مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان/ دوره سیزدهم/ پائیز ۱۳۸۷/ ۶۱-۵۳

بررسی الگوی ژنتیکی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس جدا شده از بیماران مبتلا به سل ایرانی و افغانی: با استفاده از روش تایپینگ VNTR

الهه تاج الدین[۱]، دکتر پریسا فرنیا[۲]، دکتر محمدکارگر[۳]، دکتر جمیله نوروزی[۴]، دکتر رشید رمضان زاده[۵]، مهندس مهدی کاظم پور[۶]، دکتر محمد رضا مسجدی[۷]، دکتر علی اکبر ولایتی[۸]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم

۲- دکترای میکروبیولوژی پزشکی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی وخدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی- تهران، مرکزتحقیقات مایکوباکتریولوژی (مؤلف مسؤول)

تلفن: ۰۲۱-۲۰۱۰۹۵۰۵ pfarnia@hotmail.com

۳- دکترای میکروبیولوژی، استادیار دانشگاه آزاداسلامی واحد جهرم

۴- دکترای میکروبیولوژی، استاد دانشگاه علوم پزشکی ایران

۵- دکترای باکتریولوژی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی وخدمات بهداشتی درمانی کردستان

۶- کارشناسی ارشد آمار، مربی دانشگاه علوم پزشکی وخدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی- تهران، مرکزتحقیقات مایکوباکتریولوژی

۷- فوق تخصص ریه، استاد دانشگاه علوم پزشکی وخدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی- تهران، مرکزتحقیقات سل و بیماریهای ریوی

۸- فوق تخصص عفونی اطفال، استاد دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی- تهران، مرکز تحقیقات سل و بیماریهای ریوی

چکیده

زمینه و هدف: هدف از این مقاله متمایزکردن الگوی ژنتیکی سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس ایرانی و افغانی مسلول با استفاده از هفت لوکوس ژنی با روش تایپینگ VNTR می‌باشد.

روش بررسی: ۱۹۱ سویه جدا شده از بیماران سل ریوی از نظر الگوی VNTR مورد بررسی قرار گرفتند. (بین سالهای ۸۷-۸۵) و با استفاده از پروتوکل استاندارد آنالیز شدند. در نهایت تنوع اللی هر یک از پرایمرها در دو سویه ایرانی و افغانی محاسبه گردید.

یافته‌ها: مقایسه تنوع اللی بین سویه‌های افغانی و ایرانی نشان می‌دهد که الگوی VNTR در سویه‌های افغانی نسبت به سویه‌های ایرانی کمتر می‌باشد. البته بجز لوکوس ETR-E که دارای تنوع بیشتری می‌باشد. بر اساس شاخص افتراق کل سویه‌ها، لوکوس ETR-A بعنوان لوکوس بسیار افتراق دهنده (HGI≥0.6) و لوکوس‌های ETR-F, ETR-E, MPTR-A ,ETR-C, ETR-B بعنوان لوکوس‌های افتراق دهنده متوسط (HGI≥0.4-0.6) و لوکوس ETR-D بعنوان ضعیف‌ترین لوکوس افتراق‌دهنده شناسایی شدند. مقاومت آنتی‌بیوتیکی و بیماران با سابقه در سویه‌های افغانی بیشتر از سویه‌های ایرانی بود (p=۰/۰۰۰).

نتیجه‌گیری: روش VNTR، سریع، آسان و بسیار پایدار است و برای مطالعات اپیدمیولوژی قابل استفاده است.

کلید واژه‌ها: الگوی ژنتیکی، مایکوباکتریوم، روش، VNTR، سل

وصول مقاله: ۸۷/۲/۳۰ اصلاح نهایی: ۸۷/۴/۳۱ پذیرش مقاله: ۸۷/۵/۱۲

مقدمه

با توجه به شیوع مجدد بیماری سل و اهمیت شناسایی سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در برنامه کنترل منطقه‌ای، تحقیقات اپیدمیولوژی مولکولی شکل تازه‌ای به خود گرفته است. متعاقباً روشهای بیولوژیکی مولکولی متعددی جهت شناسایی و بررسی رابطه میان سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس جدا شده ابداع گردید (۱,۲). این روشها به دو دسته عمده تقسیم می‌شوند: روشهایی که پروفایل انگشت نگاری تولید می‌کنند مانند RFLR - IS6110 و روشهایی که

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-03-29]

اساس آن PCR می‌باشند مانند اسپولیگوتایپینگ و VNTR (۳). روش RFLR-IS6110 در سال ۱۹۹۰ برای هدف اپیدمیولوژی مولکولی بیماری سل به کار برده شد. اساس RFLR مبتنی بر وجود ترانسپوزونهای IS6110 بوده که به طور اختصاصی در طول ژنوم کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به تعداد متنوع و در جایگاههای مختلف وجود دارد. تعداد و موقعیت این باندها در طول ژنوم گونه‌های مختلف مایکوباکتریوم توبرکلوزیس باعث الگوی انگشت نگاری ژنتیکی می‌شود و به عنوان وسیله‌ای مناسب برای تعیین گونه، مورد استفاده قرار می‌گیرد. این روش نمی‌تواند گونه‌هایی که دارای تعداد کم یا یکسانی از نسخه‌های IS6110 را دارا می‌باشند، شناسایی کند به همین علت امروزه از روش (variable number tandem repeat) VNTR استفاده می‌شود (۴). در روش VNTR، ۱۱ لوکوس در ژنوم مایکوباکتریوم توبرکلوزیس شناسایی شده است، که شامل ۵ لوکوس MPTR (MPTR-A , MPTR–B , MPTR-C , MPTR-D , MPTR –E, MPTR-F) و ۶ لوکوس ETR (ETR-A , ETR-E , ETR-B , ETR-C , ETR-D , ETR-F) می‌باشد. محققان در سالهای اخیر نشان دادند که از بین ۱۱ لوکوس مورد نظر، ۷ لوکوس (MPTR-A , ETR-A , ETR-B , ETR-C , ETR-D , ETR-E , ETR-F) دارای پلی مرفیسم طولی بعلت وجود insertion و یا Deletion توالی‌های تکرار شونده پشت سر هم می‌باشد (شکل ۱).

لوکوس‌های MPTR (Major Polymorphic Tandem Repeats) حاوی توالی تکرار شونده ۱۵جفت بازی به همراه یک توالی منفرد محافظت شده می‌باشند که بین توالی تکرار شونده مجاور هم، تنوع توالی مشاهده می‌شود. هر کدام از لوکوس‌های ETR (Exact Tandem Repeats) در ژنوم مایکوباکتریوم توبرکلوزیس حاوی توالی تکرار شونده ۷۹-۵۳ جفت باز با توالی DNA مشابه در توالی مجاورشان می‌باشند.

MPTR–A و ETR–A در طول مناطق کدکننده ژنی قرارگرفته‌اند و باقی مانده لوکوس‌ها، شامل ETR- , ETR-B , ETR-D , ETR-E C و ETR-F در نواحی بین ژنی قرار دارند. تنوع در تعداد توالی‌های A–MPTRو ETR–A منجر به ایجاد پروتئین‌هایی با سایزهای مختلف می‌شوند. در صورتیکه لوکوس‌های قرار گرفته در نواحی بین ژنی) , ETR-E , ETR-F (ETR-D بعنوان یک تنظیم کننده و لوکوس ETR-B بعنوان یک خاتمه دهنده عمل می‌کنند. این روش سریع، تکرار پذیر و نتایج به صورت پروفایل عددی ثبت می‌گردد که این امر امکان تمایز سویه‌ها را میسر می‌سازد (۵). اخیراً Fillol و همکارانش نشان دادند که روش VNTR را می‌توان برای تمایز سویه‌های مرتبط بهم مایکو باکتریوم توبرکلوزیس بکار برد. زیرا این روش تایپینگ، تعداد زیاد و متنوعی اثر انگشت نگاری DNA را تولید می‌کند (۶). در این مطالعه حساسیت و دقت روش فوق در شناسایی الگوی ژنتیکی مایکوباکتریومهای جدا شده از بیماران ایرانی و افغانی مورد استفاده قرار گرفت.

روش بررسی

۱۹۱ سویه جدا شده از بیماران سل ریوی در مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی، آزمایشگاه رفرانس سل کشوری (بیمارستان مسیح دانشوری) از نظر الگوی VNTR مورد بررسی قرار گرفتند (بین سالهای ۸۷-۸۵). جدا سازی اولیه سویه‌های مایکوباکتریوم با روش

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-03-29]

پتروف ۴٪ و با استفاده از محیط Lowenstein Jensen (LJ) انجام شد و برای شناسایی سویه‌ها از تست‌های بیوشیمیایی از قبیل: تستهای نیاسین، فعالیت کاتالاز، احیاء نیترات استفاده شد. حساسیت دارویی در برابر ایزونیازید (0.2µg/ml)، ریفامپین (40µg/ml)، استرپتومایسین (10µg/m) و اتامبوتول (2µg/ml) به روش تناسبی انجام و سویه‌ها به سه گروه حساس، MDR و غیر MDR تقسیم‌بندی شدند (۷). سپس DNA از کلنی‌های مثبت با روش N- استیل N , N , N– تری متیل آمونیوم بروماید استخراج گردید. برای انجام PCR از پرایمرهای مربوطه استفاده شد (جدول۱). سیکل PCR مورد استفاده برای همه لوکوس‌ها بصورت زیر بوده مدت ۵ دقیقه در دمای 94ºC و سپس ۳۰ سیکل شامل : 94ºC به مدت ۳۰ ثانیه و 65-53º به مدت ۳۰ ثانیه و 72ºC به مدت ۱۰ دقیقه. محصولات PCR بدست آمده را روی ژل ۲-۱٪ الکتروفورز می‌گردند. تعداد دقیق توالی تکرار شونده پشت سر هم برای هر سویه به وسیله اندازه محصول PCR بر روی ژل تعیین می‌شود. و با استفاده از پروتوکل استاندارد آنالیز می‌گردد.

تعیین پروفایل VNTR:

تعداد کپی‌های موجود برای هر سویه بصورت یک عدد ۷ رقمی که نشاندهنده پروفایل اللی به ترتیب: (ازچپ به راست) MPTR-A , ETR-A , ETR-B , ETR-C , ETR-D , ETR-E , ETR-F بدست می‌آید. برای مثال پروفایل سویه استاندارد $H_{37}RV$ بدین صورت است: ۶۳۳۴۳۳۳ که چپ به راست نشان می‌دهد ۶ کپی از واحد تکرار شونده پشت سر هم در لوکوس MPTRA، ۳ کپی از واحد تکرار شونده پشت سر هم 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 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 (۵).

آنالیز آماری:

(HGI)Hunter Gaston Index

آزمون HGI برای تنوع اللی هر یک از پرایمرها در سویه‌های ایرانی و افغانی استفاده گردید.

$$D = 1 - \left[\frac{1}{N(N-1)}\sum_{j=1}^{s} nj,(nj-1)\right]$$

در این فرمول D شاخص عددی افتراق، N مجموع سویه‌های موجود در روش تایپینگ مورد استفاده، S تعدادکل متفاوت سویه‌ها و nj تعداد سویه‌های متعلق به تیپ j می‌باشد (۸). در این بررسی، فرمول با استفاده از نرم‌افزار Direct Stats محاسبه گردید.

یافته‌ها

بیماران ایرانی و افغانی از نظر کلاسیک اپیدمیولوژی شامل: سن، جنسیت، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، سابقه بیماری و بیماران بدون سابقه اسمیر مثبت جدید و HIV بررسی شدند. از ۱۹۱ سویه جداشده، ۱۱۸ نفر (۶۱٪) ملیت ایرانی که ۵۵ نفر (۴۶/۶٪) زن و ۶۳ نفر (۵۳/۴٪) مرد و ۷۳ نفر (۳۸/۲٪) ملیت افغانی که ۴۳ نفر (۵۸/۹٪) زن و۳۰ نفر (۴۱/۱٪) مرد بودند. ۸ نفر (۶٪) ایرانی دارای HIV مثبت بودند. رنج سنی برای بیماران ایرانی ۸۴- ۱۲ سال و بیماران افغانی ۷۵-۱۵ سال بود. مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بیماران ایرانی۵۵/۹٪ حساس،

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-03-29]

۲۲/۹٪ MDR و ۲۱/۱٪ غیرMDR و در بیماران افغانی ۲۸/۸٪ حساس، ۶۷/۱٪ MDR و ۴/۱٪ غیر MDR بودند. بنابراین مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بیماران افغانی بیشتر از ایرانی بود (p=۰/۰۰۰). در بیماران ایرانی ۵۵/۹٪ و در بیماران افغانی ۸۴/۹٪ جز بیماران با سابقه بودند و ۴۴/۱٪ بیمار ایرانی و ۱۵/۱٪ بیمار افغانی جز مبتلایان بدون سابقه می‌باشند (جدول ۲) .

مولکولار تایپینگ سوش‌های جدا شده با استفاده از VNTR: از کل بیماران ۵۹٪ دارای الگوی VNTR کامل و ۴۰٪ الگوی VNTR ناقص را دارا می‌باشند. (الگوی ناقص بدین معنی است که در بعضی از لوکوس‌های مورد نظر، محصول PCR بدست نیامده است.) تنوع اللی در میان لوکوس‌های VNTR متفاوت می‌باشد. در این مطالعه بر اساس شاخص افتراق کل سویه‌ها، لوکوس ETR-A بعنوان لوکوس بسیار افتراق دهنده (HGI≥0.6) و لوکوس‌های MPTR-A ,ETR-C ETR-F, ETR-E, ETR-B بعنوان لوکوس‌های افتراق دهنده متوسط (HGI≥0.4 - 0.6) و لوکوس ETR-D بعنوان ضعیف‌ترین لوکوس افتراق دهنده شناسایی شدند. مقایسه تنوع اللی بین سویه‌های افغانی و ایرانی نشان می‌دهد که الگوی VNTR در افغانی نسبت به سویه‌های ایرانی کمتر می‌باشد. البته بجز لوکوس ETR-E که دارای تنوع بیشتری می‌باشد. لوکوس ETR-A دارای بالاترین قدرت تمایز در بین دو گروه می‌باشد. به عبارت دیگر ETR-A می‌تواند سویه‌های ایرانی و افغانی را با بیشترین قدرت، افتراق دهد (HGI≥0.6)(جدول ۳). بالاترین پروفایل عددی برای لوکوس‌های MPTR-A، ETR-A، ETR-B، ETR-C، ETR-D، ETR-E و ETR-F به ترتیب: ۶، ۳، ۲ ۴، ۳، ۳، ۳ در سویه‌های ایرانی و افغانی می‌باشند. پایین‌ترین پروفایل عددی برای لوکوس‌های فوق در سویه‌های ایرانی به ترتیب: ۷ ،۱، ۳، ۳، ۴، ۱، ۷ و در سویه‌های افغانی ۷، ۲، ۱، ۱، ۲، ۱، ۱ می‌باشد (جدول۴).

جدول ۱: توالی هریک ازپرایمرها به تعداد و اندازه هر یک از توالیهای تکرار شونده پشت سرهم و سایز محصولات PCR آنها در سویه استاندارد $H_{37}RV$

Locus name	Sequence of primers(5-3)	No. and size of Repeat units in H37Rv (bp)	Size of PCR Products in H37Rv (bp)
MPTR-A	GGTTACCACTTCGATGCGTCTGCC AGCCGCCGAAACCCATC	(16×15)	343
ETR-A	AAATCGGTCCCATCACCTTCTTAT CGAAGCTGGGGTCGCCCGCGATTT	(3×75)+23	420
ETR-B	GCGAACACCAGGACAGCATCATG GGCATGCCGGTGATCGAGTGG	(3×57)+8	292
ETR-C	GTGATGCGCTGCAGAACCTGCAG GGCGTCTTGACCTCCACGAGCT	(4×58)-21	276
ETR-D	CAGGTCACAACGAGAGGAAGAGC GCGGATCGGCCAGCGACTCCTC	(3×77)+7	310
ETR-E	CTTCGGCGTCGAAGAGAGCCTC CGGAACGCTGGTCACCACCTAAG	(3×53)-1	224
ETR-F	CTCGGTGATGGTCCGGCCGGTCAC GGAAGTGCTCGACAACGCCATGCC	(3×79)-13	476

سایز محصول PCR لوکوس MPTER-A در سویه استاندارد $H_{37}RV$, ۳۴۳ جفت باز و دارای سه پروفایل ۵،۶،۷ است. سایز محصول PCR لوکوس ETR-A در سویه استاندارد $H_{37}RV$, ۴۲۰ bp و دارای ۳ کپی ۷۵

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-03-29]

جفت باز تکراری پشت سرهم (توالی آخر bp ۲۳ بیشتر دارد) و هفت پروفایل ۱, ۲, ۳, ۴, ۵, ۶, ۷ است.

سایز محصول PCR لوکوس ETR-B در سویه استاندارد $H_{37}RV$,۲۹۲bp و دارای ۳ کپی bp ۵۷ تکراری پشت سرهم (توالی آخر ۸bp بیشتر دارد) و شش پروفایل ۱, ۲, ۳, ۴, ۵, ۶ است.

سایز محصول PCR لوکوس ETR-C در سویه استاندارد $H_{37}RV$, bp ۲۷۶ و دارای ۴ کپی bp ۵۸ تکراری پشت سر هم (توالی آخر ۲۱bp کمتر دارد) و چهار پروفایل۱،۲،۳،۵ است.

سایز محصول PCR لوکوس ETR-D در سویه استاندارد $H_{37}RV$, bp ۳۱۰ و دارای ۳ کپی ۷۷bp تکراری پشت سرهم (توالی آخر ۷bp بیشتر دارد) و چهار پروفایل ۳، ۴، ۶، ۷ است.

سایز محصول PCR لوکوس ETR-E در سویه استاندارد $H_{37}RV$, bp ۲۲۴ و دارای ۳ کپی ۵۳bp تکراری پشت سرهم (توالی آخر ۱bp کمتر دارد) و پنج پروفایل ۱،۲،۳،۴، ۵ است.

سایز محصول PCR لوکوس ETR-F در سویه استاندارد $H_{37}RV$, bp ۴۷۶ و دارای ۳ کپی ۷۹bp تکراری پشت سرهم (توالی آخر ۱۳bp کمتر دارد) و سه پروفایل ۱،۲،۳ است.

جدول ۲: مقایسه بیماران ایرانی و افغانی از نظر کلاسیک اپیدمیولوژی شامل:سن، جنسیت، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، سابقه بیماری و بیماران بدون سابقه اسمیر مثبت جدید HIV

		ملیت					
		ایرانی		افغانی		Total	
		Count	Column N%	Count	Column N%	Count	Column N%
ابتلا به ایدز	منفی	۱۱۰	٪۹۳/۲	۷۳	٪۱۰۰/۰	۱۸۳	٪۹۵/۵
	مثبت	۸	٪۶/۸	۰	٪۰	۸	٪۴/۲
جنس	زن	۵۵	٪۴۶/۶	۴۳	٪۵۸/۹	۹۸	٪۵۱/۳
	مرد	۵۳	٪۵۳/۴	۳۰	٪۴۱/۱	۹۳	٪۴۸/۷
حساسیت	MDR	۲۷	٪۲۳/۱	۴۹	٪۶۷/۱	۷۶	٪۴۰/۰
	حساس	۶۶	٪۵۶/۴	۲۱	٪۲۸/۸	۸۷	٪۴۵/۸
	غیر MDR	۲۵	٪۲۱/۱	۳	٪۴/۱	۲۸	٪۱۴/۶
مورد	قدیمی	۶۶	٪۵۵/۹	۶۲	٪۸۴/۹	۱۲۸	٪۶۷/۰
	جدید	۵۲	٪۴۴/۱	۱۱	٪۱۵/۱	۶۳	٪۳۳/۰

جدول ۳: نتایج مربوط به HGI در هر یک از لوکوس‌ها در سویه‌های ایرانی و افغانی

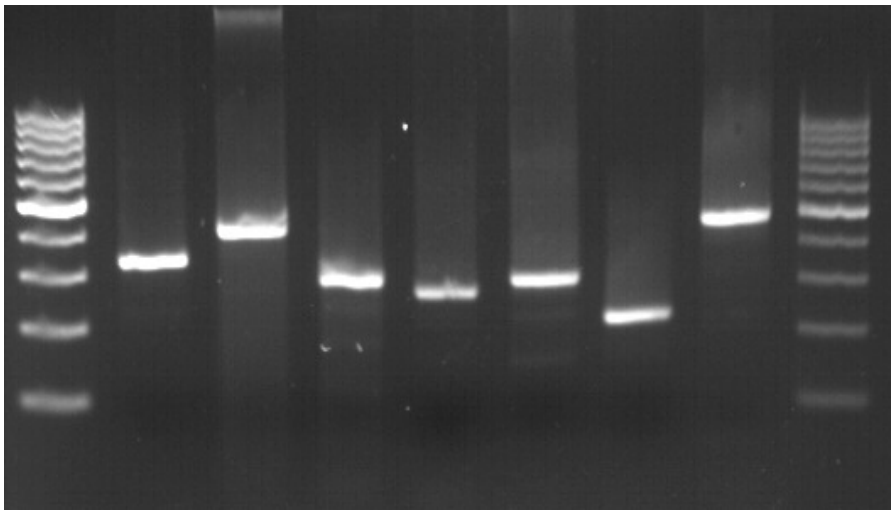
	D					
Locuse	ایرانی	cluster	افغانی	cluster	total	Cluster
MPTR-A	0.49	3	0.45	3	0.47	3
ETR-A	0.67	5	0.58	4	0.65	5
ETR-B	0.56	3	0.5	2	0.53	3
ETR-C	0.6	4	0.56	4	0.58	5
ETR-D	-	2	-	2	-	3
ETR-E	0.51	5	0.58	5	0.53	5
ETR-F	0.58	5	0.5	3	0.55	5

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-03-29]

جدول ۴: اطلاعات مربوط به تعداد توالی‌های تکرار شونده در مورد هر لوکوس سویه‌های ایرانی و افغانی

		ملیت				
		ایرانی		افغانی		Total
		Count	Column N%	Count	Column N%	Count	Column N%
MPTR-A	۰	۱۱	٪۹/۳	۸	٪۱۱/۰	۱۹	٪۹/۹
	۵	۳۸	٪۳۲/۲	۲۰	٪۲۷/۴	۵۸	٪۳۰/۴
	۶	۶۷	٪۵۶/۸	۴۴	٪۶۰/۳	۱۱۱	٪۵۸/۱
	۷	۲	٪۱/۷	۱	٪۱/۴	۳	٪۱/۶
ETR-A	۰	۱۳	٪۱۱/۰	۱۱	٪۱۵/۱	۲۴	٪۱۲/۶
	۱	۱	٪۸	۳	٪۴/۱	۴	٪۲/۱
	۲	۲۴	٪۲۰/۳	۲	٪۲/۷	۲۶	٪۱۳/۶
	۳	۴۶	٪۳۹/۰	۲۷	٪۳۷/۰	۷۳	٪۳۸/۲
	۴	۳۱	٪۲۶/۳	۳۰	٪۴۱/۱	۶۱	٪۳۱/۹
	۵	۳	٪۲/۵	۰	٪۰	۳	٪۱/۶
ETR-B	۰	۱۲	٪۱۰/۲	۲	٪۲/۷	۱۴	٪۷/۳
	۱	۳۷	٪۳۱/۴	۲۵	٪۳۴/۲	۶۲	٪۳۲/۵
	۲	۵۹	٪۵۰/۰	۴۶	٪۶۳/۰	۱۰۵	٪۵۵/۰
	۳	۱۰	٪۸/۵	۰	٪۰	۱۰	٪۵/۲
ETR-C	۰	۵	٪۴/۲	۵	٪۶/۸	۱۰	٪۵/۲
	۱	۰	٪۰	۱	٪۱/۴	۱	٪۵
	۲	۴۰	٪۳۳/۹	۲۸	٪۳۸/۴	۶۸	٪۳۵/۶
	۳	۶	٪۵/۱	۳	٪۴/۱	۹	٪۴/۷
	۴	۵۹	٪۵۰/۰	۳۶	٪۴۹/۳	۹۵	٪۴۹/۷
	۵	۸	٪۶/۸	۰	٪۰	۸	٪۴/۲
ETR-D	۰	۱۰	٪۸/۵	۹	٪۱۲/۳	۱۹	٪۹/۹
	۲	۰	٪۰	۱	٪۱/۴	۱	٪۵
	۳	۱۰۷	٪۹۰/۷	۶۳	٪۸۶/۳	۱۷۰	٪۸۹/۰
	۴	۱	٪۸	۰	٪۰	۱	٪۵
ETR-E	۰	۱۸	٪۱۵/۳	۸	٪۱۱/۰	۲۶	٪۱۳/۶
	۱	۲	٪۱/۷	۳	٪۴/۱	۵	٪۲/۶
	۲	۱۵	٪۱۲/۷	۹	٪۱۲/۳	۲۴	٪۱۲/۶
	۳	۵۵	٪۴۶/۶	۳۰	٪۴۱/۱	۸۵	٪۴۴/۵
	۴	۱۰	٪۸/۵	۷	٪۹/۶	۱۷	٪۸/۹
	۵	۱۸	٪۱۵/۳	۱۶	٪۲۱/۹	۳۴	٪۱۷/۸
ETR-F	۰	۳۳	٪۲۸/۰	۲۴	٪۳۲/۹	۵۷	٪۲۹/۸
	۱	۷	٪۵/۹	۳	٪۴/۱	۱۰	٪۵/۲
	۲	۲۹	٪۲۴/۶	۱۴	٪۱۹/۲	۴۳	٪۲۲/۵
	۳	۴۷	٪۳۹/۸	۳۲	٪۴۳/۸	۷۹	٪۴۱/۴
	۴	۱	٪۸	۰	٪۰	۱	٪۵
	۷	۱	٪۸	۰	٪۰	۱	٪۵

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-03-29]



شکل ۱: VNTR لوکوس‌ها به ترتیب MPTR-A ,ETR-ETR-F -A ,ETR-B ,ETR-C, ETR-D,ETR-E در سویه استاندارد $H_{37}RV$

بحث

یکی از روشهای مولکولی که بر اساس PCR است به نام VNTR معرفی گردید که بیشتر برای تایپینگ سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بکار می‌رود. این روش سریع و آسان است، آنالیز آن بصورت چشمی صورت می‌گیرد و بسیار پایدار است. در مطالعه‌ای که توسط ساوین[1] و همکارانش انجام شد، پایداری الگوی VNTR در بیماران مبتلا به سل در طی ۶ سال مورد بررسی قرار گرفت که نشان داد الگوی VNTR برای پایش بیماران در مدت طولانی روش مناسبی است. بدین صورت که اگر تغییری در الگوی VNTR بیمار مشاهده شود نشان دهنده عفونت مجدد با منشأ خارجی است (۹). یکی از لوکوس‌های مورد استفاده در VNTR، ETR-A است، اندازه محصول PCR آن ۴۲۰ جفت باز و دارای ۳ توالی تکراری پشت سر هم می‌باشد، که در این مطالعه لوکوس مورد بحث در سویه‌های ایرانی و افغانی دارای ۵ و ۴ پروفایل یعنی دارای دو Insertion و دو Deletion در سویه‌های ایرانی و یک Insertion و دو Deletion در سویه‌های افغانی می‌باشد. بنابراین این لوکوس با HGI≥0.6 بعنوان افتراق دهنده‌ترین لوکوس بین سویه‌های ایرانی و افغانی شناسایی شد. ETR-A می‌تواند سویه‌های ایرانی و افغانی را با بیشترین قدرت افتراق دهد. در حال حاضر روش VNTR بر پایه لوکوس‌هایی بنام Mycobacterial MIRU (Interspersed Repetitive Units) در مقیاس وسیعی در آمریکا صورت می‌گیرد (۱۰). در همین زمینه مطالعه‌ای روی ۳۶۷ ایزوله مایکوباکتریوم توبرکلوزیس متعلق به ژنوتایپ CASI در ۱۲ لوکوس به روش MIRU –VNTR در پاکستان انجام شد. آنها به این نتیجه رسیدند که لوکوس‌های (۳۹، ۲۷، ۱۰، ۱۶، ۳۱، ۲۶، ۴۰) افتراق دهنده‌ترین لوکوس‌ها برای ژنوتایپ CASI از مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می‌باشد. آنها همچنین از این روش(MIRU–VNTR) برای تمایز بین سویه‌های حساس و مقاوم استفاده کردند (۱۱). مطالعه انجام شده در آذربایجان شرقی در ایران در طی سالهای ۲۰۰۳-۲۰۰۲ نشان داد که از ۱۲۷ بیمار مورد مطالعه ۲۱

1. Savine

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-03-29]

دسته از آنها دارای الگوی مشابه MIRU-VNTR بودند، اما در بررسی ما این میزان کاهش یافته است (۱۲). در این بررسی، مطالعات کلاسیک اپیدمیولوژی نشان داد که ۸ نفر (۶٪) ایرانی دارای HIV مثبت بودند که هیچ شباهتی بین الگوی VNTR آنها مشاهده نشد هر چند بیماران مبتلا به HIV و TB در این مطالعه کم بود اما بدست آوردن الگوی متفاوت VNTR در بین این بیماران که همگی موارد جدید اسمیر مثبت نیز بودند، گسترش انتشار و شیوع سل را در جمعیت مورد بررسی نشان می‌دهد. در مطالعه‌ای که توسط بارلو[1] و همکارانش در رابطه با مقایسه سویه‌های بیجینگ از غیر بیجینگ با روش VNTR انجام گرفت با استفاده از لوکوس‌های مشخص سویه‌های بیجینگ را از غیر بیجینگ متمایز کرد.

امروزه سویه بیجینگ مایکوباکتریوم توبرکلوزیس توجه زیادی را در دنیا به خود معطوف کرده است چراکه ویژگی‌های پاتوژنیک مهمی از جمله داشتن ارتباط با مقاومت چند دارویی را دارا می‌باشد که این امر احتمالاً بعلت وجود اللهای مستعد جهش در ژنهای mut T می‌باشد (۱۳). در مطالعه حاضر از بین ۱۹۱ سویه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس ۱۶ (۸٪) سویه بیجینگ شناسایی گردید (از طریق اسپولیگوتایپینگ) که HGI به دست آمده برای لوکوس ETR- E و ETR- F معنی‌دار و سایر لوکوسها به دلیل نداشتن تعداد سویه کافی محاسبه نشدند. در همین زمینه مطالعه‌ای که در هنگ‌کنگ انجام شد، ۷۴٪ از آنها متعلق به خانواده بیجینگ بودند که HGI برای لوکوس‌های ETR-B, ETR-D, ETR-C ETR-E, ETR-A بدست آوردند. لوکوس‌های QUB11b و QUB11 a بیشترین قدرت افتراق را در میان سویه‌های بیجینگ داشتند و لوکوس‌های ETR-D , ETR-B دارای کمترین قدرت افتراق بودند. شایعترین الگوی برای سویه‌های بیجینگ در همان مطالعه با استفاده از لوکوسها، پروفایل ۵، ۳، ۴، ۲، ۴ به دست آمد. این پروفایل همچنین در میان اعضای خانواده W شایعترین بود، که باعث اپیدمی‌های زیادی از سل مقاوم به چند دارو در آمریکا، روسیه و کشور های دیگر می‌شود (۱۴). پس با بکار بردن تعداد لوکوس‌های بیشتر می‌توان قدرت افتراق روش VNTR را افزایش داد. در مطالعه‌ای، کوان[2] و همکارانش در سال ۲۰۰۵ نشان دادند که با افزایش تعداد لوکوس‌های مورد بررسی از VNTR می‌توان به عنوان روش جدا سازی اولیه استفاده کرد (۱۵). ما در این مطالعه از لوکوس‌های QUB11b و QUB11 a استفاده نمودیم. امید است در آینده مطالعات بیشتری روی این لوکوس‌ها انجام شود.

نتیجه‌گیری

از این روش برای مطالعات اپیدمیولوژی در سطح وسیع‌تری و بر روی مقادیر کم DNA استخراج شده از کشتهای اولیه مایکوباکتریایی می‌توان استفاده کرد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از همکاری مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی آزمایشگاه رفرانس سل کشوری واقع در بیمارستان مسیح دانشوری جهت فراهم نمودن منابع مالی و همچنین از پرسنل آزمایشگاه رفرانس سل کشوری به خاطر کمکهای آزمایشگاهی روتین تشکر و قدردانی می‌گردد.

1. Barlow

2. Cowan

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-03-29]

References

1. Van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, and et al. Strain identification of Mycobacterium tuberculosis by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. J Clin Microbiol 1993; 31: 406-409.
2. Mostr ouml MP, Gordon M, Sola C, Ridell M, Rastogi N: Methods used in the molecular epidemiology of tuberculosis. Clin Microbiol Infect 2002.
3. Kanduma E, McHugh TD, Gillespie SH. Molecular methods for mycobacterium tuberculosis strain typing: a users guide. J Appl Microbiol 2003; 94: 781-791.
4. Murray M, Nardell E. Molecular epidemiology of tuberculosis: achievements and challenges to current knowledge. Bull WHO 2002; 80: 477-482.
5. Frothingham R, Meeker-O` Connell WA. Genetic diversity in the mycobacterium tuberculosis complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. Microbiology 1998; 144 (Pt 5): 1189-1196.
6. Filliol I, Ferdinand S, Negroni L, Sola C, Rastogi N. Molecular typing of mycobacterium tuberculosis based on variable number of tandem DNA repeats used alone and in association with spoligotyping. J Clin Microbiol 2000; 38: 2520-2524.
7. Ramazanzadeh R, Amirmozafari N, Farnia P, Ghazi F. Genotyping of Mycobacterium tuberculosis isolates from TB patients with spoligotyping. cientific Journal of Kurdistan university of Medical science 2006; 11: 50-59.
8. Kremer K, Au BK, Yip PC, Skuce R, Supply P, Kam KM, van Soolingen D. Use of variable-number tandem-repeat typing to differentiate Mycobacterium tuberculosis Beijing family isolates from Hong Kong and comparison with IS6110 restriction fragment length polymorphism typing and spoligotyping. J Clin microbiol 2005; 43: 314-320.
9. Savine E, Warren RM, van der Spuy GD, Beyers N, van Helden PD, Locht C, Supply P. 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: 4561-4566.
10. Mazars E, Lesjean S, Banuls AL, Gilbert M, Vincent V, Gicquel B, Tibayrenc M, Locht C, Supply P: High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of Mycobacterium tuberculosis molecular epidemiology. Proc Natl Acad Sci U S A 2001; 98: 1901-1906.
11. Ali A, Hasan Z, Tanveer M. Siddiqui A, Ghebremichael S, Kallenius G, Hasan R. Characterization of mycobacterium tuberculosis Central Asian Strain1 using mycobacterial interspersed repetitive unit genotyping. BMC Microbiology 2007; 7: 76.
12. Asgharzadeh M, Khakpour M, Zahraei Salehi T and Samadi Kafil H. 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 2007; 3769-3777.
13. Mokrousov I, Narvskaya O, Limeschenko E, Vyazovaya A, Otten T, Vyshnevskiy B: Analysis of the allelic diversity of the mycobacterial interspersed repetitive units in Mycobacterium tuberculosis strains of the Beijing family: practical implications and evolutionary considerations. J Clin Microbiol 2004; 42: 2438-2444.
14. Gascoyne-Binzi DM, Barlow RE, Frothingham R, Robinson G, Collyns TA, Gelletlie R, Hawkey PM: Rapid identification of laboratory contamination with mycobacterium tuberculosis using variable number tandem repeat analysis. J Clin Microbiol 2001; 39: 69-74.
15. Cowan LS, Diem L, Monson T, Wand P, Temporado D, Oemig TV, Crawford JT. Evaluation of a two-step approach for large-scale, prospective genotyping of mycobacterium tuberculosis isolates in the United States. J Clin Microbiol 2005; 43: 688-695.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-03-29]