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

Zilaee M.R., BS[1], Firoozeh F., PhD[2], Moniri R., PhD[3], Sehat M., PhD[4], Zahedi Bidgoli Z., BS[5]
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 (o.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

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-05]

[DOI: 10.22102/20.5.52]

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان / دوره بیست و یکم / آذر و دی ۵۹/۱۳۹۵-۵۰

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

محمد رضا ذیلایی[۱]، فرزانه فیروزه[۲]، رضوان منیری[۳]، مجتبی صحت[۴]، زهرا زاهدی بیدگلی[۵]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب شناسی دانشگاه علوم پزشکی کاشان ، (مولف مسئول)، تلفن ثابت: ۰۳۱-۵۵۳۱۸۸۵۵، mohammadrezazilaee@gmail.com

۲. استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان.

۳. استاد گروه میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان.

۴. استادیار گروه اپیدمیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان.

۵. دانشجو، دانشگاه 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 برییماریزایی در دستگاه تنفس، از قدرت بیماریزایی درغدد لنفاوی، پوست، بافت نرم، استخوان ها برخوردار است. تعیین هویت مایکوباکتریاها بر اساس کشت و تستهای بیوشیمیایی هفته ها طول میکشد و درتشخیص قطعی به ما کمک نمی کند. تکنیک(PCR-RFLP (PRA از ژن hsp65 بااستفاده 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 Heat Shock Protein 65 (hsp65) 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، (۳/۸٪) ۴ 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 مستقیما 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

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-05]

[DOI: 10.22102/20.5.52]

مقدمه

علاوه بر مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس و مایکوباکتریوم لپرا که در گروه پاتوژن های اصلی انسانی و حیوانی به حساب می آیند، گونه های دیگر مایکوباکتریوم Mycobacterium Other Than Tuberculosis (MOTT) یا Non Tuberculosis Mycobacterium(NTM) به عنوان پاتوژنهای فرصت طلب شناخته می شوند (۱). بر اساس مطالعات اخیر، این دسته ازمایکوباکتریوم ها قادرند انواع مختلفی از بیماریهای انسانی را در ریه، پوست، کلیه، مغزو سایر نقاط بدن ایجاد کنند (۲). تعداد مایکوباکتریوم آتیپیک 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 ایزونیازید، ریفامپین، استرپتومایسین، 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 مایکوباکتریوم توبرکلوزیس اشتباه گرفته می شوند. از آن جا که روند درمانی درسل با انواع آتیپیک فرق دارد تشخیص صحیح و به موقع آن ها به روند دارودرمانی و کاهش هزینه های وارد بر بیماروکنترل بیماری سل کمک موثری می کند (۷ و ۶).

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 PCR (PRA) ژنهایی مانند hsp65 (۹) و rpoB (۱۰) و internal transcribed spacer 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 مایکوباکتریوم ها، بانک اطلاعاتی، غالب گونه های شناخته شده مایکوباکتریوم 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 مایکوباکتریومی 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 PCRتحت 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 توبرکلوزی 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 مایکوباکتریایی وجود دارد و شامل اپی توپ هایی

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-05]

[DOI: 10.22102/20.5.52]

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

در این مطالعه، ایزوله های مایکوباکتریومی جدا شده ازآزمایشگاه 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 ازتعداد 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 ۱۲-۸ 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 جانسون برداشته و در ۱۰۰µl آب مقطر دوبار تقطیر سوسپانسیون کرده، سپس ۱۰۰µl کلروفرم به آن افزوده و خوب مخلوط می کنیم. مخلوط حاصل را در ۸۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه کردیم. در مرحله بعد در ۱۲۰۰۰ دور به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ کرده سپس محلول رویی را جدا و به عنوان DNA الگو مستقیما درآزمایش PCR مورد استفاده قرار دادیم و یا در یخچال و ۲۰ -درجه نگهداری کردیم (۲۴).

شناسایی مولکولی ایزوله های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از انواع غیر توبرکلوئیدی:

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 توبرکلوئیدی با استفاده از یک جفت پرایمر اختصاصی

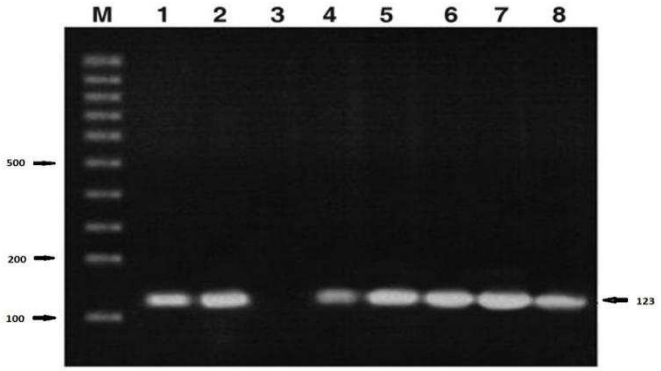
´IS1 5-CCTGCGAGCGTAGGCGTCGG-3´

´IS2 5-CTCGTCCAGCGCCGCTTCGG-3´

که شامل Component 20 µl reaction، 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 نهای 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 استفاده شد (شکل ۱).

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-05]

[DOI: 10.22102/20.5.52]



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

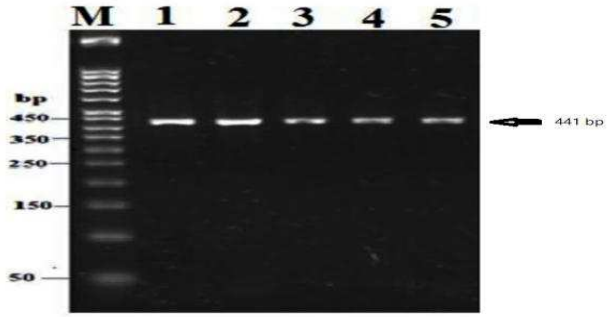
شناسایی گونه های غیر توبرکلوئیدی:

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´-CTTGTCGAACCGCATACCCT-3´

که شامل Component 20 µl reaction، 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 نهای 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 (۲۶) (شکل ۲).



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

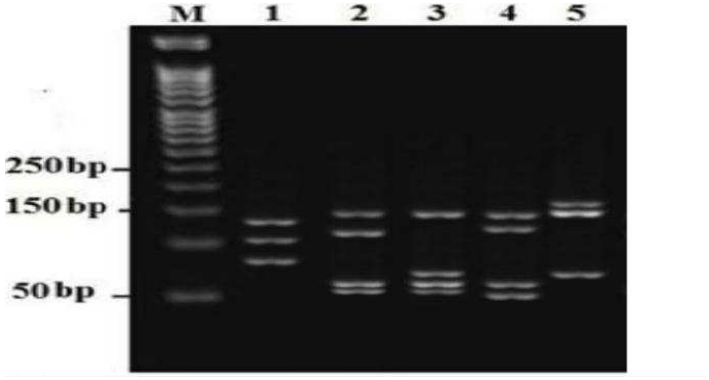
هضم آنزیمی: بعد از تأیید تکثیر قطعه مذکور با استفاده از الکتروفورز ۵µl محصول PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد، محصول PCR مربوط به هر ایزوله، مورد بررسی با استفاده از دو آنزیم BstEII و HaeIII (تهیه شده از شرکت سیناژن) قرار گرفت و سپس الکتروفرز گردید. لازم به ذکر است در هر ژل محصول هضم آنزیمی سویه استاندارد H37Rv مایکوباکتریوم توبرکلوزیس نیز به عنوان یک الگوی مشخص (مارکر) الکتروفورز گردید تا در آنالیز

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-05]

[DOI: 10.22102/20.5.52]

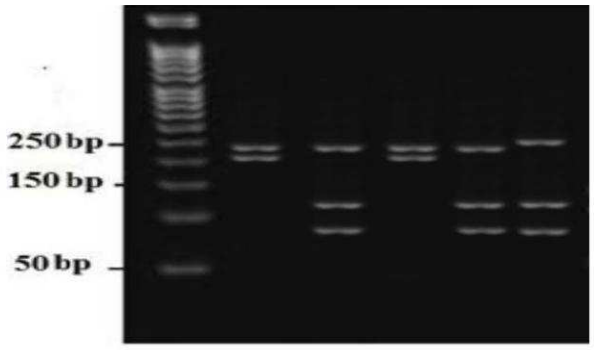
اندازه قطعات مورد استفاده قرار گیرد. بعد از الکتروفورز، با استفاده از مارکر مولکولی و همچنین الگوی مشخص PRA سویه استاندارد H37Rv مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، اندازه قطعات هر ایزوله با استفاده از دو آنزیم محدودالاثر مورد بررسی به صورت چشمی تعیین و در نهایت با استفاده از الگوهای موجود در بانک اطلاعاتی به آدرس (http://app.chuv.ch/prasite) شناسایی گونه ها مورد بررسی قرار گرفت. (شکلهای ۳ و ۴ وجدول 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.



شکل ۳. الگوی حاصل ازهضم توسط آنزیم محدودالاثر HaeIII بر روی ژل آگارز ۲/۵٪.

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



شکل ۴. الگوی حاصل ازهضم توسط آنزیم محدودالاثر BstEII بر روی ژل آگارز ۲/۵٪ .

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

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-05]

[DOI: 10.22102/20.5.52]

جدول ۱. نتایج حاصل از هضم، توسط آنزیم های BstEII و HaeIII در نمونه های مایکوباکتریوم آتیپیک 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
Mycobacterium kansasii	2 Band (235-210)	3 Band (130-105-80)
Mycobacterium fortuitu	3 Band (235-120-85)	4 Band (145-120-60-55)
Mycobacterium abscessus	2 Band (235-210)	4 Band (145-70-60-55)
Mycobacterium senegalense	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

ازتعداد ۱۲۶ بیمار سل مثبت در طی سالهای ۹۰ تا ۹۴، تعداد ۱۰۶ ایزوله مایکوباکتریوم جدا گردید که از این تعداد بر اساس تست های بیوشیمایی 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 آتیپک 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 آتیپیک، 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

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-05]

[DOI: 10.22102/20.5.52]

در رابطه باسل 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 مایوباکتریوم های آتیپیک به اکثر داروهای ضد سلی 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 مایکوباکتریوم های آتیپیک از اهمیت ویژه ای برخوردار است (۳۴).

شناسایی ایزوله های بالینی مایکوباکتریوم بسیار پیچیده است. اگر چه غالب ایزوله های جدا شده از نمونه های بالینی به ویژه در کشورهایی مانند ایران که بیماری سل آندمیک است، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می باشد. ولیکن تعداد اندکی آزمایشگاه توانایی انجام تست های بیوشیمیایی و مولکولی برای شناسایی عامل عفونی فوق را دارند. از طرفی با وجود شناسایی مایکوباکتریوم های NTM در تعدادی از آزمایشگاههای تخصصی، اما شناسایی گونه انجام نمی گردد این در حالی است که در بسیاری از موارد عفونت با مایکوباکتریوم غیر سلی نوع درمان و طول درمان کاملا بستگی به هویت گونه دارد (۳۵). در مطالعه کنونی اگر چه شناسایی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به هردوروش فنوتیپی (استفاده از تست های بیوشیمیایی مثل تست نیاسین، نیترات و کاتالاز) ومولکولی (استفاده از PCR قطعه ای به طول ۱۲۳ جفت باز توالی IS6110 با پرایمر اختصاصی) با حساسیت بالا امکان پذیر است، ولیکن شناسایی گونه های مایکوباکتریوم غیر توبرکلوزیس با استفاده از تست های بیوشیمیایی، علاوه بر وقت گیر بودن و داشتن هزینه بالا، تفسیر آن اغلب پیچیده بوده و فاقد توانمندی لازم جهت شناسایی دقیق گونه می باشد. چرا که بسیاری از گونه ها دارای فعالیت آنزیمی مشابه و یا در مواردی غیر فعال می باشند (۳۶). روش های مولکولی متعددی برای شناسایی گونه های مختلف مایکوباکتریوم وجود دارد که از میان این روش ها، روش PRA مبتنی بر ژن hsp65 یکی از کاربردی ترین و رایج ترین روش ها می باشد که در مقایسه با روش های 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 مطالعه ای 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 گونه های 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 گونه ای و زیر گونه ای مورد شناسایی قرار دهند (۴۰).

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

نتیجه گیری

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

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-05]

[DOI: 10.22102/20.5.52]

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 مستقیما بر روی نمونه های بالینی مورد استفاده قرار گیرد با پیشگیری از اشتباهات احتمالی در تعیین گونه و همچنین 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.

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. Emery 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-Olazaran 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.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-05]

[DOI: 10.22102/20.5.52]

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. TaylorT.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 differention 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 ofIsoniazid 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.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-05]

[DOI: 10.22102/20.5.52]

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.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-05]

[DOI: 10.22102/20.5.52]