مجله‌ی علمی، پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی زنجان
دوره‌ی ۱۷, شماره‌ی ٦٧, تابستان ۱۳۸۸, صفحات ۳۳ تا ٤٤

تشخیص سریع مایکوباکتریوم‌های آتیپیک در بیماران با علایم سل ریوی: ارزیابی لوکوس QUB 3232 (590bp) با روش VNTR

فضه حیدری[۱]، دکترپریسا فرنیا[۲]، دکترجمیله نوروزی[۳]، دکتر احمد مجد[٤]، الهه تاج الدین[٥]، دکترمحمدرضا مسجدی[٦]، دکتر علی اکبر ولایتی[۷]

نویسنده‌ی مسئول: تهران، بیمارستان مسیح دانشوری، مرکزتحقیقات مایکوباکتریولوژی fzheidari@yahoo.com

دریافت: ۸۷/۹/۱۳ پذیرش: ۸۸/٤/۲۲

چکیده

زمینه و هدف: *با توجه به انتشار جهانی مایکوباکتریوم‌های آتیپیک، شناسایی و تشخیص این نوع از مایکوباکتریوم‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. اخیراً مطالعات مولکولی انجام شده با استفاده از روش‌های انگشت‌نگاری ژنتیکی که پر هزینه و وقت‌گیر است، لوکوس‌های اختصاصی مربوط به مایکوباکتریوم‌ها را شناسایی کرده است. در این مطالعه علاوه بر روش hsp65 PCR-RFLP ، لوکوس QUB3232(590bp) با استفاده از روش توالی‌های تکراری پشت سرهم (VNTR) برای تمایز مایکوباکتریوم‌های آتیپیک از مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس مورد بررسی قرار گرفت.*

روش بررسی: *این بررسی بر روی ۳۷۱ نمونه‌ی ریوی و خارج ریوی جدا شده از بیماران با علائم سل ریوی انجام شد. بعد از جدا سازی و کشت این نمونه‌ها با استفاده از محیط LJ، تست‌های افتراقی شامل احیای نیترات، آزمایش فعالیت کاتالاز، آزمایش نیاسین، سرعت رشد و تولید پیگمان انجام شد. سپس حساسیت دارویی با روش نسبتی صورت گرفت. DNA به روش فنل- کلروفرم استخراج و قطعه‌ی hsp65 توسط PCR تکثیریافت. قطعات تکثیر یافته توسط آنزیم‌های HpaII, AvaII و HphI هضم و الگوی بدست آمده، روی اگارز ۳ درصد الکتروفورز شد. همچنین لوکوس QuB3232(590bp) با استفاده از روش VNTR در نمونه‌های مایکوباکتریوم‌های آتیپیک و توبرکلوزیس کمپلکس مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت.*

یافته‌ها: *از مجموع ۳۷۱ نمونه، ۳۲ نمونه (۸/٦ درصد) مقاوم به دارو (MDR)، ۱۸٤ نمونه (٤۹/٥ درصد) حساس و ۱٥٥ نمونه (٤۱ درصد) غیر MDR گزارش شدند که ۱٥ درصد از نمونه‌های MDR و ۲۲ درصد از نمونه‌های غیر MDR مربوط به مایکوباکتریوم‌های آتیپیک بودند. از مجموع ٤۳ نمونه‌ی آتیپیک، ۱۲ نمونه، سریع‌الرشد (۲۷/۹ درصد) و بقیه، کند رشد (۷۲/۱درصد) بودند. از میان کند رشدها، ٥۸ درصد مایکوباکتریوم سیمیه و ۱۹ درصد مایکوباکتریوم کانزاسی جدا گردید. لوکوس QuB3232 با حساسیتی برابر ۸۰ درصد توانست مایکوباکتریوم‌های آتیپیک و توبرکلوزیس کمپلکس را از یکدیگر تمایز دهد.*

نتیجه‌گیری: *لوکوس QuB3232 دارای قدرت افتراق بالایی بین مایکوباکتریوم‌های آتیپیک و تیپیک می‌باشد. بنابراین می‌توان به‌جای PCR-RFLP، لوکوس QuB3232 را با استفاده از روش VNTR برای تمایز این دو دسته مورد استفاده قرار داد.*

واژگان کلیدی: مایکوباکتریوم‌های آتیپیک، VNTR، لوکوس QuB3232

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی تهران
۲- دکترای تخصصی میکروب‌شناسی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، مرکزتحقیقات مایکوباکتریولوژی
۳- دکترای تخصصی میکروب‌شناسی، استاد دانشگاه آزاد اسلامی
٤- دکترای تخصصی زیست‌شناسی، استاد دانشگاه آزاد اسلامی تهران
٥- دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی جهرم
٦- فوق تخصص ریه، استاد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۷- فوق تخصص عفونی اطفال، استاد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، مرکزتحقیقات سل وبیماری‌های ریوی

مقدمه

به جز مایکوباکتریوم توبرکلوزیس‌کمپلکس و مایکوباکتریوم لپرا که در گروه پاتوژن‌های اصلی انسانی و حیوانی به حساب می‌آیند، گونه‌های دیگر مایکوباکتریوم [Mycobacterium Other Than Tuberculosis (MOTT)] یا [Non Tuberculosis Mycobacterium (NTM)]، به عنوان پاتوژن‌های فرصت طلب شناخته می‌شوند (۱). اما اخیرا مدارکی وجود دارد که این دسته از مایکوباکتریوم‌ها قادرند انواع مختلفی از بیماری‌های انسانی را در ریه، پوست، کلیه و سایر نقاط بدن ایجاد کنند (۲). اگر چه تاکنون انتقال فرد به فرد بیماری گزارش نشده است، اما مقاوم بودن این دسته به اکثر داروهای ضد سلی (مانند ایزونیازید، ریفامپین، استرپتومایسین، اتامبوتول و پیرازینامید)، توجه بسیاری از محققین را به خود جلب کرده است (۳). بررسی‌های پژوهشگران در چند دهه‌ی اخیر نشان می‌دهد که این باسیل‌های اسید فاست در طبیعت به مقدار فراوان یافت می‌شوند (۱)، بنابراین با توجه به الگوی مقاومت دارویی و انتشار جهانی مایکوباکتریوم‌های آتیپیک، شناسایی و تشخیص این باسیل‌ها یکی از مباحث اساسی مایکوباکتریولوژی در سال‌های اخیر به شمار می‌آید. یکی از روش‌های پر کاربرد مولکولی برای تشخیص گونه‌های مختلف مایکوباکتریوم، روش PCR-RFLP می‌باشد. در این روش قطعه‌ی خاصی از DNA پس از تکثیر، توسط آنزیم‌های برش دهنده‌ی ویژه‌ای، برش خورده و قطعات DNA حاصل روی ژل آگارز به طریق چشمی آنالیز می‌گردد (٤). ژن‌های خاصی از DNA برای تکثیر در این روش پیشنهاد شده است که از این میان، ژن کد کننده‌ی پروتئین شوک حرارتی که نوعی پروتئین 65KDa (hsp65) می‌باشد، حساس‌تر و دقیق‌تر از بقیه گزارش شده است (۶-۴). اخیراً مطالعات مولکولی انجام شده با استفاده از روش‌های انگشت نگاری ژنتیکی، لوکوس‌های اختصاصی مربوط به مایکوباکتریوم‌ها را شناسایی کرده که از این روش‌ها می‌توان به اسپولیگوتایپینگ و IS6110–RFLP اشاره کرد (۸ و۷). اگر چه این روش‌ها قادر به تمایزمایکوباکتریوم‌های آتیپیک از توبرکلوزیس‌کمپلکس می‌باشند، اما معمولا وقت‌گیر و پرهزینه بوده، در مایکوباکتریوم‌های آتیپیک از حساسیت کمی برخوردار می‌باشند. به همین علت امروزه از روش توالی‌های تکراری پشت سرهم [Variable Number Tandem Repe at(VNTR)] که نوعی روش انگشت نگاری ژنتیکی بر پایه‌ی PCR می‌باشد، استفاده می‌شود (۹). این روش ابزار قدرتمندی برای بررسی الگوی ژنتیکی (ژنوتیپ) مایکوباکتریوم‌های آتیپیک به حساب می‌آید، زیرا آنالیز آن، بر اساس لوکوس‌های اختصاصی و اندک صورت می‌گیرد که در مقایسه با روش‌های استاندارد مولکولی دیگر (IS6110–RFLP) از حساسیت بالاتری برخوردار است (۱۰). آنالیز توالی‌های ژنومی در گونه‌های مختلف مایکوباکتریوم با استفاده از روش VNTR، لوکوس‌های متعددی را شناسایی کرده که دارای پلی‌مرفیسم طولی به علت وجود الحاق (insertion) و یا حذف (Deletion) توالی‌های تکرار شونده‌ی پشت سرهم می‌باشند، که از این میان می‌توان به لوکوس‌های ETR (Exact Tandem Repeat)، MIRU (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units) و MPTR (Major Polymorphic Tandem Repeat)، QUB اشاره کرد (۱۲و۹،۱۱). مطالعات انجام شده در سال‌های اخیر نشان داده است که لوکوس QUB، از حساسیت و دقت بالایی برای افتراق و تمایز گونه‌های مختلف مایکوباکتریوم برخوردار است (۱۴و ۱۳). در این مطالعه، علاوه بر روش hsp65 PCR-RFLP، لوکوس QUB3232 با استفاده از روش VNTR برای تمایز مایکوباکتریوم‌های آتیپیک از مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی

این بررسی، بر روی ۳۷۱ نمونه‌ی مایکوباکتریوم جدا شده از بیماران مراجعه کننده به مرکز آموزشی پژوهشی سل و بیماری‌های ریوی بیمارستان مسیح دانشوری از اردیبهشت ۸۶ تا مرداد ۸۷ صورت گرفت. پس از جداسازی و کشت این نمونه‌ها با استفاده از محیط جنسون [Lowenstein Jensen (LJ)]، تست‌های افتراقی شامل احیای نیترات، آزمایش فعالیت کاتالاز، آزمایش نیاسین، سرعت رشد و تولید پیگمان انجام شد (۱۵)، سپس حساسیت دارویی در برابر ایزونیازید، ریفامپین، استرپتومایسین، اتامبوتول و پیرازینامید به روش نسبتی (Proportional Method) انجام و سویه‌ها به سه گروه حساس، مقاوم به دارو [Multidrug-Resistance (MDR)] و غیر MDR تقسیم بندی شدند. استخراج DNA نیز به روش فنل- کلروفرم انجام شد. در روش PCR-RFLP Hsp65 برای تکثیر قطعه‌ی ۶۴۴ جفت بازی ژن کدکننده‌ی hsp65 (Heat Shock Protein) از دو پرایمر HSPR4 (5'-AAG GTG CCG CGG ATC TTG TT-3')، و HSPF3 (5'-ATC GCC AAG GAG ATC GAG CT-3') استفاده شد. دور PCR مورد استفاده به صورت ۳۰ دور شامل ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و ۶۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ٤٥ ثانیه و ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه و در پایان به مدت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد بود. پس از تکثیر موفقیت آمیز این قطعه (مشاهده‌ی قطعه‌ی ۶۴۴ جفت بازی)، محصولات PCR توسط سه آنزیم *Hpa*II ,*Ava*II و*Hph*I به طور جداگانه برش خوردند (۵)، سپس الگوی به دست آمده روی آگارز ۳ درصد الکتروفورز شد. در روش VNTR-PCR، برای انجام PCR از لوکوس QUB3232 با ترتیب توالی پرایمر CAGACCCGGCGTCATCAAC و CCAAGGGCGGCATTGTGTT استفاده شد. دور مورد استفاده در PCR برای لوکوس QUB3232 شامل مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و سپس ۳۳ دور شامل ۹٤ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و در پایان به مدت ۸ دقیقه در ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد بود. محصولات PCR بدست آمده روی ژل ۲ درصد الکتروفورز گردید. تعداد دقیق توالی تکرارشونده‌ی پشت سرهم برای هرسویه به وسیله‌ی اندازه‌ی محصول PCR برروی ژل تعیین و با استفاده از دستورالعمل استاندارد آنالیز گردید.

تعیین نمای VNTR: در این بررسی، علاوه بر نمونه‌های جدا شده از بیماران، سوش استاندارد H37RV و سوش استاندارد هر کدام از گونه‌های آتیپیک مورد مطالعه (ATCC) نیز مورد بررسی قرار گرفت. اندازه‌ی محصول PCR در لوکوس QUB3232 در سویه‌ی استاندارد 590bp H37RV در نظر گرفته شد که دارای ۳ کپی 56bp پشت سرهم (توالی آخر 50bp بیش‌تر داشت) بود. در سویه‌های مورد مطالعه، اگر اندازه‌ی محصول PCR بیش‌تر یا کم‌تراز bp 56 بود (۵۶±۵۹۰)، تعداد کپی‌ها به صورت ۱± ۳ گزارش شد.

تعیین حساسیت لوکوس QUB3232: برای تعیین حساسیت لوکوس QUB3232 در گونه‌های مورد مطالعه تعداد موارد مثبت حقیقی به مجموع تعداد مثبت حقیقی و منفی کاذب تقسیم شد.

یافته‌ها

گروه مورد مطالعه از نظر سن، جنس، ملیت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی بررسی شدند. از ۳۷۱ نمونه مورد بررسی، ۲۵۷ نفر (۶۹/۳ درصد) ملیت ایرانی که ۱۱۱ نفر(۴۳ درصد) زن و ۱۴۶ نفر(۵۶ درصد) مرد و ۱۱۴ نفر (۳۰/۷ درصد) ملیت افغانی که ۶۸ نفر (۵۹/۶ درصد) زن و ۴۶ نفر

(۴۰/۴ درصد) مرد بودند. رنج سنی برای بیماران ایرانی بین ۱۴ تا ۸۵ سال و بیماران افغانی ۱۵تا ۷۵ سال بود (جدول ۱).

جدول ۱: مشخصات دموگرافی بیماران مورد مطالعه

		ملیت					
		ایرانی		افغانی		تعداد کل	
		تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
جنسیت	زن	۱۱۱	٤۳	٦۸	۵۹/٦	۱۷۹	٤۸/۲
	مرد	۱٤٦	۵٦	٤٦	٤۰/٤	۱۹۲	۵۱/۷
سن	بالای ٤۰ سال	۱۵۳	۵۹/۵	٦۳	۵۵/۲	۲۱٦	۵۸/۲
	زیر ۳۵ سال	۱۰٤	٤۰/٤	۵۱	٤٤/۷	۱۵۵	٤۱/۷

از ۳۷۱ نمونه‌ی مورد مطالعه، ۳۸ نمونه‌ی خارج ریوی، مربوط به ادرار و خون بود و ۳۳۳ نمونه‌ی ریوی مربوط به خلط و بافت ریه بود. از مجموع ۳۷۱ نمونه‌ی مورد مطالعه، ۳۲ نمونه (۸/٦ درصد) MDR، ۱۸٤ نمونه (٤۹/۵ درصد) حساس و ۱۵۵ نمونه (٤۱ درصد) غیر MDR گزارش شدند. ۱۵ درصد از نمونه‌های MDR و ۲۲ درصد از نمونه‌های غیر MDR مربوط به مایکوباکتریوم‌های آتیپیک بودند (جدول ۲).

جدول ۲: الگوی آنتی‌بیوگرام نمونه‌های جدا شده از بیماران با علایم سل ریوی در این بررسی

نمونه‌های مورد مطالعه	حساس		مقاوم به چند دارو		غیرMDR	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
مایکو باکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس	۱۸۰	۹۷/۸	۲۷	۸٤/۳	۱۲۱	۷۸
مایکوباکتریوم‌های آتیپیک	٤	۲/۱	۵	۱۵	۳٤	۲۱/۹
تعداد کل	۱۸٤	٤۹/۵	۳۲	۸/٦	۱۵۵	٤۱

نتایج به دست آمده از تست‌های افتراقی با نتایج روش hsp65PCR-RFLP مطابقت داشته و ۴۳ نمونه به عنوان مایکوباکتریوم‌های آتیپیک شناسایی شدند، که از این میان ۱۲ نمونه سریع الرشد، ۲۲ نمونه فوتوکروموژن (Photochromogen)، ۵ نمونه اسکاتو کروموژن (Scotochromogen) و ٤ نمونه غیر کروموژن (Nonchromogen) گزارش شد.

تشخیص گونه‌های مختلف مایکوباکتریوم با استفاده از روش hsp65 PCR-RFLP: با استفاده از روش hsp65 PCR-RFLP، ۴۳ نمونه (۱۱/۵ درصد) به عنوان مایکوباکتریوم‌های غیرسلی و بقیه به عنوان مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس شناسایی شدند. از مجموع ۴۳ نمونه مایکوباکتریوم غیر سلی [Nonmycobaterium Tuberclosis (NTM)]، ۱۲ نمونه (۲۷/۹ درصد) سریع الرشد که شامل ۳ نمونه مایکوباکتریوم

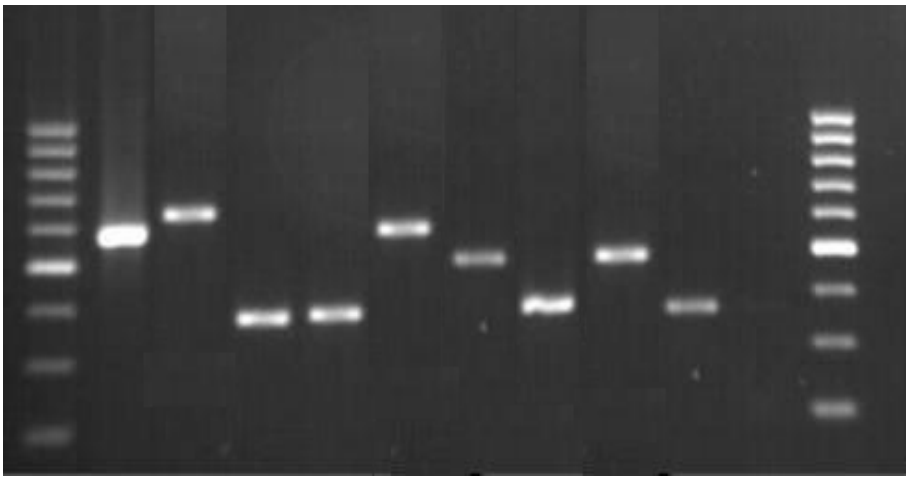
کلونی زیرگونه کلونی *(M. chelonae subsp. Chelonae)*، ۳ نمونه مایکوباکتریوم فورچوئیتوم *(M. furtuitum)*، ۶ نمونه مایکوباکتریوم کلونی زیرگونه آبسسوس *(M. chelonae subsp. abcsessus)* و سایر نمونه‌ها (۷۲ درصد) کند رشد بودند.

از میان کند رشدها ۵۸ درصد مایکوباکتریوم سیمیه *(Mycobacterium simiae)* و ۱۹ درصد مایکوباکتریوم کانزاسی *(Mycobacterium kansasii)* جدا گردید (جدول ۳).

جدول ۳: تشخیص گونه‌های مختلف مایکوباکتریوم بر اساس نتایج به دست آمده از روش PCR-RFLP

	مایکو باکتریوم های آتیپیک		مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس
	گونه	تعداد گونه	تعداد گونه
سریع الرشد	مایکو باکتریوم کلونی زیر گونه‌ی کلونی	۳	۳۲۸
	مایکو باکتریوم فورچوئیتوم	۳	
	مایکو باکتریوم کلونی زیر گونه‌ی آبسسوس	٦	
کند رشد	مایکو باکتریوم سیمیه	۱۷	
	مایکو باکتریوم کانزاسی	٦	
	مایکو باکتریوم گوردونی	۱	
	مایکو باکتریوم اسکروفولاسئوم	۳	
	مایکو باکتریوم مالموئنس	۲	
	مایکو باکتریوم اینتراسلولار	۲	
تعداد کل		٤۳	۳۲۸

تمایز مایکوباکتریوم‌های آتیپیک از مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس با استفاده از روش VNTR: اندازه‌ی محصول PCR، 590bp و تعداد کپی‌های واحد تکرار شونده در لوکوس QUB3232 برای سویه‌ی استاندارد H37RV، ۳ کپی گزارش شد. این لوکوس در ۲۷۸ نمونه (۸۵ درصد) از گونه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس مورد مطالعه، دارای پلی مرفیسم بود و تعداد کپی‌های آن‌ها بین ۲ تا ۵ کپی (دارای چهار نمایی ۲، ۳، ۴و ۵ بود) گزارش شد (شکل ۱). بر خلاف سویه‌ی استاندارد H37RV، در سوش‌های استاندارد مایکوباکتریوم‌های آتیپیک، محصول PCR به دست نیامد. از طرفی در نمونه‌های آتیپیک جدا شده از بیماران نیز محصول PCR مشاهده نشد (شکل ۲).



شکل ۱: لوکوس QUB3232 در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس (خط ۱: سویه‌ی استاندارد H37RV، خط ۱۰-۲: گونه‌های توبرکلوزیس کمپلکس جدا شده از بیماران با علایم سل ریوی)

شکل ۲: عدم حضور لوکوس QUB3232 در مایکوباکتریوم‌های آتیپیک (خط ۱: سویه‌ی استاندارد H37RV، خط ۲: سویه‌ی استاندارد مایکوباکتریوم سیمیه (M. simiae)(ATCC)، خط ۳: سویه‌ی استاندارد مایکوباکتریوم کانزالی(M. Kansasii)(ATCC)، خط ۴تا۹ گونه‌های آتیپیک جدا شده از بیماران با علایم سل ریوی (ATCC: American Type Culture Collection)

این نتایج نشان دهنده‌ی عدم وجود لوکوس QUB3232 در مایکوباکتریوم‌های آتیپیک بود. بنابراین لوکوس QUB3232 دارای قدرت تمایز بالایی بین مایکوباکتریوم‌های آتیپیک و مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس می‌باشد، به عبارت دیگر، این لوکوس می‌تواند مایکوباکتریوم‌های آتیپیک و مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس را با حساسیتی برابر ۸۰ درصد، تمایز دهد.

بحث

لوکوس QUB3232 به عنوان لوکوس افتراق دهنده بین مایکوباکتریوم‌های آتیپیک و مایکوباکتریوم توبرکلوزیس

کمپلکس شناسایی شد. با وجود این که گونه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس به عنوان عامل اصلی بیماری‌های ریوی در انسان شناخته شده‌اند، اما امروزه بسیاری از محققین، قدرت بیماری‌زایی مایکوباکتریوم‌های آتیپیک را کمتر از این دسته نمی‌دانند. مطالعات انجام شده در دهه‌ی اخیر نشان می‌دهد که بیش از یک سوم مایکوباکتریوم‌های آتیپیک قادر به ایجاد بیماری‌های مختلف اعم از ریوی و غیرریوی در انسان می‌باشند (۱). این دسته به عنوان عوامل ایجادکننده‌ی بیماری که اکثراً مقاوم به داروهای ضدسلی می‌باشند (۳) و به فراوانی در طبیعت یافت می‌شوند (۱،۱۶)، دلیل نگرانی‌های بزرگی هستند که توجه بسیاری از باکتری‌شناسان را به خود جلب کرده است. با توجه به انتشار جهانی و الگوی مقاومت دارویی مایکوباکتریوم‌های آتیپیک، تشخیص سریع این دسته می‌تواند گام بزرگی در حل مسائل مطرح شده به حساب آید. روش‌های مولکولی متعددی برای تشخیص دقیق گونه‌های مختلف مایکوباکتریوم پیشنهاد شده است، که از این میان روش PCR-RFLP از مزیت‌هایی همچون سریع و آسان بودن برخوردار است (۱۸و ۱۷). هونگ کیم و همکارانش روش PCR-RFLP جدیدی بر اساس تکثیر قطعه‌ی ۶۴۴ جفت بازی ژن hsp65 ارایه دادند. در این مطالعه، کلیدی ۲۵۱ نمونه با استفاده از این روش با موفقیت شناسایی شد (۵). چیمارا و همکارانش، مراحل تشخیصی برای hsp65 PCR-RFLP مطرح کردند و توانستند ۳۳۳ گونه مورد مطالعه را با استفاده از این روش در سطح گونه‌ای و زیر گونه‌ای مورد شناسایی قرار دهند (۴). از آنجا که این ژن به صورت حفاظت شده در گونه‌های مختلف مایکوباکتریوم وجود دارد و از تنوع کافی برای تمایز این گونه‌ها برخوردار می‌باشد، گزینه‌ی مناسبی برای تکثیر در روش PCR-RFLP در مقایسه با گزینه‌های قبلی محسوب می‌شود (۱۹و۱۷،۲). در مطالعه‌ی حاضر، ۳۷۱ نمونه‌ی مورد بررسی به طور دقیق با استفاده از این روش شناسایی شد، اگرچه حساسیت آنزیم‌های مورد استفاده، متفاوت بود اما به طورکلی نتایج به دست آمده با به کارگیری هر سه آنزیم، قابل قبول بوده، با دستاورد مطالعات فوق هم‌خوانی داشته است. یکی از روش‌های انگشت‌نگاری ژنتیکی که بر اساس PCR می‌باشد، VNTR نام دارد که بیشتر برای بررسی تنوع ژنتیکی سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بکار می‌رود. این روش سریع و آسان بوده، آنالیز آن بصورت چشمی صورت می‌گیرد و بسیار پایدار است (۹). آنالیز توالی‌های ژنومی در گونه‌های مایکوباکتریوم با استفاده از روش VNTR، لوکوس‌های متعددی را شناسایی کرده که از مهم‌ترین‌آن‌ها می‌توان به لوکوس‌هایTR, MIRU, QUB اشاره کرد (۲۰و ۱۲، ۱۱). در مطالعه‌ای که توسط کونل و فوتینگام صورت گرفت، روش VNTR به عنوان روشی جدید برای بررسی تنوع ژنتیکی (ژنوتیپ) مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس معرفی شد. در این مطالعه، ۱۱ لوکوس VNTR در ژنوم H37RV شناسایی شد که شامل ۵ لوکوس MPTR (MPTR-A, MPTR -B, MPTR-D, MPTR-C, MPTR-E, MPTR-F) و ٦ لوکوسETR (ETR-A, ETR-B, ETR-C, ETR-D, ETR-E) بود. یکی از ۵ لوکوس MPTR و ٦ لوکوس ETR دارای پلی‌مرفیسم طولی به علت وجود الحاق و یا حذف توالی‌های تکرار شونده‌ی پشت سرهم بودند که از این لوکوس‌ها برای ژنوتیپ و مطالعات اپیدمیولوژیکی ۲۵ گونه‌ی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس و ۲۳ زیر گونه‌ی مایکوباکتریوم بوویس زیر گونه‌ی BCG استفاده شد که در پایان ۲۲ نمای عددی برای گونه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس و ۵ نمای عددی برای زیر گونه‌های مایکوباکتریوم بویس ب.ث.ژ شناسایی شد (۹). مطالعه‌ای در مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی در ایران از روش VNTR بر پایه‌ی لوکوس‌های ETR و MPTR برای متمایز کردن الگوی ژنتیکی سویه‌های مایکوباکتریوم

توبرکلوزیس ایرانی و افغانی استفاده کرد که در پایان لوکوس ETR-A به عنوان لوکوس بسیار افتراق دهنده در سویه‌های مورد نظر شناسایی شد (۲۱). با وجود این که در مطالعات نام برده از لوکوس‌های ETR و MPTR برای بررسی نوع گونه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس به طور موفقیت‌آمیزی استفاده شده است، اما آنالیز توالی‌های ژنومی در مایکوباکتریوم‌های آتیپیک نشان داده است که لوکوس‌های فوق در ژنوم این دسته دارای پلی‌مرفیسم نبوده و برای مطالعات اپیدمیولوژیکی مایکوباکتریوم‌های آتیپیک قابل استفاده نیستند (۱۱). بنابراین در بررسی حاضر، علاوه بر گونه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس، ۴۳ گونه‌ی مایکوباکتریوم آتیپیک نیز وجود داشت و استفاده از لوکوس‌های ETR و MPTR در روش VNTR امکان پذیر نبود. در مطالعه‌ی دیگری مازار از لوکوس‌های MIRU در روش VNTR استفاده کرد. ۱۲ لوکوس MIRU (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units)، برای ژنوتیپ مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس شناسایی شد که حساسیت آن بیش‌تر از روش IS6110-RFLP گزارش شد (۲۲). در بررسی فوق از روش MIRU-VNTR برای مطالعات اپیدمیولوژیکی گونه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس استفاده شده است، اما در این بررسی‌ها مایکوباکتریوم‌های آتیپیک حضور نداشته و نتایج به دست آمده قابل مقایسه با بررسی ما که با حضور مایکوباکتریوم‌های آتیپیک انجام شده، نیست. در مطالعه‌ی دیگری که توسط علی صورت گرفت، روش MIRU-VNTR برای شناسایی ژنوتیپ شایع CASI در بین سویه‌های مایکوباکتریوم آویوم کمپلکس استفاده شد. در این مطالعه، ۱۲ لوکوس مورد بررسی قرار گرفت که همه‌ی آن‌ها به عنوان لوکوس‌های بسیار متنوع برای تمایز سویه‌های مایکوباکتریوم آویوم کمپلکس معرفی شدند (۲۳). پرتال و همکارانش از روش MIRU-VNTR برای تعیین الگوی ژنتیکی ۳۹ گونه‌ی مایکوباکتریوم اولسرانس و ۲۷ گونه مایکوباکتریوم مارینوم استفاده کردند و با بررسی ۱۵ لوکوس MIRU، در نهایت ۷ لوکوس مورد شناسایی قرار گرفت که برای این دو گونه دارای پلی‌مرفیسم بوده، قادر به تعیین الگوی ژنتیکی ۷ زیر گونه‌ی مایکوباکتریوم اولسرانس و ۵ زیر گونه‌ی مایکوباکتریوم مارینوم شد (۱۱). همان طور که در جدول شماره ۳ مشخص شده است، مایکوباکتریوم‌های اولسرانس، مارینوم و آویوم کمپلکس از گونه‌های آتیپیک مورد مطالعه ما نبوده، نتایج به دست آمده از کاربرد لوکوس‌های MIRU به علت اختصاصی بودن آن‌ها در گونه‌های نام برده، قابل تعمیم به بررسی انجام شده در این مطالعه نمی‌باشد.

مطالعات دیگری با استفاده از روش VNTR بر روی مایکوباکتریوم‌های اولسرانس صورت گرفته است. آبلوردی و همکارانش از روش VNTR برای تعیین الگوی ژنتیکی مایکوباکتریوم اولسرانس استفاده کردند. در این مطالعه، از ۱۹ لوکوس مورد بررسی، ۹ لوکوس دارای پلی‌مرفیسم در این گونه شناسایی شد در مطالعات اپیدمیولوژیکی مایکوباکتریوم‌های اولسرانس از اهمیت به سزایی برخورد می‌باشد (۲۴). در مطالعه‌ی دیگری که توسط هیلتی صورت گرفت لوکوس جدیدی در ژنوم مایکوباکتریوم اولسرانس برای استفاده در روش VNTR شناسایی شد. در این مطالعه، ۳۴ لوکوس از نظر پلی‌مرفیسم مورد ارزیابی قرارگرفت که در بسیاری از نمونه‌های مورد مطالعه، لوکوس‌هایی با ۱ یا ۲ تکرار (کپی) مشاهده شدند و فقط یک لوکوس دارای پلی‌مرفیسم قابل قبولی در مایکوباکتریوم اولسرانس Agy99 گزارش شد (۱۰). با وجود کارآمد بودن این مطالعات برای ژنوتیپ مایکوباکتریوم اولسرانس، عدم حضور این گونه در نمونه‌های آتیپیک مورد مطالعه ما، استفاده از لوکوس‌های پلی‌مرفیک شناسایی شده را در مطالعه‌ی حاضر محدود ساخت، ضمن این که لوکوس‌های شناسایی شده در این باکتری اختصاصی می‌باشد. در مطالعات بسیاری، لوکوس

QUB3232 به عنوان لوکوس بسیار پلی‌مرفیک و افتراق دهنده در گونه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس معرفی شده است. کام، از لوکوس‌های QUB و ETR برای تمایز سویه‌های بیچینگ (شایع‌ترین سویه‌ی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس) و غیربیچینگ استفاده کرد، که در پایان لوکوس‌های ETR-A و QUB3232 به عنوان افتراق دهنده‌ترین لوکوس‌ها برای ردیابی سویه‌های بیچینگ گزارش شدند (۱۲). در مطالعه‌ی دیگری وادا، ۲۴۳ گونه‌ی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس را با استفاده از روش VNTR مورد بررسی قرار داد. در این مطالعه نتایج به دست آمده از آنالیز ۱۶ لوکوس VNTR با نتایج روش PIS6110–RFL همخوانی داشته و گونه‌ها در ۵۷ دسته طبقه بندی شدند. نتایج این بررسی نشان داد که استفاده از لوکوس‌های QUB (QUB18, QUB3232, QUB11b) تنوع آللی گونه‌های مورد مطالعه را تا ۰/۹ (HGI>۰/۹) افزایش داده، طبقه‌بندی دقیق‌تری برای این گونه‌ها فراهم کرده است (۱۴). اگر چه لوکوس QUB3232 در گونه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس دارای قدرت افتراق بالایی است، اما هنوز مطالعه‌ای مبنی بر پلی‌مرفیسم بودن این لوکوس در مایکوباکتریوم‌های آتیپیک صورت نگرفته است. در مطالعه‌ی حاضر، لوکوس QUB3232 برای تیپینگ مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس و مایکوباکتریوم‌های آتیپیک مورد بررسی قرار گرفت و نتایج به دست آمده نشان داد که ۸۵ درصد ازگونه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس مورد مطالعه، در این لوکوس دارای پلی‌مرفیسم بوده که با نتایج مطالعات قبلی همخوانی داشته است در حالی که وجود این لوکوس در گونه‌های آتیپیک مورد مطالعه، تأیید نشد.

نتیجه‌گیری

حضور لوکوس QUB3232 در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس و عدم حضور آن در مایکوباکتریوم‌های آتیپیک، این لوکوس را به عنوان ابزار قدرتمندی برای تمایز این دو دسته مطرح ساخت که قادر بود گونه‌های آتیپیک را با حساسیتی برابر ۸۰ درصد ازگونه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس تمایز دهد. بنابراین می‌توان بجای PCR-RFLP، لوکوس QUB3232 را با استفاده از روش VNTR برای تمایز، مایکوباکتریوم‌های آتیپیک از تیپیک مورد استفاده قرار داد.

منابع

1- Katoch VM: Infection due to non-tuberculous mycobacteria (NTM). *Indian J Med Res*. 2004; 20: 290-304.

2- Lee ES, Lee MY, Han SH, and Ka JO: Occurrence and molecular differentiation of environmental mycobacteria in surface waters. *J Microbiol Biotechnol*. 2008; 18: 1207-15.

3- AL-Mahruqi SH, Van-Ingen J, AL-Busaidy S, et al. Clinical relevance of non tuberculous mycobacteria, Oman. *Emery Infect Dis*. 2009; 15: 292-4.

4- Chimara E, Ferrazoli L, Ueky SY, et al. Reliable identification of mycobacterial species by PCR-restriction enzyme analysis (PRA)-hsp65 in a reference laboratory and elaboration of a sequence-based extended algorithm of PRA-hsp65 patterns. *BMC Microbiol*. 2008; 8: 48.

5- 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 differentiation of Mycobacterium spp. *J Microbiol Method*s. 2005; 62: 199-209.

6- WU X, Zhang J, Liang J, et al. Comparison of three methods for rapid identification of mycobacterial clinical isolates to the species level. *J Clin Microbiol*. 2007; 45: 1898-903.

7- Farnia P, Masjedi MR, Varahram 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.

8- Nasiri B, Farnia P, Nowroozi J, Karegar M. Study of genetical pattern of Mycobacterium tuberculosis by fingerprinting method. *J Artesh Universit*y. 2008; 6: 59-64.

9- Frothingham R, Meeker-O'Connell WA. Genetic diversity in the Mycobacterium tuberculosis complex based on variable numbers of tandem DNA Repeats. *Microbiology*. 1998; 144: 1189-96.

10- 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: 1483-7.

11- 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.

12- 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.

13- Savine E, Warren RM, Van der Spuy GD, et al. Stability of variable-number tandem repeats, of mycobacterial interspersed repetitive units from 12 loci in serial isolates of Mycobacterium tuberculosis. *J Clin microbiol*. 2002; 40: 4561-6.

14- Wada T, Maeda Sh, Hase A, Kobayashi K Evaluation of variable number of tandem repeat as molecular epidemiological markers of Mycobacterium tuberculosis in Japan. *J Med Microbiol*. 2007; 56: 1052-7.

15- Kent PT, Kubica GP. Public health mycobacteriology. Public Heath Services, U.S.Department of Heath and Human Services: Atlanta; 1985.

16- Hartmans S, Debont JAM, Stackebrandt E The qenus Mycobacterium-nonmedical . *prokaryotes*. 2006; 3: 889-918.

17- Alcaide F, Richter I, Bernascoin C, et al. Heterogeneity and clonality among isolates of Mycobacterium kansasii: implications for epidemiological and phathogenicity studies. *J Clin Microbiol*. 1997; 35: 1959-64.

18- Devallois A, Goh KS, Rastogi N. Rapid identification of mycobacteria to species level by PCR- restriction fragment length polymorphism analysis of the hsp65 gene and proposition of an algorithm to differentiate 34 mycobacterial species. *J Clin Microbiol*. 1997; 35: 2969-73.

19- 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.

20- Skuce RA, McCorry TP, McCarroll JF, et al. Discrimination of Mycobacterium tuberculosis complex bacteria using novel VNTR-PCR targets. *Microbiology*. 2002; 148, 519-28.

21- Tageddin E, Farnia P, Karegar M, et al. Evaluation of genetical pattern of mycobacterium tuberculosis separated of Iranian and Afghan TB patients: using the VNTR typing method. *J Kurdistan University*. 2008; 31: 53-61.

22- 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.

23- Ali A, Hasan Z, Tanveer M, et al. Characterization of Mycobacterium tuberculosis central asian strain 1 using mycobacterial interspersed repetitive unite genotyping. *BMC Microbiol*. 2007; 7: 76.

24- Ablordey A, Swings J, Hubans C, et al. Multilocus variable –number tandem repeat typing of Mycobacterium ulcerans. *J Clin microbial*. 2005; 43: 1546-51.

The Rapid Identification of Atypical Mycobacterium in Pulmonary Tuberculosis (PTB) Patients: Evaluation of QUB3232 Locus Using the VNTR Method

Heidari F[1], Farnia P[2], Noroozi J[3], Majd A[4], Tajedin E[5], Masjedi M[6], Velayati A[6]

[1]Azad University of Tehran, Tehran, Iran

[2]Mycobacteriology Research Center (MRC), National Research Institute of Tuberculosis and Lung Disease (NRITLD), Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

[3]Dept. of Microbiology, Azad University of Tehran, Iran

[4]Dept. of Biology, Azad University of Tehran, Iran

[5]Dept. of Microbiology, Azad University of Jahrom, Jahrom, Iran

[6]National Research Institute of Tuberculosis and Lung Disease (NRITLD), Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Corresponding Author: Heidari F, Mycobacteriology Research Center, Reference Laboratory of Tuberculosis, Masih Daneshvari Hospital, Tehran, Iran.

E-mail: fzheidari@yahoo.com

Received: 3 Dec 2008 **Accepted:** 13 Jul 2009

***Background and Objective*:** Identification of *atypical mycobacterium* (*Non tuberculosis Mycobacterium*; NTM) is important because of the worldwide propagation of these organisms. Recently, molecular studies have identified the specific loci for mycobacterium species by DNA - finger printing methods, but these methods are time-consuming and expensive. In this study, in addition to *hsp65* PCR-RFLP method, QUB3232 locus was evaluated for differentiation of atypical mycobacterium from mycobacterium tuberculosis complex.

Materials and Methods: This study was performed on 371 pulmonary and non pulmonary specimens separated from patients with the symptoms of pulmonary tuberculosis (PTB). After the isolation and culturing of mycobacterium strains using the Lowenstein Jensen media, biochemical tests including production of Niacin, Catalase activity, Nitrate reduction, pigment production and growth rate were performed. Drug susceptibility testing was performed by proportional method. DNA extraction was performed by phenol-chloroform method. *hsp65* gene was amplified by PCR. Subsequently the amplicons were digested with three restriction enzymes namely *Ava*II, *Hph*I and *Hpa*II and electrophoresed on 3% agarose gel. QUB3232 locus was also evaluated for differentiation of atypical mycobacterium and mycobacterium tuberculosis complex.

Results: Out of 371 isolates, 32 (8.6%) were multi-drug resistant TB (MDR-TB), 184 (49.5%) were susceptible and 155 (42.5%) were non MDR (combined resistance) that 15% of MDR cases and 25% of non MDR cases were non tuberculosis mycobacterium. Out of 31 slow growing isolates, 58% were *M. simiae* and 19% were *M. kansasii*. The sensitivity of QUB3232 locus for differentiation of the atypical mycobacterium from mycobacterium tuberculosis complex was 80%.

From the total of 43 NTM samples, 12 (27.9%) were rapid growing and 72% were slow growing.

Conclusion: QUB3232 locus has the high discriminative power for differentiation of atypical mycobacterium from the mycobacterium tuberculosis complex, therefore, it can be used as a substitute for PCR-RFLP method.

Key words: Atypical mycobacterium, VNTR, QUB3232 locus