR-F	CTCGGTGATGGTCCGGCCGGTCAC GGAAGTGCTCGACAACGCCATGCC	(۳×۷۹)+۱۳	۴۷۶	

ETR-D، ۳ کپی از واحد تکرار شونده پشت سرهم در لوکوس ETR-E، ۳ کپی از واحد تکرار شونده 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 ۵۲±۱ سال بود. میانگین سن

تعداد کپی‌های موجود برای هر سویه به صورت 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 H<sub>37</sub>RV بدین صورت است: ۶۳۳۴۳۳۳۳ که چپ به راست نشان می‌دهد. ۶ کپی از واحد تکرار شونده پشت سرهم در لوکوس MPTR-A، ۳ کپی از واحد تکرار شونده پشت سرهم در لوکوس ETR-A، ۳ کپی از واحد تکرار شونده پشت سرهم در لوکوس ETR-B، ۴ کپی از واحد تکرار شونده پشت سرهم در لوکوس ETR-C، ۳ کپی از واحد تکرار شونده پشت سرهم در لوکوس

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٪) غیر MDR 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 غیر توبرکلوزیس با استفاده از تست‌های افتراقی و روش hsp65 PRA

مایکوباکتریوم‌های آتیپیک		
تعداد گونه	گونه	
۳	مایکوباکتریوم کلونی زیرگونه کلونی	تند رشد
۳	مایکوباکتریوم فورجوتیوم	
۷	مایکوباکتریوم کلونی زیرگونه آبسوس	
۱۸	مایکوباکتریوم سیمیه	کند رشد
۸	مایکوباکتریوم کانزاسی	
۱	مایکوباکتریوم گوردونی	
۴	مایکوباکتریوم اسکروفولاستوم	
۱	مایکوباکتریوم مالمونتس	
۳	مایکوباکتریوم اینتراسلولار	
۴۸		تعداد کل

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)، در حالی که برای هیچ کدام از سوش‌های استاندارد مایکوباکتریوم‌های آتیپیک همانند ۶ نمونه کلینیکی باقیمانده محصول PCR به دست نیامد و لوکوسی با پلی مورفیسم 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	-	-	-	-	-	-	-
۴	-	-	-	-	-	-	-
۵	۶	۳	۲	۴	۱	۳	-
۶	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	-	-	-	-	-	-

-	-	-	-	-	-	-	۱۴
-	۳	-	-	-	-	۶	۱۵
۳	۳	۱	۴	-	۲	۶	۱۶
-	۲	-	۵	۲	۴	-	۱۷
-	۳	۳	۴	۱	-	-	۱۸
-	-	-	-	-	-	-	۱۹
۳	۳	۳	-	-	۳	-	۲۰
۱	۳	۱	۴	۲	۳	۷	۲۱
-	-	-	-	۲	-	-	۲۲
۶	-	-	-	۲	-	-	۲۳
-	-	-	-	-	-	۶	۲۴
-	-	-	۴	۲	-	-	۲۵
-	-	-	-	-	-	-	۲۶
-	-	-	۴	-	-	-	۲۷
-	۲	-	۴	-	۴	۶	۲۸
-	-	-	-	۲	-	-	۲۹
-	-	۳	۴	-	-	-	۳۰
-	۳	۱	-	۲	-	۶	۳۱
-	۳	-	-	۲	-	۵	۳۲
-	-	-	-	-	۳	۶	۳۳
-	-	۴	-	۲	-	-	۳۴
۲	۱	۴	-	۲	۳	۶	۳۵
۳	۱	-	۴	۳	۳	-	۳۶
۳	۳	۳	-	۱	۲	۶	۳۷
-	۲	۳	۴	۲	-	۶	۳۸
-	۳	۱	۴	۲	-	-	۳۹
-	۵	۳	-	-	-	۶	۴۰
-	۳	۵	۲	۲	۳	-	۴۱
-	۳	-	۴	-	-	-	۴۲
-	۳	۳	۴	-	-	-	۴۳
-	-	۵	۴	-	-	-	۴۴
-	۵	۵	۴	-	۴	۶	۴۵
-	-	۵	-	۲	-	-	۴۶
-	-	-	-	-	-	-	۴۷
۳	-	۳	۴	-	۲	۶	۴۸



### ETR-C



### ETR-A



### ETR-E

شکل شماره ۱: عدم حضور لوکوس های ETR-C, ETR-A, ETR-E در سویه استاندارد Myco.Simiae و حضور این لوکوس ها در برخی از نمونه های کلینیکی Myco.Simiae  
 N: سویه استاندارد مایکوباکتریوم سیمیهای M: مارکر DNA (100 bp Ladder)  
 اعداد ۱-۱۰: نمونه های 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 مایکوباکتریوم‌توبرکلوزیس کمپلکس به‌عنوان عامل اصلی بیماری‌های ریوی در انسان شناخته شده‌اند، اما امروزه بسیاری از محققین قدرت بیماری‌زایی مایکوباکتریوم‌های آتیبیک 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 آتیبیک، مرتبط با بیماری‌های انسانی گزارش شده‌اند. مقاوم بودن این دسته از مایکوباکتریوم‌ها به اکثر داروهای ضدسل (مانند ایزونیاژید، ریفامپین، استرپتوماکسین، اتامبوتول و پیرازینامید) و انتشار وسیع آنها در طبیعت، اهمیت مطالعه بر روی مایکوباکتریوم‌های آتیبیک را بیشتر کرده است (۱۲). آنالیز توالی‌های ژنومی در مایکوباکتریوم‌توبرکلوزیس 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 (۱۳، ۱۶). در مطالعه‌ای که توسط Meeker-O و Frothingham در سال ۱۹۹۸ صورت گرفت، روش VNTR به‌عنوان روشی جدید برای بررسی تنوع ژنتیکی (ژنوتایپ) مایکوباکتریوم‌توبرکلوزیس کمپلکس معرفی شد. در این مطالعه، ۱۱ لوکوس VNTR در ژنوم H<sub>37</sub>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 تکرار شونده پشت سرهم بودند که از این لوکوس‌ها برای مطالعات اپیدمیولوژیکی ۲۵ گونه مایکوباکتریوم‌توبرکلوزیس کمپلکس و ۲۳ زیرگونه مایکوباکتریوم‌بوویس زیرگونه BCG استفاده شد و در پایان ۲۲ نمای عددی برای

گونه‌های مایکوباکتریوم‌توبرکلوزیس کمپلکس و ۵ نمای عددی برای زیرگونه‌های مایکوباکتریوم‌بوویس (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 مایکوباکتریوم‌توبرکلوزیس 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 مایکوباکتریوم‌توبرکلوزیس و مطالعات اپیدمیولوژیکی این دسته به‌طور وسیعی استفاده شده است، اما عدم حضور مایکوباکتریوم‌های آتیبیک در بررسی‌های فوق مانع از تعمیم و استفاده از نتایج حاصل از این تحقیقات برای مطالعه حاضر شد. به‌طور کلی روش VNTR مایکوباکتریوم‌های آتیبیک از قدمت کمتری برخوردار بوده و تعداد لوکوس‌های شناسایی شده که دارای پلی‌مورفیسم مناسب برای مطالعات اپیدمیولوژیکی این گروه باشد، بسیار اندک است و بیشتر بررسی‌های انجام شده در این زمینه محدود به M. ulceranse می‌باشد. Ablordey و همکارانش در سال ۲۰۰۵ از روش VNTR برای ژنوتایپ مایکوباکتریوم‌اولسرانس 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 مایکوباکتریوم‌اولسرانس 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 مایکوباکتریوم‌اولسرانس Agy99 گزارش شد (۶). با وجود کارآمد بودن این تحقیقات برای تعیین ژنوتایپ مایکوباکتریوم‌اولسرانس، عدم حضور این گونه باکتری در نمونه‌های آتیبیک در این پژوهش، استفاده از لوکوس‌های پلی‌مورفیک شناسایی شده را در مطالعه حاضر محدود ساخت، ضمن اینکه لوکوس‌های شناسایی شده در M. ulceranse اختصاصی می‌باشد. پلی‌مورفیک

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 آتپیک 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.

بودن لوکوس‌های ETR و MPTR در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس و محدود بودن مطالعات انجام‌شده بر روی مایکوباکتریوم‌های آتپیک 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 ۴۸ VNTR گونه مختلف مایکوباکتریوم‌های آتپیک 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

### References:

- Hartmans S, Bont AM. The Genus Mycobacterium Nonmedical. In the Prokaryotes. Dwrkin M, editor. New York: Springer; 2006. p. 889-918 (Vol 3).
- Katoch VM. Infection Due to Non-Tuberculous Mycobacteria. Indian J Med Res 2004;120:290-304.
- Al-Mahruqi SH, Van Ingen J, Busaidys-AI, Boeree MJ, Al-Zadjalis, Patel A, et al. Clinical Relevance of Non Tuberculous Mycobacteria. Oman Emery Infect Dis 2009;15:292-294.
- Mostrom P, Gordon M, Sola C, Ridell M. Methods Used In The Molecular Epidemiology of Tuberculosis. J Clin Microbiol 2002;8(11):694-704.
- Doroudchi M, Kremer K, Basiri EA. IS6110- RFLP and Spoligotyping of Mycobacterium Tuberculosis Isolates in Iran. J Infect Dis 2000;32:663-668.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Demort M, Chaulet P. Treatment of Tuberculosis: Guidelines For National Programmes. Geneva: WHO; 1997. p. 218-251.
- 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]
- Sriyabhaya N, Wonswatana S. Pulmonary Infection Caused by Atypical Mycobacteria: A Report of 24 Cases in Thailand. Rev Infect Dis 1981;3:1085-1089.
- 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 Spoligotyping. *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 Kurdistan University* 2008;31:53-61. [Full Text in Persian]
18. Ablordey A, Swings J, Hubans C, Chemlal K, Loch C, Portaels F, Supply Ph. Multilocus Variable-Number Tandem Repeat Typing of Mycobacterium Ulcerans. *J Clin Microbiol* 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.

Archive of SID