Archive of SID

مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی- مولکولی
دوره دوم، شماره هفتم، تابستان ۱۳۹۱

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

تعیین هویت ایزوله‌های بالینی مایکوباکتریوم جدا شده از بیماران ایرانی با استفاده از روش‌های فنوتیپیک و مولکولی

سعید ذاکر بستان آباد[۱]، پروین حیدریه[۲]، نسرین شیخی[۳]، مصطفی قلمی[۳]، شاهین پور آذر[۴]، سید علی نجومی[۵]، عبدالرزاق هاشمی شهرکی[۶*]

[۱] استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند، تهران، ایران
[۲] استادیار، دانشکده بهداشت علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی البرز، البرز،ایران
[۳] کارشناس، آزمایشگاه مسعود، تهران، ایران
[۴] کارشناس ارشد، آزمایشگاه مسعود، تهران، ایران
[۵] استادیار، بخش آب و غذا، انیستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
[۶] استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پزشکی، مرکز تحقیقات بیماری های عفونی و گرمسیری، دانشگاه جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

چکیده

سابقه و هدف: از آنجایی که گونه‌های مختلف مایکوباکتریوم دارای الگوی حساسیت دارویی متفاوتی می‌باشند، شناسایی دقیق برای به کار گیری درمان صحیح ضروری است و نهایتاً می تواند بر نتیجه درمان بیمار موثر باشد. در میان روش‌های مولکولی گوناگون استفاده از بررسی پلی مورفیسم حاصل از هضم آنزیمی محصول PRA (PCR) بر اساس ژن hsp ۶۵ به علت آسان بودن، سریع و ارزان بودن برای شناسایی ایزوله‌های پاتوژن مایکوباکتریومی تا سطح گونه ارجحیت دارد. تلفیقی از روش‌های فنوتیپیک و PRA بر اساس قطعه ۴۴۱ جفت بازی از ژن hsp ۶۵ برای شناسایی تنوع گونه‌های ایزوله‌های بالینی مایکوباکتریومی مورد استفاده قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: سویه‌های مورد بررسی شامل ۲۷۰ ایزوله‌های بالینی مایکوباکتریومی بودند که از ۲۳۵۸ بیمار در دو آزمایشگاه مرجع جمع آوری شده بودند. تعداد ۲۰۷ ایزوله متعلق به مایکوباکتریوم توبرکولوزیس به وسیله روش‌های فنوتیپیک رایج و PCR اختصاصی بر اساس شناسایی IS۶۱۱۰ تشخیص داده شدند. ایزوله‌های متعلق به مایکوباکتریوم‌های محیطی (NTM) با استفاده از تعدادی تست فنوتیپکی و PRA ژن hsp ۶۵ مورد شناسایی قرار گرفتند.

یافته‌ها: از تعداد ۲۷۰ سویه بالینی، تعداد ۲۰۷ ایزوله با استفاده از روش‌های فنوتیپکی و PCR اختصاصی بر اساس IS۶۱۱۰، به عنوان مایکوباکتریوم توبرکلوزیس شناخته شدند. سویه‌های NTM (۶۳ ایزوله) تنوعی از گونه‌های مختلف شامل ۱۲ ایزوله M. simiae، ۹ ایزوله M. fortuitum، ۵ ایزوله M. gordonae، ۵ ایزوله M. abscessus، ۵ ایزوله M. kansasii و گونه‌های کمیاب شامل ۳ ایزوله M. massilainase، ۳ ایزوله M. thermoresitbile، ۲ ایزوله M. senegalense type ۲، ایزوله M. conceptionense type ۱ یا M. senegalense type ۱، ایزوله M. phlei، ۱ ایزوله M. chelonae، ۱ ایزوله M. nonchromogenicum، ۱ ایزوله M. genavense۱، ایزوله M. montefiorense یا M. triplex، ۱ ایزوله M. branderi، ۱ ایزوله M. novocastrense، ۱ ایزوله M. nebraskense۱، ایزوله M. lentiflavum و ۱ ایزوله M. avium شدند.

نتیجه گیری: این مطالعه نشان داده که تکنیک PRA-hsp ۶۵ یک روش ساده، سریع و دقیق برای شناسایی ایزوله‌های بالینی NTM می باشد.

کلمات کلیدی: مایکوباکتریوم غیرسلی، تعیین هویت، PRA-hsp ۶۵

مقدمه

علم تاکسونومی بر اساس تلفیقی از روش‌های فنوتیپیک و مولکولی منتهی به شناسایی بیش از ۱۶۰ گونه مختلف مایکوباکتریوم گردیده است. جنس مایکوباکتریوم شامل گونه‌های پاتوژن، گونه‌های فرصت طلب و گونه‌های ساپروفیت می‌باشد که به طور کلی در دو گروه منجر به بیماری سل شامل اعضاء متعلق به کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (MTBC)

آدرس نویسنده مسئول: گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پزشکی، مرکز تحقیقات بیماری های عفونی و گرمسیری، دانشگاه جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران
Email:abdolrazaghh@gmail.com
تاریخ دریافت مقاله: ۹۱/۰۳/۰۹
تاریخ پذیرش: ۹۱/۰۴/۱۲

www.SID.ir

Archive of SID

من جمله مایکوباکتریوم توبرکلوزیس[1] و مایکوباکتریوم بوویس[2] و گروه مایکوباکتریوم‌های غیرسلی (NTM)[3] که به طور روتین بیماری سل را ایجاد نمی کنند، تقسیم می‌گردند. از مهم ترین گونه‌های بیماریزای فرصت طلب متعلق به گروه غیرسلی می‌توان به مایکوباکتریوم کانزاسی[4]، مایکوباکتریوم اویوم[5]، مایکوباکتریوم انتراسلولاره[6]، مایکوباکتریوم فورچیتوم[7]، مایکوباکتریوم چلونه ای[8] و مایکوباکتریوم آبسسوس[9] اشاره نمود (۶). تشخیص و تعیین هویت سریع ایزوله‌های بالینی دارای ارزش بالایی در جلوگیری از انتشار و همچنین کنترل عفونت و مدیریت بیمار دارد (۶). اگرچه امروزه در بسیاری از آزمایشگاه‌ها تعیین هویت بر اساس بررسی ویژگی‌های فنوتیپیک و تست‌های بیوشیمیایی استوار است، ولیکن به دلیل وقت گیر بودن، هزینه بالا و عدم شناسایی دقیق هویت گونه قابل اطمینان نمی باشند. امروزه روش‌های مختلف شامل بررسی الگوی اسیدهای چرب (۵)، بررسی پلی مورفیسم حاصل از هضم آنزیمی محصول PCR (PRA)[10] ژن‌هایی مانند hsp۶۵ (۱۳)، rpoB (۱۲) و ۱۶S-۲۳S internal transcribed spacer معروف به قطعه ITS (۱۰) و تعیین توالی ژن‌های مختلفی مانند hsp۶۵ (۸)، rpoB (۱)، ۱۶S rDNA (۳) و dnaJ (۱۵) مورد استفاده قرار می‌گیرند. اگرچه روش‌های مبتنی بر تعیین توالی ژن‌های مورد اشاره از ارزش بالایی برخوردار هستند ولیکن به دلیل هزینه بالا و غیر قابل دسترس بودن برای بسیاری از آزمایشگاه‌های موجود در کشورهای در حال توسعه، روشی مانند PRA مبتنی بر ژن hsp۶۵ به عنوان روشی سریع و ارزان قیمت بیشتر مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۱). این در حالی است که به دلیل استفاده وسیع از این روش در شناسایی مایکوباکتریوم‌ها، بانک اطلاعاتی غالب گونه‌های شناخته شده مایکوباکتریوم‌ها و در مواردی زیر گونه‌های موجود تهیه شده و در پایگاه اینترنتی به آدرس (http://app.chuv.ch/prasite) ذخیره و در دسترس می‌باشد که کار شناسایی گونه را به راحتی میسر می‌گرداند. در این مطالعه، ایزوله‌های غیر سلی مایکوباکتریومی جدا شده از دو آزمایشگاه کشور شامل آزمایشگاه مسعود (تهران) و آزمایشگاه رفرانس سل و جذام اهواز (خوزستان) با استفاده از بررسی ویژگی‌های فنوتیپیک و PRA مبتنی بر ژن hsp۶۵ تا سطح گونه مورد شناسایی قرار گرفتند

مواد و روش‌ها

ایزوله‌های مایکوباکتریوم

از تعداد ۷۹۸ بیمار مشکوک به سل ارجاع شده به آزمایشگاه مسعود از سال ۱۳۸۹ تا سال ۱۳۹۰، تعداد ۱۱۰ ایزوله بالینی مایکوباکتریوم جدا سازی و وارد مطالعه حاضر گردید. در مدت مشابه از تعداد ۱۵۶۰ بیمار ارسال شده به آزمایشگاه رفرانس سل اهواز تعداد ۱۶۰ ایزوله مایکوباکتریوم جدا و وارد مطالعه کنونی شدند. نمونه‌هایی که ایزوله‌های بالینی از آن ها جداسازی گردیدند، مجموعه متنوعی از نمونه‌های بالینی مانند خلط، شستشوی برونش، مایع پلورال، مایع لاواژ، غده لنفاوی، مغز استخوان، بافت نرم، مایع نخاع، چرک و مایع سینوویال را شامل می‌شدند. هر مایع یا نمونه‌ای که از ناحیه استریل بدن و در شرایط استریل تهیه و ارسال شده بود، بدون انجام فرآیند آلودگی زدایی فقط با تغلیظ نمونه توسط سانتریفیوژ بر روی محیط کشت لونشتاین جانسن تلقیح شدند. نمونه‌های تهیه شده از منابع بالینی مشکوک به آلودگی با فلور طبیعی تحت فرآیند آلودگی زدایی و هموژن سازی با روش استاندارد (شامل سود ۴٪) قرار گرفتند و کشت داده شدند (۷).

شناسایی بر اساس ویژگی‌های فنوتیپیک

به طور کلی مایکوباکتریوم‌ها را با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی به دو گروه گونه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و گونه‌های متعلق به مایکوباکتریوم‌های غیرسلی تقسیم گردیدند. تست‌های بیوشیمیایی شامل تولید پیگمان، سرعت رشد، تجمع نیاسین[11]، احیای نیترات[12]، هیدرولیز توئین[13]،

1-Mycobacterium tuberculosis
2- M. bovis
3- Nontuberculous mycobacteria
4- M. kansasii
5- M. avium
6- M. intracellulare
7- M. fortuitum
8- M. chelonae
9- M. abscessus
10- PCR-restriction fragment length polymorphism analysis
11- Niacin
12- Nitrate reductase
13- Tween 80 hydrolysis

www.SID.ir

Archive of SID

جذب آهن[1]، توانایی رشد روی محیط کشت مکانکی آگار بدون کریستال ویوله، توانایی رشد بر روی محیط کشت حاوی نمک[2] ۵٪ و رشد در دماهای مختلف، تولید آنزیم‌هایی مانند کاتالاز[3] ،آریل سولفاتاز[4] و اوره آز[5] بودند (۷).

شناسایی مولکولی ایزوله‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از انواع غیرسلی

برای شناسایی مولکولی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از واکنش PCR مبتنی بر تکثیر قطعه ای به طول ۱۲۳ جفت باز ار توالی IS۶۱۱۰ مورد استفاده قرار گرفت (۴). بدین صورت که تمامی ایزوله‌های جدا شده مایکوباکتریومی شامل مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و انواع غیرسلی با استفاده از یک جفت پرایمر اختصاصی

ÍS1 5´-CCTGCGAGCGTAGGCGTCGG-3´ و

ÍS2 5´-CTCGTCCAGCGCCGCTTCGG-3´

با غلظت ۲۵ pmol/µl، ۱۰ µl از DNA استخراج شده، ۵ mmol /۱ از $MgCl_2$، ۲۰۰ mmol از dNTP، ۵U از ۱۰X PCR buffer ۵ U از آنزیم Taq DNA polymerase (تهیه شده از شرکت سیناژن) در حجم نهایی ۵۰ µl قطعه ای به طول ۱۲۳ جفت باز تکثیر گردید. برای تکثیر از ۳۰ سیکل شامل ۹۵ C° به مدت ۱ دقیقه، ۶۲ C° به مدت ۱ دقیقه و ۷۲ C° به مدت ۱ دقیقه و یک سیکل نهایی شامل ۷۲ C° به مدت ۱۰ دقیقه استفاده گردید (۴). لازم به ذکر است از ژنوم سویه استاندارد H37Rv مایکوباکتریوم توبرکلوزیس نیز به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

شناسایی بر اساس PRA مبتنی بر ژن hsp۶۵

شناسایی گونه‌ها با استفاده از روش PRA مبتنی بر ژن hsp۶۵ بر اساس روش استاندارد انجام گردید (۱۳). به طور خلاصه با استفاده از دو پرایمر

Tb11 5´-ACCAACGATGGTGTGTCCAT-3´ و

Tb12 5´-CTTGTCGAACCGCATACCCT-3´

با غلظت ۲۵ pmol/µl، ۱۰ µl از DNA استخراج شده، ۵ mmol /۱ از $MgCl_2$، ۲۰۰ mmol از dNTP، ۵U از ۱۰X PCR buffer از آنزیم Taq DNA polymerase (تهیه شده از شرکت سیناژن) در حجم نهایی ۵۰ µl قطعه ای به طول ۴۴۱ جفت باز تکثیر گردید. برای تکثیر از ۳۵ سیکل شامل ۹۵ C° به مدت ۱ دقیقه، ۶۵ C° به مدت ۱ دقیقه و ۷۲ C° به مدت ۱ دقیقه و یک سیکل نهایی شامل ۷۲ C° به مدت ۱۰ دقیقه استفاده گردید (۱۳). بعد از تأیید تکثیر قطعه مذکور با استفاده از الکتروفورز ۵ µl محصول PCR در ژل آگاروز ۱٪، محصول PCR مربوط به هر ایزوله مورد بررسی با استفاده از دو آنزیم BstEII و HaeIII (تهیه شده از شرکت سیناژن) مورد هضم آنزیمی قرار گرفت و با استفاده از ژل بیس اکریلامید و رنگ آمیزی نیترات نقره به مدت ۶ ساعت با ولتاژ ۳۰۰ الکتروفورز گردید. لازم به ذکر است درهر ژل محصول هضم آنزیمی سویه استاندارد H37Rv مایکوباکتریوم توبرکلوزیس نیز به عنوان یک الگوی مشخص (مارکر) الکتروفورز گردید تا در آنالیز اندازه قطعات مورد استفاده قرار گیرد. بعد از الکتروفورز، با استفاده از مارکر مولکولی و همچنین الگوی مشخص PRA سویه استاندارد H37Rv مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، اندازه قطعات هر ایزوله با استفاده از دو آنزیم محدودالاثر مورد بررسی به صورت چشمی تعیین و در نهایت با استفاده از الگوهای موجود در بانک اطلاعاتی به آدرس (http://app.chuv.ch/prasite) شناسایی گونه مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها

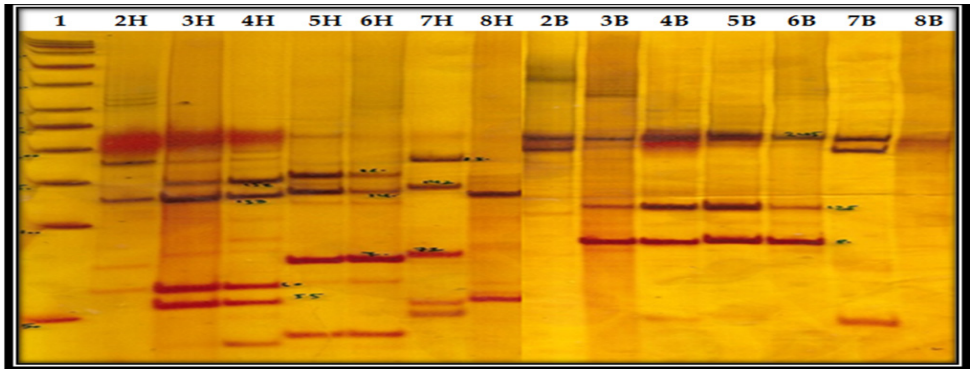
از تعداد ۷۹۸ ایزوله بالینی ارجاع شده به آزمایشگاه مسعود تعداد ۱۱۰ ایزوله بالینی مایکوباکتریوم جدا گردید که از این تعداد بر اساس تست‌های بیوشیمیایی و PCR قطعه ۱۲۳ جفت بازی توالی IS۶۱۱۰، تعداد ۹۰ ایزوله به عنوان مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و تعداد ۲۰ ایزوله به عنوان مایکوباکتریوم غیرسلی تشخیص داده شدند. در عین حال از تعداد ۱۶۰ ایزوله بالینی جدا شده در آزمایشگاه سل و جذام اهواز تعداد ۱۱۷ ایزوله بر اساس تست‌های بیوشیمیایی و PCR قطعه ۱۲۳ جفت بازی توالی IS۶۱۱۰، به عنوان مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و تعداد ۴۳ ایزوله به عنوان مایکوباکتریوم غیرسلی تشخیص داده شدند. تمام

1- Iron uptake
2- Growth in 5% NaCl
3- Catalase
4- Arylsulfatase
5- Uerase

www.SID.ir

Archive of SID

۲۰۷ ایزوله مایکوباکتریوم توبرکلوزیس جدا شده در این مطالعه الگوی مشخص و قابل تمایز از سایر مایکوباکتریوم‌ها بر اساس PRA مبتنی بر ژن hsp۶۵ تولید نمودند. در مجموع تعداد ۶۳ ایزوله بالینی مایکوباکتریوم غیرسلی از هر دو آزمایشگاه مورد شناسایی قرار گرفتند که با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی مختلف شایع ترین گونه‌های شناسایی شده شامل مایکوباکتریوم سیمیه (۱۲ ایزوله)، مایکوباکتریوم فورچیتوم (۹ ایزوله) و در نهایت مایکوباکتریوم آبسسوس (۵ ایزوله) بودند. جدول شناسایی اولیه ایزوله‌های بالینی مایکوباکتریوم غیرسلی را با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی نشان می‌دهد. بقیه ایزوله‌ها بر اساس تست‌های بیوشیمیایی مورد شناسایی اولیه قرار نگرفتند. بر اساس روش PRA مبتنی بر ژن hsp۶۵ تعداد ۱۲ ایزوله مایکوباکتریوم سیمیه، ۹ ایزوله مایکوباکتریوم فورچیتوم و در نهایت ۵ ایزوله مایکوباکتریوم آبسسوس شناسایی گردیدند. گونه‌های نادری از مایکوباکتریوم نیز که کمتر از نمونه‌های بالینی جدا می‌شوند نیز براساس الگوی PRA مبتنی بر ژن hsp۶۵ مورد شناسایی قرار گرفتند (جدول ۱). تعداد ۸ ایزوله نیز بر اساس دو روش مورد استفاده در این مطالعه مورد شناسایی دقیق قرار نگرفتند (شکل ۱). ایزوله بالینی NTM۸۵ که بر اساس تست‌های بیوشیمیایی شبیه کمپلکس مایکوباکتریوم اویوم تشخیص داده شد بر اساس PRA مبتنی بر ژن hsp۶۵ مایکوباکتریوم نانکروموژنیکوم[1] تعیین هویت گردید. ایزوله بالینی NTM۸۴ که بر اساس تست‌های بیوشیمیایی شبیه کمپلکس مایکوباکتریوم فورچیتوم شناسایی شد بر اساس PRA مبتنی بر ژن hsp۶۵ مایکوباکتریوم چلونه ای تعیین هویت گردید. همچنین ایزوله‌های بالینی NTM۱۳۶, NTM۲۰۵, NTM۱۸۲ که بر اساس تست‌های بیوشیمیایی شبیه کمپلکس مایکوباکتریوم فورچیتوم شناسایی شد بر اساس PRA مبتنی بر ژن hsp۶۵ مایکوباکتریوم ماسیلینسه[2] تعیین هویت گردیدند. ایزوله بالینی NTM۷۰ بر اساس PRA مبتنی بر ژن hsp۶۵ متعلق به یکی از دو گونه مایکوباکتریوم کانسپشننسی[3] و یا مایکوباکتریوم سنگلنسی[4] شناسایی گردید. ایزوله بالینی ۱۷۴۱۹۹ بر اساس PRA مبتنی بر ژن hsp۶۵ متعلق به یکی از دو گونه مایکوباکتریوم مونتیفریه[5] و یا مایکوباکتریوم تریپلکس[6] شناسایی گردید. ایزوله بالینی NTM۱۸۶، بر اساس تست‌های بیوشیمیایی و شباهت بالای الگوی PRA مبتنی بر ژن hsp۶۵ مایکوباکتریوم گوردونه[7] تشخیص داده شد ولیکن به دلیل عدم شباهت ۱۰۰٪ باندهای الگوی PRA به عنوان تایپ جدیدی از مایکوباکتریوم گوردونه در نظر گرفته شد.



شکل- ۱: الگوی PRA مبتنی بر ژن hsp۶۵ تعدادی از ایزوله های بالینی مایکوباکتریوم. هر عدد نشان دهنده الگوی برش یک ایزوله می باشد. حرف H نشان دهنده برش با آنزیم HaeIII و حرف B نشان دهنده برش با آنزیم BstEII می باشد. از چپ به راست چاهک شماره ۱ شامل مارکر مولکولی ۵۰ جفت بازی، چاهک شماره ۲: مایکوباکتریوم سیمیه (NTM۱۸۹)، چاهک شماره ۳: مایکوباکتریوم فورچیتوم سویه استاندارد ATCC۶۸۴۱، چاهک شماره ۴: مایکوباکتریوم فورچیتوم(NTM۱۰۱)، چاهک شماره ۵: مایکوباکتریوم تویرکلوزیس سویه استاندارد H۳۷Rv، چاهک شماره ۶: مایکوباکتریوم تویرکلوزیس(NTM۷۲)، چاهک شماره ۷: مایکوباکتریوم ترمورزیستیبل(HN۱۹) و چاهک شماره ۸: مایکوباکتریوم ناشناخته (NTM۱۹۱)می باشند.

1- M. nonchromogenicum
2- M. massilainase
3- M. conceptionense
4- M. senegalense
5- M. montefiorense
6- M. triplex
7- M. gordonae

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱: الگوی و نتیجه شناسایی ایزوله های بالینی مایکوباکتریوم غیرسلی تا سطح گونه بر اساس PRA ژن hsp۶۵

Number of the isolates	PRA		Best matches by PRA
	*BstE*II patterns	*HaeIII* patterns	
NTM189, NTM192, NTM171,NTM163, NTM139, NTM134, NTM108, 145,1692,NTM77, NM13, NM19	235 / 210	185 / 130	*M. simiae type 1*
NTM101, NTM103, SM8, 57,NTM72,NTM118,NTM87,NTM133,NTM129	235 / 120 / 85	145 / 120 / 60 / 55	*M. fortuitum type 1*
NTM70	235 / 120 / 85	140 / 125 / 60 / 55	*M. conceptionense* type 1 or *M. senegalense* type 1
NM8,NM10	235/135/85	140/125/100	*M. senegalense* type 2
NTM128,NTM112, NTM110, NTM109, NTM144	235 / 210	145 / 70 / 60 / 55	*M. abscessus* type 1
NTM113	320 / 115	130 / 115 / 60	*M. gordonae* type 4
NM11	235/120/100	130/115/0	*M. gordonae type 3*
NTM186	235 / 210	165 / 130/ 60	*M. gordonae* new type
NTM114, NTM142	235/120/85	160/115/60	*M. gordonae type 1*
FP-143, NTM130, HN19	235 / 210	180 / 135 / 70 / 50	*M. thermorresistibile*
M226	235 / 210	140 / 80 / 60 / 50	*M. phlei*
NTM170, NTM106, NM12, NM14	235 / 210	130 / 105 / 80	*M. kansasii* type 1
NM9	235/120/85	130/115/75	*M. kansasii type 4*
NTM136, NTM205, NTM182	235 / 210	200 / 70 / 60 / 50	*M. massilainase*
NTM 84	320/130	200/60/55	*M. chelonae type 1*
NTM 85	235 / 120 / 85	145 / 60 / 55	*M. nonchromogenicum type 1*
NTM208	320 / 210	185 / 130	*M. genavense* type 1
174199	320/115	145/130/60	*M. montefiorense* type 1 or *M. triplex* type 1
NM14	235/210	130/105/80	*M. branderi type 1*
NM21	440/0/0	140/60/50	*M. novocastrense type 1*
NM20	440/0/0	130/115/60	*M. nebraskense* type 1
160448	No digest	160/120/85	*Mycobacterium sp.*
NM7	235/120/85	145/125/60	*Mycobacterium sp.*
NM25	310/120	140/105/80	*Mycobacterium sp.*
NM6	235 / 120 / 100	140/85/60	*Mycobacterium sp.*
NM18	235/120/85	145/125	*Mycobacterium sp.*
NM3	235/210	185/145	*Mycobacterium sp.*
NM22	440/0/0	145/130	*M. lentiflavum type 1*
NM23	235/120/100	130/85/60	*Mycobacterium sp.*
NM5	235/210	130/105/60	*M. avium subspecie avium type 2*
NTM191	235/210	140/130/105/50	*Mycobacterium sp.*

بحث

شناسایی گونه ایزوله‌های بالینی مایکوباکتریوم بسیار پیچیده است. از یک سو اگر چه غالب ایزوله‌های جدا شده از نمونه‌های بالینی به ویژه در کشورهایی مانند ایران که بیماری سل اندمیک است، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می‌باشد ولیکن تعداد اندکی آزمایشگاه با توانمندی انجام تست‌های بیوشیمیایی و مولکولی برای شناسایی عامل عفونی فوق وجود دارد. با وجود جداسازی مایکوباکتریوم‌های غیرسلی در تعدادی از آزمایشگاه‌های تخصصی، شناسایی دقیق گونه انجام نمی‌گردد این در حالی است که در بسیاری از موارد عفونت با مایکوباکتریوم‌های غیرسلی نوع درمان و طول درمان کاملاً بستگی به هویت گونه دارد (۶). در مطالعه کنونی شناسایی ایزوله‌های متعلق به گونه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی دارای حساسیت و اختصاصیت بالای بود چراکه تعداد ۲۰۷ ایزوله که با استفاده از تست‌هایی بیوشیمیایی همچون تست نیاسین، نیترات و کاتالاز به عنوان مایکوباکتریوم توبرکلوزیس شناسایی شدند، با استفاده از PCR قطعه ای به طول ۱۲۳ جفت باز توالی IS۶۱۱۰ با پرایمرهای اختصاصی نیز مثبت شدند.

www.SID.ir

Archive of SID

این در حالی بود که شناسایی گونه مایکوباکتریوم‌های غیر سلی با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی، علاوه بر هزینه بالا و وقت گیر بودن، فاقد توانمندی لازم در جهت شناسایی دقیق گونه بود (جدول۲). چراکه بسیاری از گونه‌ها دارای فعالیت‌های آنزیمی مشابه و یا در مواردی غیر فعال می‌باشند (۷). از روش‌های مختلف مورد استفاده در شناسایی گونه، PRA مبتنی بر ژن hsp۶۵ یکی از کاربردی و رایج ترین‌ها می‌باشد که علاوه بر سرعت بالا، در مقایسه با روش‌های مولکولی دیگر بسیار کم هزینه است (۱۱). به ویژه آنکه امکان شناسای گونه با استفاده از الگوهای موجود در بانک اطلاعاتی به آدرس (http://app.chuv.ch/prasite) نیز وجود دارد. در این مطالعه روش PRA مبتنی بر ژن hsp۶۵ به خوبی توانست مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به عنوان شایع ترین و مهم ترین گونه مایکوباکتریوم‌ها را از سایر مایکوباکتریوم‌ها متمایز کند. همچنین روش PRA مبتنی بر ژن hsp۶۵ از ۶۳ ایزوله بالینی مایکوباکتریوم غیرسلی تعداد ۵۵ ایزوله (۸۷٪) را تا سطح گونه شناسایی کند. تنها تعداد ۸ ایزوله بالینی مایکوباکتریوم غیرسلی نیز بر اساس دو روش مورد استفاده در این مطالعه مورد شناسایی دقیق قرار نگرفتند. همچنین روش PRA مبتنی بر ژن hsp۶۵ شناسایی ایزوله‌هایی مانند NTM۸۵ و چهار ایزوله بالینی NTM۱۳۶, NTM۲۰۵, NTM۸۴, NTM۱۸۲ که بر اساس تست‌های بیوشیمیایی به ترتیب شبیه کمپلکس مایکوباکتریوم اویوم و مایکوباکتریوم فورچیتوم شناسایی شدند بر اساس PRA مبتنی بر ژن hsp۶۵ به ترتیب مایکوباکتریوم نانکروموژنیکوم (NTM۸۵)، چلونه ای (NTM۸۴) و مایکوباکتریوم ماسیلینسه (NTM۱۳۶, NTM۲۰۵, NTM۱۸۲) تعیین هویت گردیدند. از مهم ترین محدودیت های روش PRA مبتنی بر ژن hsp۶۵ برای شناسایی گونه مایکوباکتریوم‌ها می‌توان به پیچیده بودن تعیین اندازه قطعات PRA اشاره نمود. همچنین یکسان بودن الگو در تعدادی از گونه‌ها نیز از مشکلات این روش است. همان طور که در جدول ۲ آورده شده است هویت دقیق ایزوله بالینی NTM۷۰ به دلیل یکسان بودن الگوی PRA مایکوباکتریوم

جدول ۲: ویژگی های میکروبی و بیوشیمیایی تعدادی از ایزوله های بالینی مایکوباکتریوم غیرسلی و نتیجه شناسایی اولیه آنها

Isolates	Growth at 25°C	Growth at 30°C	Growth at 37°C	Growth at 42°C	Growth on MacConkey agar	Urease production	Iron uptake	Tween 80 hydrolysis	Tolerance to 5% NaCl	Tellurite reduction	Pigment production	Growth rate (Days)	Arylsulfatase (3days)	Niacin production	Nitrate reduction	Heat lebile Catalase	Heat stable Catalase	Species or complex
NTM170, NTM106, NM12, NM14, NM9	+	+	+	–	–	+	–	–	+	+	Y/P	>7	–	–	1+	>100	+	*M. kansasii* like
NTM101, NTM103, SM8, H57,HNTM72,HNTM118,HNTM87,HNTM133,HNTM129	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	N	<7	+	–	1+	>100	+	*M. fortuitum* complex
FP-143, NTM130, NM19	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+	Y/S	<7	+	–	3+	>100	–	*Mycobacterium spp*
NTM189, NTM192, NTM171,NTM163, NTM139, NTM134, NTM108, H145,1692,NTM77, NM13, NM19	–	+	+	–	+	+	–	–	+	+	N	>7	+	–	–	20	–	*M.simiae* like
NTM 85, NM5	–	+	+	–	+	+	–	–	+	+	N	>7	+	–	–	15	–	*M. avium* complex
NTM70	+	+	+	–	+	+	–	+	+	+	N	<7	+	–	2+	>100	+	*M. fortuitum* complex
NTM128,NTM112, NTM110, HNTM109, HNTM144	+	+	+	–	+	+	+	–	+	+	N	<7	+	–	+	>100	+	*M. fortuitum* complex
M226	–	+	+	–	–	+	–	–	–	–	Y/S	>7	–	+	2+	56	–	*Mycobacterium spp*
NTM 84	–	+	+	–	+	+	+	+	–	–	N	<7	+	–	–	65	+	*M. fortuitum* complex
NTM136, NTM205, NTM182	–	+	+	–	+	+	+	+	–	–	N	<7	+	–	–	65	+	*M. fortuitum* complex

www.SID.ir

Archive of SID

سنگلنسی و مایکوباکتریوم کانسپشننسی مشخص نگردید. هویت دقیق ایزوله بالینی ۱۷۴۱۹۹ به دلیل یکسان بودن الگوی PRA مایکوباکتریوم مونتیفریه و یا مایکوباکتریوم تریپلکس مشخص نگردید. به دلیل تنوع الگوهای PRA مبتنی بر ژن hsp۶۵ به خصوص در مورد ایزوله‌های کلینیکی مناطق جغرافیایی خاص در مواردی احتمال برخورد با الگوی جدید وجود دارد که شناسایی ایزوله‌ها را می‌تواند دچار تردید نماید (۲). در این مطالعه ایزوله بالینی NTM۱۸۶، بر اساس تست‌های بیوشیمیایی و شباهت بالای الگوی PRA مبتنی بر ژن hsp۶۵ به عنوان مایکوباکتریوم گوردونه تشخیص داده شد ولیکن به دلیل عدم شباهت ۱۰۰٪ باندهای الگوی PRA به عنوان تایپ جدیدی از مایکوباکتریوم گوردونه در نظر گرفته شد. بر اساس نتایج این مطالعه، اگرچه روش PRA مبتنی بر ژن hsp۶۵ برای شناسایی گونه مایکوباکتریوم‌ها دارای محدودیت‌هایی است ولیکن با توجه به سرعت بالا، قدرت بالا درشناسایی دقیق غالب ایزوله‌های بالینی مایکوباکتریوم و همچنین هزینه بسیار پایین، روشی مناسب برای شناسایی گونه در آزمایشگاه‌های رفرانس ارزیابی گردید و توصیه می‌گردد که آزمایشگاه‌های رفرانس از روش مذکر به عنوان روشی روتین در شناسایی ایزوله‌های بالینی مایکوباکتریوم استفاده نمایند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از همکاران حوزه معاونت پزوهشی دانشگاه آزاد اسلامی و هم چنین کارشناسان دانشکده پزشکی دانشگاه جندی شاپور اهواز به جهت مساعدت در اتمام پروژه تشکر می نمایند.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

(1) Adékambi T, Colson P, Drancourt M. rpoB-based Identification of Nonpigmented and Late-Pigmenting Rapidly Growing Mycobacteria. J Clin Microbiol, 2003;41:5699-5708.
(2) Cheunoy W, Prammananan T, Chaiprasert A, Foongladda S. Comparative Evaluation of Polymerase Chain Reaction and Restriction Enzyme Analysis: Two Amplified Targets, hsp65 and rpoB, for Identification of Cultured Mycobacteria. Diagn Microbiol Infect Dis, 2005;51:165-71.
(3) Devulder G, Pérouse de Montclos M, Flandrois JP. A Multigene Approach to Phylogenetic Analysis Using the Genus Mycobacterium as A Model. Int J Syst Evol Microbiol, 2005;55:293-302.
(4) Eisenach KD, Cave MD, Bates JH, Crawford JT. Polymerase Chain Reaction Amplification of a Repetitive DNA Sequence Specific for Mycobacterium Tuberculosis. J Infect Dis, 1990;161:977-981.
(5) Garza-Gonzalez E, Guerrero-Olazaran M, Tijerina-Menchaca R, Viader-Salvado JM. Identification of Mycobacteria by Mycolic Acid Pattern. Arch Med Res, 1998;29:303-306.
(6) Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, Holland SM, Horsburgh R, Huitt G, Iademarco MF, Iseman M, Olivier K, Ruoss S, von Reyn CF, Wallace RJ Jr, Winthrop K. An Official ATS/IDSA Statement: Diagnosis, Treatment, and Prevention of Nontuberculous Mycobacterial Diseases. Am J Respir Crit Care Med, 2007 15;367-416.
(7) Kent PT, Kubica GP. Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory. Centers for Disease Control, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta: Ga.; 1985.
(8) Kim H, Kim SH, Shim TS, Kim MN, Bai GH, Park YG, Lee SH, Chae GT, Cha CY, Kook YH, Kim BJ. Differentiation of Mycobacterium Species by Analysis of the Heat-Shock Protein 65 Gene (hsp65). Int J Syst Evol Microbiol, 2005;55:1649-56.
(9) Pourahmad F, Thompson KD, Adams A, Richards RH. Comparative Evaluation of Polymerase Chain Reaction-Restriction Enzyme Analysis (PRA) and Sequencing of Heat Shock Protein 65 (hsp65) Gene for Identification of Aquatic Mycobacteria. J Microbiol Methods, 2009;76:128-135.
(10) Roth A, Reischl U, Streubel A, Naumann L, Kroppenstedt RM, Habicht M, Fischer M, Mauch H. Novel Diagnostic Algorithm for Identification of Mycobacteria Using Genus-specific Amplification of the 16S-23S rRNA Gene Spacer and Restriction Endonucleases. J Clin Microbiol. 2000;38:1094-1104.
(11) Sajduda A, Martin A, Portaels F, Palomino JC. hsp65 PCR-Restriction Analysis (PRA) with Capillary Electrophoresis for Species Identification and Differentiation of Mycobacterium Kansasii and Mycobacterium Chelonae-Mycobacterium Abscessus Group. Int J Infect Dis, 2012;16:193-197.
(12) Shin JH, Lee HK, Cho EJ, Yu JY, Kang YH. Targeting the rpoB Gene Using Nested PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism for Identification of Nontuberculous Mmycobacteria in Hospital Tap Water. Microbiol, 2008;46:608-614.
(13) Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Böttger E, Bodmer T. Rapid Identification of Mycobacteria to the Species Level by Polymerase Chain Reaction and Restriction Enzyme Analysis. J Clin Microbiol, 1993; 31:175–178.
(14) Tortoli E. Clinical Manifestations of Nontuberculous Mycobacteria Infections. Clin Microbiol Infect, 2009;15:906-910.
(15) Yamada-Noda M, Ohkusu K, Hata H, Shah MM, Nhung PH, Sun XS, Hayashi M, Ezaki T. Mycobacterium Species Identification, a New Approach via DnaJ Gene Sequencing. Syst Appl Microbiol, 2007;30:453-462.

www.SID.ir