

## Prevalence of non-tuberculous mycobacteria isolated from patients referring to tuberculosis center of Kashan University of Medical Sciences.

**Zilae M.R., BS<sup>1</sup>, Firoozeh F., PhD<sup>2</sup>, Moniri R., PhD<sup>3</sup>, Sehat M., PhD<sup>4</sup>, Zahedi Bidgoli Z., BS<sup>5</sup>**

1. Student of Microbiology, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran (Corresponding Author), Tel:+98-31-55318855, mersad1388@yahoo.com

2. Assistant Professor, Microbiology Department, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran.

3. Professor, Microbiology Department Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran.

4. Assistant Professor, Epidemiology Department, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran.

5. Student, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran.

### ABSTRACT

**Background and Aim:** Nowadays, the importance of pathogenicity of non-tuberculosis mycobacteria is well known. Generally, this group, in addition to the respiratory system can cause lymph nodes, skin, soft tissue and bone disorders. Identification of Mycobacterium by culture and biochemical tests may take several weeks and may not be useful for definitive diagnosis. PCR-RFLP (PRA) technique of the hsp65 gene using HaeIII and BstEII enzymes is a precise method for species differentiation, in comparison to phenotypic methods. It is a quick and inexpensive method for detection of mycobacterial species. This study aimed to assess the prevalence of non-tuberculous mycobacteria isolated from the patients referring to tuberculosis center (TB) of Kashan University of Medical Sciences.

**Material and Method:** The study included 106 patients who had been referring to TB Center of Kashan University of Medical Sciences, from 1391 to 1394. The samples were tested by biochemical diagnostic tests. At the same time identification of the strains was made by use of PRA. Amplification of 441-bp fragment was performed by PRA for detection of hsp65 gene. The PCR products were digested with HaeIII and BstEII enzymes and analysis was performed on the basis of electrophoresis.

**Results:** Molecular analysis showed non-tuberculosis mycobacteria in 4(8.3%) sputum samples, i.e. one positive sample (0.9 %) for every one of the following strains: *M. abscessus*, *M. senegalense*, *M. fortuitum* and *M. kansasii*.

**Conclusion:** The results of this study showed that some cases of tuberculosis in Kashan are due to non-tuberculosis mycobacteria. Also use of PRA analysis of hsp65 gene for clinical specimens is a rapid and useful tool for identification of species of mycobacterium which is helpful for early diagnosis, treatment and control of tuberculosis.

**Keywords:** Mycobacterium tuberculosis complex, Non-tuberculosis mycobacteria, PCR-RFLP, hsp65.

**Received:** Jul 31, 2016    **Accepted:** Sep 5, 2016

## بررسی فراوانی ایزوله های مایکوباکتریومهای غیر توبرکلوزیس، جدا شده از بیماران مراجعه کننده به مرکز سل دانشگاه علوم پزشکی کاشان

محمد رضا ذیلابی<sup>۱</sup>، فرزانه فیروزه<sup>۲</sup>، رضوان منیری<sup>۳</sup>، مجتبی صحت<sup>۴</sup>، زهرا زاهدی بیدگلی<sup>۵</sup>

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشکده علوم پزشکی کاشان، (مؤلف مسئول)، تلفن ثابت: ۰۳۱-۵۵۳۱۸۸۵۵، mohammadrezazilae@gmail.com

۲. استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پزشکی کاشان.

۳. استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پزشکی کاشان.

۴. استادیار گروه اپیدمیولوژی، دانشکده علوم پزشکی کاشان.

۵. دانشجو، دانشکده علوم پزشکی کاشان.

### چکیده

**زمینه و هدف:** امروزه اهمیت بیماریزایی مایکوباکتریوم های غیرکلوزیس (Non-Tuberculosis Mycobacterium) برای انسان مشخص گردیده است. بطور کلی این گروه علاوه بر بیماریزایی در دستگاه تنفس، از قدرت بیماریزایی در غدد لنفاوی، پوست، بافت نرم، استخوان ها برخوردار است. تعیین هویت مایکوباکتریوها بر اساس کشت و تستهای بیوشیمیایی هفته ها طول میکشد و در تشخیص قطعی به ما کمک نمی کند. تکنیک (PRA) PCR-RFLP از ژن hsp65 با استفاده از آنزیمهای HaeIII و BstEII یک روش افتراق گونه ای دقیق بوده و نسبت به روش های فنوتیپی از دقت و سرعت بالاتری برخوردار است. همچنین یک روش سریع و ارزان برای تشخیص گونه های مایکوباکتریایی میباشد. این مطالعه با هدف تعیین فراوانی ایزوله های مایکوباکتریوم غیر توبرکلوزیس، جدا شده از بیماران مراجعه کننده به مرکز سل انجام شد.

**روش بررسی:** مطالعه بر روی ۱۰۶ بیمار، مراجعه کننده به مرکز سل دانشگاه علوم پزشکی کاشان، در طول سالهای ۹۱ تا ۹۴ انجام گرفت. ابتدا نمونه ها از نظر وجود تست های تشخیصی بیوشیمیایی مورد آزمون قرار گرفتند. همزمان تعیین هویت آن سویه ها با روش PRA انجام گرفت. سپس قطعه ۴۴۱ جفت بازی (hsp65) Heat Shock Protein 65 با روش PRA تکثیر شد. سپس محصولات PCR با دو آنزیم HaeIII و BstEII هضم گردید و آنالیز بر اساس الکتروفورز انجام گردید.

**یافته ها:** بر اساس آزمایشات مولکولی از میان ۱۰۶ نمونه بالینی، ۴ (۳/۸٪) نمونه خلط مربوط به مایکوباکتریوم های غیر توبرکلوزیس بودند. که شامل یک نمونه Mycobacterium abscessus، یک نمونه Mycobacterium senegalense، یک نمونه Mycobacterium fortuitum و یک نمونه Mycobacterium kansasii بودند.

**نتیجه گیری:** نتایج مطالعه حاضر نشان داد که برخی از موارد بیماری سل در شهر کاشان ناشی از مایکوباکتریوم های غیر توبرکلوزیس می باشد. همچنین استفاده از روش PRA مبتنی بر ژن hsp65 مستقیماً بر روی نمونه های بالینی، علاوه بر تسریع تشخیص با تعیین دقیق گونه های مایکوباکتریوم کمک شایانی در تشخیص، درمان و کنترل صحیح بیماری سل می نماید.

**کلمات کلیدی:** مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس، مایکوباکتریوم غیر توبرکلوزیس، PRA، hsp65

وصول مقاله: ۹۵/۵/۱۰ اصلاحیه نهایی: ۹۵/۶/۱۵ پذیرش: ۹۵/۶/۱۵

(۹) و rpoB (۱۰) و internal transcribed spacer و 16S-23S معروف به قطعه ITS (۱۱) و تعیین توالی ژن های مختلفی مانند 65hsp (۱۲)، rpoB (۱۳)، 16S rDNA (۱۴) 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 آزمایشگاه های موجود در کشورهای در حال توسعه، روشی مانند PRA مبتنی بر ژن 65hsp به عنوان روشی سریع و ارزان قیمت بیشتر مورد استفاده قرار میگیرد (۱۶). این در حالی است که به دلیل استفاده وسیع از این روش در شناسایی میکوباکتریوم ها، بانک اطلاعاتی، غالب گونه های شناخته شده میکوباکتریوم ها و در مواردی زیر گونه های موجود تهیه شده و در پایگاه اینترنتی به آدرس (<http://app.chuv.ch/prasite>) ذخیره و در دسترس می باشد که کار شناسایی گونه را به راحتی میسر می گرداند. در روش های مختلف PRA می توان تمام ژن یا قسمت هایی از آن را مورد هدف قرار داد. ژن های مورد هدف PRA باید از نظر تکاملی حفاظت شده بوده و در تمام گونه های میکوباکتریومی وجود داشته باشند (۱۷). این روش مبتنی بر دو تکنیک PCR و RFLP است. PCR یک تکنیک دقیق و ارزان برای تکثیر نواحی مشخص از ژن است. در تکنیک RFLP محصولات PCR تحت اثر آنزیم های محدود اثر قرار گرفته و با ایجاد قطعات مختلف، الگوهای PRA منحصر به فرد حاصل می کنند. در این مطالعه برای تعیین فراوانی میکوباکتریوم های غیر توپرکلوزی از روش PRA با هدف قرار دادن یک قطعه ۴۴۱ جفت بازی در بخش پروتئین شوک حرارتی (hsp65) براساس مطالعه Kim و هم کاران استفاده شده است (۱۸). ژن hsp65 که یک پروتئین ۶۵ کیلودالتونی را کد می کند که در تمام گونه های میکوباکتریایی وجود دارد و شامل اپی توپ هایی

علاوه بر میکوباکتریوم توپرکلوزیس کمپلکس و میکوباکتریوم لپرا که در گروه پاتوژن های اصلی انسانی و حیوانی به حساب می آیند، گونه های دیگر میکوباکتریوم Mycobacterium Other Than Tuberculosis (MOTT) یا Mycobacterium (NTM) به عنوان پاتوژنهای فرصت طلب شناخته می شوند (۱). بر اساس مطالعات اخیر، این دسته از میکوباکتریوم ها قادرند انواع مختلفی از بیماریهای انسانی را در ریه، پوست، کلیه، مغزو سایر نقاط بدن ایجاد کنند (۲). تعداد میکوباکتریوم آتیبیک شناسایی شده از حدود ۴۰ گونه در سال ۱۹۸۱ به بیش از ۱۰۰ گونه در سال ۲۰۰۹ افزایش یافته است (۳). به علت پراکندگی گونه های NTM در محیط، تفسیر جداسازی آنها پیچیده می باشد. چنانچه گونه ای بیش از یک بار از بیمار ایزله شود، جداسازی آن حایز اهمیت است (۴). مقاوم بودن این دسته به اکثر داروهای ضد سلی (مانند ایزونیاژید، ریفامپین، استرپتوماکسین، اتامبوتول و پیرازینامید)، توجه بسیاری از محققین را به خود جلب کرده است (۵). تشخیص کلینیکی و درمان عفونت های NTM یکی از چالش های مهم بهداشتی به شمار می رود زیرا اغلب با میکوباکتریوم توپرکلوزیس اشتباه گرفته می شوند. از آن جا که روند درمانی درسل با انواع آتیبیک فرق دارد تشخیص صحیح و به موقع آن ها به روند دارودرمانی و کاهش هزینه های وارد بر بیمار و کنترل بیماری سل کمک موثری می کند (۶ و ۷).

اگرچه امروزه در بسیاری از آزمایشگاهها تعیین هویت بر اساس بررسی ویژگی های فنوتیپیک و تست های بیوشیمیایی استوار است. اما به دلیل وقت گیر بودن، هزینه بالا و عدم شناسایی دقیق هویت گونه قابل اطمینان نمی باشند. امروزه روش های مختلف شامل بررسی الگوی اسیدهای چرب (۸)، بررسی پلی مورفیسم حاصل از هضم آنزیمی محصول (PRA) PCR ژنهایی مانند hsp65

در مرحله بعد در ۱۲۰۰۰ دور به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ کرده سپس محلول رویی را جدا و به عنوان DNA الگو مستقیماً در آزمایش PCR مورد استفاده قرار دادیم و یا در یخچال و ۲۰- درجه نگهداری کردیم (۲۴).

شناسایی مولکولی ایزوله های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از انواع غیر توبرکلوزیدی:

برای شناسایی مولکولی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از واکنش PCR مبتنی بر تکثیر قطعه ای به طول ۱۲۳ جفت باز از توالی IS6110 مورد استفاده گردید (۲۵). ایزوله های جدا شده مایکوباکتریومی شامل مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و انواع غیر توبرکلوزیدی با استفاده از یک جفت پرایمر اختصاصی

IS1 5'-CCTGCGAGCGTAGGCGTCGG-3'

IS2 5'-CTCGTCCAGCGCCGCTTCGG-3'

که شامل 20 µl reaction Component، Taq DNA polymerase 1U، Each:dNTP 250 µM، و KCL 30 mM و Mgcl2 1.5 mM و Tris- HCL(PH 9.0) 10 mM در حجم نهایی ۲۰ µl قطعه ای بطول ۱۲۳ جفت باز تکثیر گردید. برای تکثیر از ۳۷ سیکل شامل ۹۴ °C به مدت ۴۰ ثانیه و یک سیکل نهایی شامل ۷۲ °C به مدت ۱۰ دقیقه استفاده شد (۲۵). لازم به ذکر است از ژنوم سویه استاندارد H37Rv مایکوباکتریوم توبرکلوزیس نیز به عنوان کنترل مثبت استفاده شد (شکل ۱).

است که در گونه های متنوع مایکوباکتریایی مشترک می باشند (۱۹-۲۲).

در این مطالعه، ایزوله های مایکوباکتریومی جدا شده از آزمایشگاه مرکز سل دانشگاه علوم پزشکی کاشان با استفاده از بررسی ویژگی های فنوتیپیک و PRA مبتنی بر ژن 65hsp تا سطح گونه مورد شناسایی قرار گرفتند.

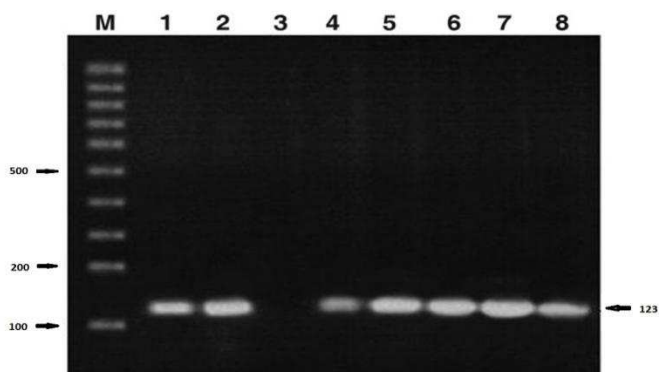
### روش بررسی

ایزوله های مایکوباکتریوم

در یک مطالعه توصیفی از تعداد ۱۲۶ بیمار سل مثبت مراجعه کننده به مرکز سل دانشگاه علوم پزشکی کاشان در طی سالهای ۹۰ تا ۹۴، تعداد ۱۰۶ ایزوله مایکوباکتریوم جدا سازی و وارد مطالعه حاضر شدند. این نمونه ها مجموعه متنوعی از نمونه های بالینی مانند خلط، مایع حاصل از شستشوی برانش، مایع پلورال، غده لنفاوی، مغز استخوان، بافت نرم، مایع نخاع، سینوویال و چرک بودند. تمامی این ایزوله ها به محیط کشت لونشتاین (Lowenstein-Jensen (LJ) تلقیح شدند. و به مدت ۸-۱۲ هفته در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. این نمونه ها پس از کشت توسط تست های بیوشیمیایی استاندارد از قبیل تست های تولید پیگمان، سرعت رشد، احیای نیترات، تولید آنزیم کاتالاز و اوره آز و رشد در دماهای مختلف شناسایی شدند (۲۳).

### استخراج DNA:

به طور کلی از روش جوشاندن استفاده شد. ۲-۳ کلنی از سطح محیط لونشتاین جانشون برداشته و در ۱۰۰ µl آب مقطر دوبار تقطیر سوسپانسیون کرده، سپس ۱۰۰ µl کلروفرم به آن افزوده و خوب مخلوط می کنیم. مخلوط حاصل را در ۸۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه کردیم.

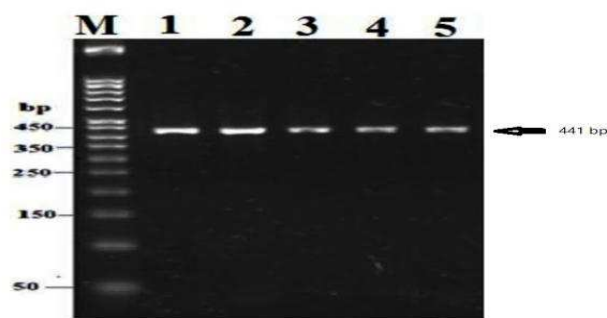


شکل ۱. الگوی حاصل از تکثیر PCR-RFLP  
 ستون M مارکر 100 bp و ستونهای ۲-۸ قطعات تکثیر شده 123 bp و ستون ۱ سوش استاندارد H37RV  
 ستون ۳ فاقد باند ۱۲۳ bp می باشد

که شامل Component 20 µl reaction Taq، DNA polymerase 1U، dNTP 250 µM، Tris- و Mgcl2 1.5 mM و KCL 30 mM و HCL(PH 9.0) 10 mM در حجم نهایی ۲۰ µl قطعه ای بطول ۴۴۱ جفت باز تکثیر شد. برای تکثیر از ۳۵ سیکل شامل ۹۴ °C به مدت ۴۰ ثانیه و ۶۵ °C به مدت ۴۰ ثانیه، ۷۲ °C به مدت ۱ دقیقه و یک سیکل نهایی شامل ۷۲ °C به مدت ۱۰ دقیقه استفاده گردید (شکل ۲).

شناسایی گونه های غیر توپر کلونیدی: شناسایی گونه ها با استفاده از روش استاندارد PRA مبتنی بر ژن hsp65 انجام گردید (۲۶). بطور خلاصه با استفاده از دو پرایمر

Tb11 5'-ACCAACGATGGTGTGTCCAT-3'  
 Tb12 5'-CTTGTCGAACCGCATAACCCT-3'



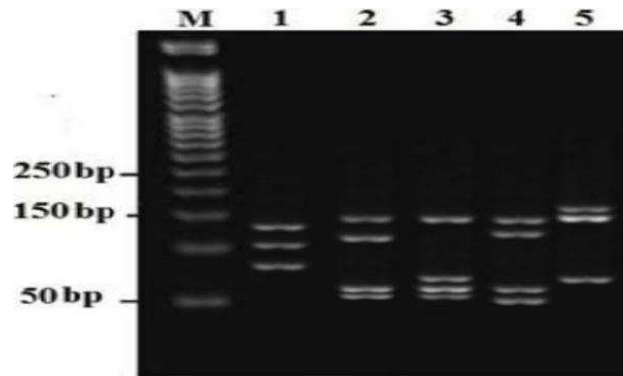
شکل ۲. الگوی حاصل از تکثیر ژن hsp65 به روش PCR  
 ستون M مارکر ۵۰ bp و ستون های ۲ تا ۵ قطعات تکثیر شده ۴۴۱ bp و ستون ۱ سوش استاندارد H37RV

سینازن) قرار گرفت و سپس الکتروفورز گردید. لازم به ذکر است در هر ژل محصول هضم آنزیمی سویه استاندارد H37RV مایکوباکتریوم توپر کلونیزس نیز به عنوان یک الگوی مشخص ( مارکر) الکتروفورز گردید تا در آنالیز

هضم آنزیمی: بعد از تأیید تکثیر قطعه مذکور با استفاده از الکتروفورز ۵µl محصول PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد، محصول PCR مربوط به هر ایزوله، مورد بررسی با استفاده از دو آنزیم BstEII و HaeIII (تهیه شده از شرکت

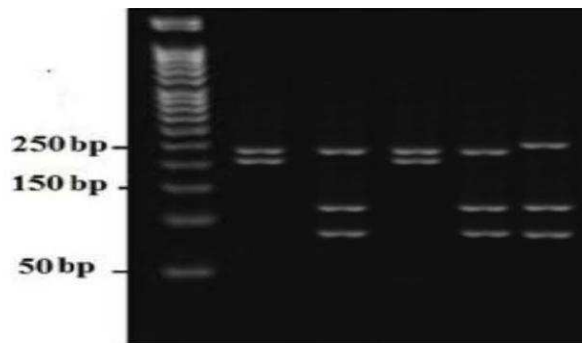
آدرس ( <http://app.chuv.ch/prasite> ) شناسایی گونه ها مورد بررسی قرار گرفت. (شکلهای ۳ و ۴ و جدول ۱). تعیین توالی: از بین ایزوله هایی که با تکنیک PCR مثبت تشخیص داده شد، برای تعیین توالی انتخاب و نسبت به وضعیت ترادف بازهای آلی موجود در آن اقدام شد.

اندازه قطعات مورد استفاده قرار گیرد. بعد از الکتروفورز، با استفاده از مارکر مولکولی و همچنین الگوی مشخص PRA سویه استاندارد H37Rv مایکوباکتریوم تورکلوزیس، اندازه قطعات هر ایزوله با استفاده از دو آنزیم محدودالایتر مورد بررسی به صورت چشمی تعیین و در نهایت با استفاده از الگوهای موجود در بانک اطلاعاتی به



شکل ۳. الگوی حاصل از هضم توسط آنزیم محدودالایتر HaeIII بر روی ژل آگارز ۲/۵٪.

1)- <i>Mycobacterium kansasii</i>	type 1	(130-105-80)
2)- <i>Mycobacterium fortuitum</i>	type 1	(145-120-60-55)
3)- <i>Mycobacterium abscessus</i>	type 1	(145-70-60-55)
4)- <i>Mycobacterium senegalense</i>	type 1	(140-125-60-50)
5)- H37RV		(160-145-72)



شکل ۴. الگوی حاصل از هضم توسط آنزیم محدودالایتر BstEII بر روی ژل آگارز ۲/۵٪.

1)- <i>Mycobacterium kansasii</i>	type 1	(235-210)
2)- <i>Mycobacterium fortuitum</i>	type 1	(235-120-85)
3)- <i>Mycobacterium abscessus</i>	type 1	(235-210)
4)- <i>Mycobacterium senegalense</i>	type 1	(235-120-85)
5)- H37RV		(250-120-82)

جدول ۱. نتایج حاصل از هضم، توسط آنزیم های BstEII و HaeIII در نمونه های مایکوباکتریوم آتیبیک مراجعه کننده به مرکز سل دانشگاه علوم پزشکی کاشان در سال ۹۴-۹۱.

گونه مایکوباکتریوم	باند های حاصل از هضم توسط آنزیم BstEII	باند های حاصل از هضم توسط آنزیم HaeIII
<i>Mycobacterium kansasii</i>	2 Band (235-210 )	3 Band (130-105-80 )
<i>Mycobacterium fortuitu</i>	3 Band (235-120-85 )	4 Band (145-120-60-55 )
<i>Mycobacterium abscessus</i>	2 Band (235-210 )	4 Band (145-70-60-55 )
<i>Mycobacterium senegalense</i>	3 Band (235-120-85 )	4 Band (140-125-60-50 )
H37RV سویه استاندارد	3 Band (250-120-82 )	3 Band (160-145-72 )

### یافته ها

از تعداد ۱۲۶ بیمار سل مثبت در طی سالهای ۹۰ تا ۹۴، تعداد ۱۰۶ ایزوله مایکوباکتریوم جدا گردید که از این تعداد بر اساس تست های بیوشیمیایی و آزمایش PCR قطعه ۱۲۳ جفت بازی توالی IS6110، تعداد ۱۰۲ نمونه به عنوان مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و ۴ نمونه به عنوان مایکوباکتریوم غیر توبرکلوزیس تشخیص داده شدند. همه ۱۰۲ ایزوله مایکوباکتریوم توبرکلوزیس جدا شده در این مطالعه، بر اساس PRA مبتنی بر ژن HSP65 الگوی مشخص و قابل تمایز از سایر مایکوباکتریوم ها تولید نمودند. و (۳/۸٪) ۴ نمونه خلط مربوط به مایکوباکتریوم های غیر توبرکلوزیس بودند. که شامل یک نمونه *M. abscessus*، یک نمونه *M. senegalense*، یک نمونه *M. fortuitum* و یک نمونه *M. kansasii* بودند که هر چهار مورد مربوط به نمونه های خلط بودند.

### بحث

اگر چه گونه های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس عامل اصلی بیماریهای ریوی در انسان شناخته شده اند، اما امروزه بسیاری از محققین قدرت بیماریزایی مایکوباکتریوم های آتیبیک را کمتر از این دسته نمی دانند (۲۷). در مطالعه ای که در سال ۱۹۰۸ توسط Duvall صورت گرفت، پتانسیل بیماریزایی در مایکوباکتریوم های محیطی برای

اولین بار مطرح شد و امروزه بیش از یک سوم مایکوباکتریوم آتیبیک، با بیماریهای انسانی مرتبط هستند. مقاوم بودن این دسته از مایکوباکتریوم ها به اکثر داروهای ضد سلی و انتشار وسیع آنها در طبیعت، اهمیت مطالعه روی این دسته از باکتری ها را بیشتر کرده است (۲۸). مطالعات بسیار وسیع انجام شده در ۱۴ کشور و با بررسی بیش از ۳۶۰۰۰ سویه جدا شده NTM، نشان داده شده که گونه های NTM روز به روز بیشتر از نمونه های بالینی به عنوان عامل بیماری جدا می شوند و نوع گونه های مختلف از کشوری به کشور دیگر، سال به سال حتی از بخش های مختلف جغرافیایی یک کشور متفاوت است (۳۰ و ۲۹). در بررسی انجام شده در تهران در بین ۶۳ سویه NTM بیش ترین گونه جدا شده *Mycobacterium fortuitum* و بعد از آن *Mycobacterium kansasii* بوده است (۳۰). در مطالعه ای دیگر در کشور چین، از ۲۳٪ باسیلهای اسید فاست تشخیص داده شده، ۵٪ موارد را سویه های NTM تشکیل داده است که بیشترین گونه ایزوله شده *Mycobacterium chelonae* بوده است (۳۱).

همه کارشناسان دنیا در سال ۱۹۸۲ معتقد بودند که بیماری سل تا سال ۲۰۰۰، کنترل و بحث آن به کتب پزشکی محدود می شود، چند سالی طول نکشید. تا در سال ۱۹۹۳، بیماری سل از سوی سازمان بهداشت جهانی به عنوان فوریت جهانی اعلام گردید (۳۲). تاکنون سه اپیدمی جهانی

مایکوباکتریوم وجود دارد که از میان این روش‌ها، روش PRA مبتنی بر ژن hsp65 یکی از کاربردی‌ترین و رایج‌ترین روش‌ها می‌باشد که در مقایسه با روش‌های مولکولی دیگر علاوه بر سرعت بالا بسیار کم هزینه است (۳۷). و هم اینکه امکان شناسایی گونه با استفاده از الگوی موجود در بانک اطلاعاتی با آدرس <http://app.chuv.ch/prasite> نیز وجود دارد.

در مطالعه‌ای که در سال ۱۹۹۳ توسط Telenti انجام شد از روش TB PRA با استفاده از دو آنزیم BstEII و HaeIII برای تمایز ۳۳۰ گونه مایکوباکتریوم استفاده شد. این روش توانست تمام گونه‌های مورد مطالعه را با حساسیتی برابر ۱۰۰٪ شناسایی کند (۳۸). در مطالعه دیگری که توسط Taylor در سال ۱۹۹۷ صورت گرفت، از ۱۰۳ نمونه مورد بررسی ۱۰۰ نمونه با روش TB PRA شناسایی شد، اما ۳ نمونه بصورت ناشناخته باقی ماند. که در این مطالعه حساسیت رزش TB PRA، ۹۷٪ گزارش شد (۳۹). 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 (۴۰).

در این مطالعه روش TB PRA با به کارگیری دو آنزیم BstEII و HaeIII توانست هر ۴ ایزوله مایکوباکتریوم آتپیک را در حد گونه با حساسیتی برابر ۱۰۰٪ شناسایی نماید.

### نتیجه‌گیری

بر اساس مطالعات صورت گرفته، بعضی از گونه‌های مایکوباکتریوم‌های غیر توبرکلوزیس پاتوژن انسان بوده و یا قادر به ایجاد بیماری در افراد با نقص سیستم ایمنی می‌باشند. که در صورت عدم شناسایی صحیح می‌توانند به عنوان یکی از مشکلات بیمارستانی، مطرح بوده و یا تهدید کننده حیات در افراد با نقص سیستم ایمنی باشند. بنابر این لازم است که روش‌های استاندارد تشخیصی جهت شناسایی

در رابطه با سل اتفاق افتاده است. یکی، بازگشت مجدد بیماری سل که ناشی از کاهش توجه و رعایت نکردن بهداشت در رابطه با کنترل بیماری بود. یکی، همراهی عفونت HIV و بیماری سل بود و یکی هم گسترش سل مقاوم به دارو، که از همه خطرناکتر است (۳۳). مقاوم بودن مایوباکتریوم‌های آتپیک به اکثر داروهای ضد سل متداول و انتشار وسیع آن، جهان را در آستانه روبرو شدن با یک اپیدمی دیگر قرار داده است. و لذا تشخیص سریع این دسته و به دنبال آن درمان مناسب و به موقع مایکوباکتریوم‌های آتپیک از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (۳۴).

شناسایی ایزوله‌های بالینی مایکوباکتریوم بسیار پیچیده است. اگر چه غالب ایزوله‌های جدا شده از نمونه‌های بالینی به ویژه در کشورهایی مانند ایران که بیماری سل آندمیک است، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می‌باشد. ولیکن تعداد اندکی آزمایشگاه توانایی انجام تست‌های بیوشیمیایی و مولکولی برای شناسایی عامل عفونی فوق را دارند. از طرفی با وجود شناسایی مایکوباکتریوم‌های NTM در تعدادی از آزمایشگاه‌های تخصصی، اما شناسایی گونه انجام نمی‌گردد این در حالی است که در بسیاری از موارد عفونت با مایکوباکتریوم غیر سلی نوع درمان و طول درمان کاملاً بستگی به هویت گونه دارد (۳۵). در مطالعه کنونی اگر چه شناسایی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به هردوروش فنوتیپی (استفاده از تست‌های بیوشیمیایی مثل تست نیاسین، نیترات و کاتالاز) و مولکولی (استفاده از PCR قطعه‌ای به طول ۱۲۳ جفت باز توالی IS6110 با پرایمر اختصاصی) با حساسیت بالا امکان پذیر است، ولیکن شناسایی گونه‌های مایکوباکتریوم غیر توبرکلوزیس با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی، علاوه بر وقت گیر بودن و داشتن هزینه بالا، تفسیر آن اغلب پیچیده بوده و فاقد توانمندی لازم جهت شناسایی دقیق گونه می‌باشد. چرا که بسیاری از گونه‌ها دارای فعالیت آنزیمی مشابه و یا در مواردی غیر فعال می‌باشند (۳۶). روش‌های مولکولی متعددی برای شناسایی گونه‌های مختلف



کاهش زمان تشخیص کمک شایانی به تشخیص، درمان و کنترل صحیح بیماری سل می نماید.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از همکاری اساتید محترم گروه میکروب شناسی دانشگاه علوم پزشکی کاشان و همچنین از کارشناسان مرکز سل مسلم ابن عقیل دانشگاه علوم پزشکی کاشان سرکار خانم عبدشاه جهت مساعدت در تمامی مراحل این پروژه تشکر و قدردانی می نمایند.

و بررسی مقاومت دارویی عوامل مایکوباکتریایی به کار گرفته شوند. تا با تشخیص صحیح و به موقع، ضمن درمان مناسب، از تجویز بی رویه دارو و بروز سویه های با مقاومت چند دارویی جلوگیری به عمل آید. در مطالعه حاضر نشان داده شده، چنانچه روش PRA مبتنی بر ژن hsp65 مستقیماً بر روی نمونه های بالینی مورد استفاده قرار گیرد با پیشگیری از اشتباهات احتمالی در تعیین گونه و همچنین

### Reference

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. Hartmans S, Bont AM. The genus mycobacterium nonmedical in the prokaryotes. Dwrkin M, editor. New York: Springer; 2006. p. 889-918.
4. Andréjak C, Lescure FX, Douadi Y, Laurans G, Smail A, Duhaut P, et al. Non tuberculous mycobacteria pulmonary infection: management and follow-up of 31 infected patients. *J Infect* 2007; 55:34-40.
5. AL-Mahruqi SH, Van-Ingen J, AL-Busaidy S, Boeree MJ, Al-Zadjali S, Patel A, et al. Clinical relevance of non tuberculous mycobacteria, Oman. *Emerg Infect Dis* 2009; 15: 292-4.
6. Chris A. Gentry, Pharm D. Atypical Mycobacterium, microbiological book, 5th edition. 2010:99-119.4. Falkinham JO. Epidemiology of Mycobacterium avium infections in the pre- and post-HIV era. *Res Microbiol* 1994; 145:169– 172.
7. Falkinham JO. Epidemiology of Mycobacterium avium infections in the pre- and post-HIV era. *Res Microbiol* 1994; 145:169– 172.
8. Garza-Gonzalez E, Guerrero-Olazarán M, Tijerina-Menchaca R, Viader-Salvado JM. Identification of mycobacteria by mycolic acid pattern. *Arch Med Res* 1998;29:303-306.
9. 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.
10. 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 mycobacteria in hospital tap water. *Microbiol* 2008;46:608-614.
11. Roth A, Reischl U, Streubel A, Naumann L, Kroppenstedt RM, Habicht M, and et al. 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.
12. Kim H, Kim SH, Shimn TS, Kim MN, Bai GH, Park YG, and et al. Differentiation of Mycobacterium species by analysis of the heat-shock protein 65 gene (hsp65). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2005; 55: 1649–1656.

13. Adékambi T, Colson P, Drancourt M. rpoB-based identification of nonpigmented and late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. *J Clin Microbiol* 2003;41:5699-5708.
14. Devulder G, Pérouse de Montclos M, Flandrois JP. A multigene approach to phylogenetic analysis using the genus *Mycobacterium* as a model. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2005; 55: 293–302.
15. Yamada-Noda M, Ohkusu K, Hata H, Shah MM, Nhung PH, Sun XS, and et al. *Mycobacterium* species identification, a new approach via DnaJ gene sequencing. *Syst Appl Microbiol* 2007;30:453-462.
16. Sajduda A, Martin A, Portaels F, Palomino JC. hsp65 PCR-restriction analysis (PRA) with capillary electrophoresis in comparison to three other methods for identification of *Mycobacterium* species. *IJID* 2012; 16 :193–197.
17. Taylor T.B, Patterson C, Hale Y, Safranek WW. Routine use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis for identification of mycobacteria growing in liquid media. *J Clin Microbiol* 1997; 35:79– 85.
18. Kim a H, Kim S, Shim T, Kim M, Bai G. PCR restriction fragment length polymorphism analysis (PRA)-algorithm targeting 644 bp heat shock protein 65(hsp65) gene for differentiation of *Mycobacterium* spp. *Microbiological Methods* 2005; 62:199-209.
19. Brunello F, Ligozzi M, Cristelli E, Bonora S, Tortoli E, Fontana R. Identification of 54 mycobacterial species by PCR-Restriction fragment length polymorphism analysis of the hsp65 gene. *J Clin Microbiol* 2001; 39:2799-806.
20. Silva C, Ueki S, Geiger D, Leao S. hsp65 PCR-restriction enzyme analysis (PRA) for identification of mycobacteria in the clinical laboratory. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2001; 43:25-8.
21. Steingrube VA, Gibson JL, Brown BA, Zhang Y, Wilson RW, Rajagopalan M, Wallace JR. PCR amplification and restriction endonuclease analysis of a 65-kilodalton heat shock protein gene sequence for taxonomic separation of rapidly growing mycobacteria. *J Clin Microbiol* 1995; 33:149– 153.
22. Eriks IS, Munck KT, Besser TE, Cantor GH, Kapur V. Rapid differentiation of *Mycobacterium avium* and *M. paratuberculosis* by PCR and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 734– 737.
23. 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.
24. Khosravi A, Dezfulian A, Alavi SM. Detection of isoniazid and rifampin resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolated from tuberculosis patients using conventional method and PCR. *Pak J Med Sci* January 2006; 4( 22) :47-50.
25. 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.
26. 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.
27. Katoch VM. Infection due to non-tuberculous mycobacteria. *Indian J Med Res* 2004; 120:290-304.
28. Sriyabhaya N, Wonswatana S. Pulmonary infection caused by atypical mycobacteria: a report of 24 cases in Thailand. *Rev Infect Dis* 1981;3:1085-1089.

29. Field SK, Cowie RL. Lung disease due to the more common nontuberculous mycobacteria. *Chest* 2006;129:1653-72.
30. Simons S, van Ingen J, Hsueh PR, Van Hung N, Dekhuijzen PN, Boeree MJ, et al. Nontuberculous mycobacteria in respiratory tract infections eastern Asia. *Emerg Infect Dis* 2011;17: 334-49.
31. Wang HX, Yue J, Han M, Yang JH, Gao RL, Jing LJ, et al. Nontuberculous mycobacteria: susceptibility pattern and prevalence rate in Shanghai from 2005 to 2008. *Chin Med J* 2010 ; 123:184-7.
32. Wallace RJ Jr, Glassroth J, Griffith DE, Olivier KN, Cook JL, Gordin F. Diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculous mycobacteria. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156:Suppl:S1-S25.
33. World Health Organization. WHO/IUATLD global project to anti-tuberculosis drug resistance surveillance 2000. WHO. Geneva, Switzerland; WHO, 278, 2000
34. Sriyabhaya N, Wonswatana S. Pulmonary infection caused by atypical mycobacteria: a report of 24 cases in Thailand. *Rev Infect Dis* 1981;3:1085-89.
35. Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, and et al. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 15:367-416.
36. 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.
37. 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.
38. Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Bottger EC, Bodmer T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol* 1993;31:175-78.
39. Taylor TB, Patterson C, Hale Y, Safranek WW. Routine use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis for identification of mycobacteria growing in liquid media. *J Clin Microbiol* 1997;35:79-85.
40. Chimara E, Ferrazoli L, Ueky SY, Suely Y, Martins M C, Durham Alan M and 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.