تعیین فراوانی مایکوباکتریوم های غیر توبرکلوزی با استفاده از روش PCR restriction fragment length polymorphism analysis (PRA)

آزاده نهاوندی عراقی[۱]، مهناز سیفی[۲] ، مهروز دزفولیان[۳]، اسماعیل جبارزاده[۴]*

۱- گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج
۲- متخصص میکروب شناسی، استادیار، انستیتوپاستور ایران، بخش سل وتحقیقات ریوی
۳- استادیار- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج
۴- دکترای علوم آزمایشگاهی، استاد انستیتوپاستور ایران، بخش سل وتحقیقات ریوی

* **نشانی برای مکاتبه:** تهران، خیابان پاستور، انستیتوپاستور ایران گروه باکتری شناسی،تلفن و نمابر: ۶۶۹۶۸۸۵۳ ، ismail.jabbary@yahoo.com
دریافت مقاله: بهمن نود و یک پذیرش برای چاپ: تیر نود و دو

چکیده

سابقه و هدف: *میکوباکتریوم های آتیپیک در ایجاد عفونت های مختلفی دخالت داشته که برخی از آن ها بیماری مشابه سل ایجاد می کنند. روش های درمانی درسل با عفونت های ناشی از گونه های آتیپیک بسیار متفاوت بوده و به همین جهت افتراق گونه ای صحیح و سریع اهمیت خاصی در کنترل بیماری سل دارد. PRA یک روش افتراق گونه ای دقیق بوده و نسبت به روش های فنوتیپی از دقت و سرعت بالاتری برخوردار است. در این مطالعه با استفاده از ۳ آنزیم محدودالاثر و هضم محصولPCR ۶۴۴ جفت بازی از ژن hsp65 در بین ۵۰ ایزوله مختلف مایکوباکتریایی تعیین گونه آنها انجام شد.*

روش کار: *کلیه۵۰ ایزوله میکوباکتریوم آتیپیک جدا شده از مراجعه کنندگان به بخش سل و تحقیقات ریوی انستیتو پاستور ایران طی سال‌های ۸۹ و ۹۰ جهت تعیین هویت با روش PRA مورد آزمایش قرار گرفتند. ابتدا قطعه ی bp ۶۴۴ از ژن hsp65 با روش PCR تکثیر شد. سپس محصولات PCR با آنزیم‌های AvaII، HphI وHpaII مورد هضم قرار گرفته والگوی هضمی آنها با استفاده از الگوریتم استانداردو نرم افزار GelcomparII مقایسه و تعیین هویت شدند..*

یافته ها: *با بررسی الگوهای PRA از مجموع ۵۰ سویه میکوباکتریایی ۴۹ سویه میکوباکتریوم آتیپیک در قالب ۱۳ گونه ی شناسایی شدند که شامل ۱۵ میکوباکتریوم فورتوئیتوم، ۱۲ میکوباکتریوم سیمیه، ۶ میکوباکتریوم کانزاسی، ۳ میکوباکتریوم زولگایی، میکوباکتریوم تریویاله، میکوباکتریوم گوردونه ای، میکوباکتریوم آیچیئنس، میکوباکتریوم گالیناروم(هرکدام ۲ سویه)، میکوباکتریوم هسیاکوم، میکوباکتریوم مالموئنس، میکوباکتریوم آئوروم، میکوباکتریوم مارینوم، مایکوباکتریوم ابسسوس (هرکدام یک سویه) بودندو یک گونه شناسایی نشد.*

نتیجه گیری :*روش PRA با استفاده از آنزیم‌هایAvaII ، HphI وHpaII یک روش ساده، سریع و دقیق برای گروه بندی کلی ایزوله های مایکوباکتریوم های آتیپیک از TB و شناسایی آن ها در سطح گونه و حتی زیرگونه است و با کاهش زمان تشخیص گونه های آتیپیک از مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و تشخیص دقیق آن ها می تواند در برنامه های کنترل و مراقبت بیماری سل نقش موثری داشته باشد.*

واژگان کلیدی : *تشخیص افتراقی- مایکوباکتریوم های آتیپیک- PRA*

مقدمه

جنس مایکوباکتریوم ، که باسیل های کندرشد و اسید فست هستند، شامل بیش از ۱۰۰ گونه است که برخی پاتوژن انسان یا حیوان بوده و برخی ساپروفیت هستند. بیماری های ایجاد شده توسط گونه های جنس مایکوباکتریوم یکی از منابع اصلی مرگ و میر به ویژه در کشورهای در حال توسعه و مناطق گرمسیر به شمار می آیند. علاوه بر این ظهور و شدت عفونت با مایکوباکتریوم به ویژه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و مایکوباکتریوم بوویس به علت حساسیت افراد مبتلا به HIV در حال افزایش است. از اوایل دهه ی ۱۹۸۰ شمار بیماری های ناشی از مایکوباکتریوم های غیر توبرکلوزیس (NTM) افزایش یافته است(۲و۱). مایکوباکتریوم های آتیپیک در مورد افرادی با ایمنی سرکوب شده و افراد مبتلا به ویروس نقص سیستم ایمنی، حائز اهمیت هستند. 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(۴و۳).

تشخیص ایزوله های کلینیکی مایکوباکتریوم در سطح گونه ای در ابتدا توسط مشخصه های کشت و تست های بیوشیمیایی تشخیص داده می شوند. این تست ها به بیش از چند هفته زمان نیاز دارند و ممکن است در نهایت به یک تمایز معتبر منتج نگردند. تفسیر این تست ها پیچیده و زمان بر است و اغلب توسط مایکوباکتریوم های کندرشد به تعویق می افتند. روش های دیگری مثل تکنیک های کروماتوگرافی و انالیز سکانس های DNA در ناحیه ی ژن s ۱۶rRNAمی توانند مایکوباکتریوم را در سطح گونه متمایز کنند. اما این روش ها دشوار بوده و برای کار روتین آزمایشگاه های تشخیصی مناسب نیستند(۵). روش های ژنوتایپینگ ساده مثل AccoProbe و INNO-LiPA برای تمایز مایکوباکتریا به صورت تجاری در دسترس هستند. گرچه این تست ها ساده هستند اما اغلب برای حجم های ازمایشی کوچک استفاده شده و برای کاربرد روتین در تشخیص های کلینیکی مقرون به صرفه نمی باشند(۶و۷).

روش PCR restriction fragment length polymorphism analysis (PRA) از آن جایی که یک تکنیک آسان، سریع و کم هزینه برای شناسایی گونه های مایکوباکتریوم به حساب می آید و در تمام آزمایشگاه های ساده و معمولی نیز قابل اجرا است بر روش های دیگر ارجحیت دارد. در مایکوباکتریوم ها این تکنیک برای چندین ژن مانند 16S ribosomal DNA (rDNA)، hsp65، dnaJ، gap، sodA و rpoB به کار گرفته شده است(۱۶-۸). 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 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 توبرکلوزی از روش PRA با هدف قرار دادن یک قطعه ۶۴۴ جفت بازی در بخش پروتئین شوک حرارتی (hsp65) براساس مطالعه Kim و هم کاران(۱۸) استفاده شده است. ژن hsp65 که یک پروتئین ۶۵ کیلودالتونی را کد می کند که در تمام گونه های مایکوباکتریایی وجود دارد و شامل اپی توپ هایی است که در گونه های متنوع مایکوباکتریایی مشترک می باشند(۲۲-۱۹).

روش کار

کلیه ایزوله های کلینیکی مایکوباکتریوم آتیپیک، مشتمل بر ۵۰ سویه که از میان نمونه های ارجاع داده شده به بخش سل و تحقیقات ریوی انستیتو پاستور ایران در طی سال‌های ۸۹ و ۹۰ شناسایی شده بودند، در این مطالعه استفاده شدند. تشخیص اولیه نمونه ها پس از مشاهده میکروسکوپی باسیل های اسید فست در نمونه های رنگ شده با روش Ziehl Neelsen(ZN) انجام شد. سپس نمونه ها روی محیط کشت Lowenstein-Jensen (LJ) حاوی گلیسرول و پیرووات برده شد و به مدت ۸-۱۲ هفته در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. این نمونه ها پس از کشت توسط تست های بیوشیمیایی استاندارد از قبیل تست های نیترات و نیاسین، کاتالاز۲۲ و کاتالاز۶۸ ، رنگ پیگمان و مشخصه های رشد شناسایی شده بودند. حساسیت آنتی بیوتیکی سویه های مایکو باکتریوم توبرکلوزیس نیز بااستفاده ازروش های استاندارد نسبت به آنتی بیوتیک های ریفامپین(۴۰µg/ml)،ایزونیازید(۰/۲µg/ml) ،استرپتومایسین(۴µg/ml)،اتامبوتول(۲µg/ml) ،کاناماسین (۲۰µg/ml)واتیوناماید(۲۰µg/ml)سنجیده شد(۲۴و۲۳).

برای استخراج DNA کروموزومی کلیه سویه ها از کیت Roche استفاده شد. به طور خلاصه برای تخریب دیواره سلولی مایکوباکتریوم از بایندینگ بافر استفاده کرده و برای هضم پروتئین ها پروتئیناز K افزوده شد. سپس با استفاده از ایزوپروپانول حلالیت DNA را کم کرده تا از خلل و فرج فیلتر عبور ننماید. فیلتر حاوی سیلیکاژل بوده که با بار مثبت خود DNA دارای بار منفی را جذب می کند. در مرحله بعد به کمک removal inhibitor بقیه ی ترکیبات سلولی و پروتئین هارا حذف کرده، پس از دوبار شستشو با washing buffer، الوشن بافر اضافه گردید که سبب آزادسازی DNA کروموزومی می شود. برای تکثیر PCR از قطعه ۶۴۴ جفت بازی ژن hsp65 از پرایمرهای اختصاصی Forward primer HSPF3 (5' –ATC GCC AAG GAG ATC GAG CT -3') و Reverse primer HSPR4 (5'-AAG GTG CCG CGG ATC TTG TT -3') استفاده شد تا قطعه ۶۴۴ جفت بازی از hsp65 را در کلیه سویه های مایکوباکتریایی مورد بررسی، تکثیر کند. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیترانجام شد و ترکیب آن شامل: 2.5 µl PCR buffer(10X)، 0.4 µl dNTP (1.2 mM)، 0.8 µl $Mgcl_2$(50 mM) ، هر یک از پرایمرها 0.2 µl Primers(100 pM/ µl) ، 0.5 µl Taq DNA polymerase(5 U/µl) و 5 µl DNA بود و مخلوط واکنش برای ۳۵ چرخه تکثیر طبق برنامه (۶۰S در 95 °C، ۴۵S در ۶۲°C، ۹۰S در ۷۲°C) قرار گرفت(۱۸).

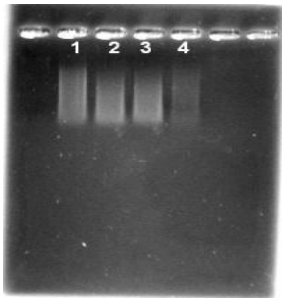
پس از تائید تکثیر موفقیت آمیز محصول PCR از قطعه ۶۴۴ جفت بازی، برای هضم آنزیمی سه آنزیم AvaII، HphI و HpaII استفاده شد. برای هر کدام از این آنزیم ها قطعه تکثیر شده با مقادیر ۷٫۵µl از محصولات PCR ، ۱µl از هر آنزیم و ۲/۵µl بافر آنزیم به صورت مجزا به تیوب های تمیز ۱/۵µl منتقل شد و با اضافه کردن آب، حجم نهایی به۲۵ µl رسید. هضم آنزیمی بمدت ۳ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد انجام شد. به دنبال هضم، مخلوط در ژل آگارز ۲٫۵٪ به مدت دو ساعت الکتروفورز شده و سپس با رنگ اتیدیوم بروماید ۰/۰۰۱٪ به مدت یک ساعت رنگ آمیزی شد.با توجه به اندازه قطعات ایجاد شده از هر آنزیم و به منظور تفسیر پروفایل های PRA ایجاد شده توسط هر گونه، از نشانگر 100bp ladder DNA size marker برای آنزیم AvaII و برای دو آنزیم HphI و HpaII علاوه بر نشانگر قبلی از نشانگر Ultra low range DNA ladder نیز استفاده شد. یک سویه استاندارد H37Rv نیز در این مطالعه به عنوان سویه استاندارد بکاررفت و براساس الگوریتم استاندارد(۱۸) و با استفاده از نرم افزار GelcomparII افتراق گونه ای انجام شد.

یافته ها

از میان نمونه های کشت مثبت ارجاعی به بخش سل پاستور، ۵۰ سویه NTM پس از انجام تست های بیوشیمیایی، شناسایی شدند. از ۵۰ سویه ی NTM تعداد ۲۹ سویه مربوط به سال ۸۹ و ۲۱ سویه مربوط به سال ۹۰ بود. بیش تر نمونه ها (۸۰٪) خلط و بقیه شامل ادرار، بافت ریه، خون قاعدگی، لاواژ معده، ادنوپاتی وترشحات استریل بدن بودند. پس از دریافت نمونه ها در مرحله اول، اسمیر مستقیم از آن ها تهیه شد و پس از رنگ امیزی زیل نلسون از نظر وجود باسیل اسید فست بررسی گردید. به دنبال آن پس از دکانتامیناسیون نمونه‌ها، کشت بر روی محیط LJ انجام شده و پس از دوره انکوباسیون به لحاظ وجود کلنی ها و مرفولوژی و فرم کلنی بررسی گردیدند و گونه های آتیپیک جداسازی شدند. بر طبق این نتایج ۸۰٪ از کل نمونه های مورد بررسی که از کشت آن ها NTM جدا شده است، اسمیر منفی و فقط ۲۰٪ اسمیر مثبت بودند.

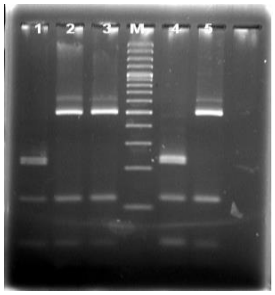
در بین ۵۰ سویه آتیپیک به دست آمده در بخش سل، ۳ سویه (۶٪) به ایزونیازید، استرپتومایسین، ریفامپین، اتامبوتول، کانامایسین و اتیونامید حساسیت کامل داشته و هیچ گونه مقاومتی در بین این سویه ها نسبت به آنتی بیوتیک های ذکر شده، مشاهده نشد. با بررسی الگوهای آنتی بیوتایپی به دست آمده در بین سویه های مورد بررسی مشخص شد که شایع‌ترین الگوی چند مقاومتی مقاومت نسبت به چهار آنتی بیوتیک اتیوناماید، اتامبوتول، ریفامپین وایزونیازید و هم چنین مقاومت به اتیوناماید،کانامایسین، ریفامپین، استرپتومایسین وایزونیازید بود.

تمام ۵۰ سویه ی NTM پس از مراحل استخراج، با استفاده از الکتروفورز بر روی ژل آگارز بررسی شدند تا از مطلوب بودن کیفیت آن ها جهت انجام PCR اطمینان حاصل شود(تصویر۱). پس از انجام PCR بر روی DNA استخراج شده از سویه های NTM، مشاهده ی محصول 644bp از ژن hsp65 نشان دهنده ی مثبت بودن واکنش بود(تصویر ۲). پس از به دست آوردن محصول PCR در مرحله اول با استفاده از آنزیم AvaII مبادرت به هضم آنزیمی محصول نمودیم(تصویر ۳). پس از به دست آوردن محصول PCR در مرحله دوم با استفاده از آنزیم HphI مبادرت به هضم آنزیمی محصول نمودیم (تصویر۴). پس از به دست آوردن محصول PCR در مرحله آخر با استفاده از آنزیم HpaII مبادرت به هضم آنزیمی محصول نمودیم (تصویر۵).

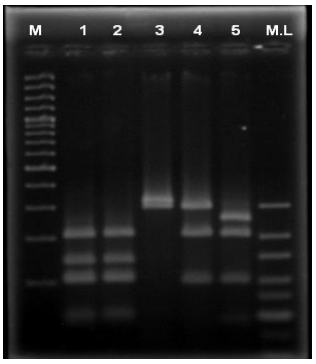


تصویر ۱: الکتروفوز DNA استخراج شده بر روی ژل اگارز، چاهک ۱، ۲، ۳، ۴ : DNA استخراج شده از ۴ ایزوله میکوباکتریایی

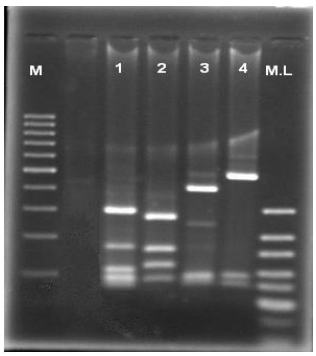
تصویر ۲: PCR ژن hsp65، چاهک ۱، ۲، ۳ : محصول PCR سویه های آتیپیک، چاهک ۴: نمونه کنترل مثبت (سویه استاندارد H37Rv)، M: مارکر وزن مولکولی، چاهک ۵: نمونه کنترل منفی



تصویر ۳: RFLP با آنزیم محدود کننده ی AvaII، چاهک ۱، ۲، ۳،۴، ۵ : محصول حاصل از هضم آنریمی سویه های آتیپیک با آنزیم AvaII، M: مارکر وزن مولکولی

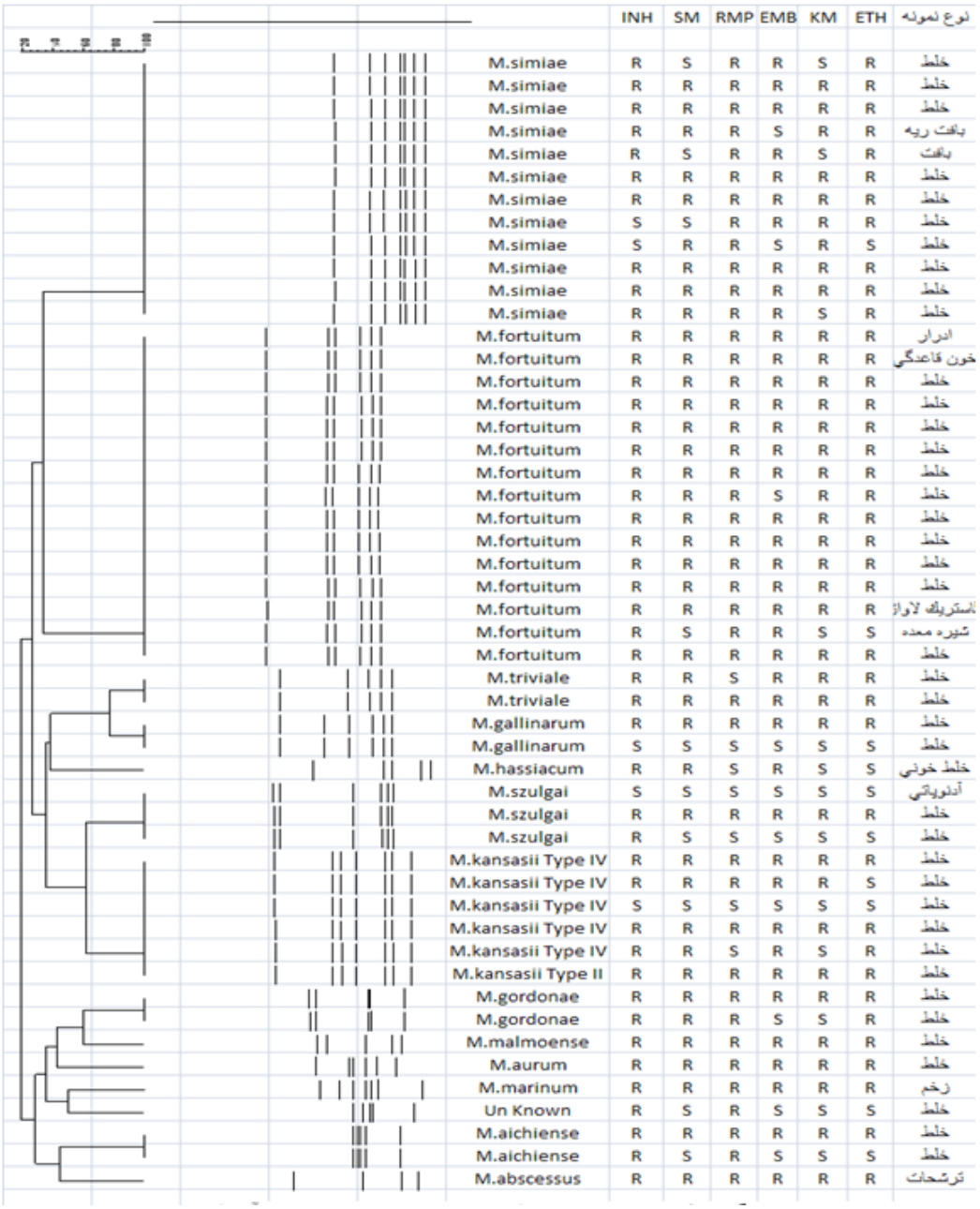


تصویر۴: RFLP با آنزیم محدود کننده یHphI ، چاهک ۱، ۲، ۳، ۴، ۵ : محصول حاصل از هضم آنریمی سویه های آتیپیک با آنزیمHphI ، M: مارکر وزن مولکولی، M.L: Ultra Low Range DNA Ladder



تصویر ۵: RFLP با آنزیم محدود کننده ی HpaII ، چاهک ۱، ۲، ۳، ۴ : محصول حاصل از هضم آنریمی سویه های آتیپیک با آنزیمHpaII ، M: مارکر وزن مولکولی، M.L: Ultra Low Range DNA Ladder

قطعات حاصل از هضم آنزیمی توسط هر سه آنزیم، با الگوریتم استاندارد(۱۸) مقایسه شدند و دندروگرام افتراق گونه ای بر اساس سایز قطعات به دست آمده در مقایسه با نشانگرهای وزن مولکولی و با استفاده از نرم افزار Gel comparII رسم شد(تصویر۶). بر این اساس ۱۳ گونه شناسایی شدند که به ترتیب فراوانی شامل M.fortuitum(۳۰٪)، M.simiae(۲۴٪)، M.kansasii (۱۲٪)، M.szulgae (۶٪)، M.gordonae و M.gallinarum و M.triviale و M.aichiense(هر کدام ۴٪)، M.hassiacum و M.malmoense و M.aurum و M.marinum و M.abscessus (هرکدام ۲٪) و یک گونه ی NTM تعیین هویت نشده (۲٪) بودند.



	INH	SM	RMP	EMB	KM	ETH	نوع نمونه
M.simiae	R	S	R	R	S	R	خلط
M.simiae	R	R	R	R	R	R	خلط
M.simiae	R	R	R	R	R	R	خلط
M.simiae	R	R	R	S	R	R	بافت ریه
M.simiae	R	S	R	R	S	R	بافت
M.simiae	R	R	R	R	R	R	خلط
M.simiae	R	R	R	R	R	R	خلط
M.simiae	S	S	R	R	R	R	خلط
M.simiae	S	R	R	S	R	S	خلط
M.simiae	R	R	R	R	R	R	خلط
M.simiae	R	R	R	R	R	R	خلط
M.simiae	R	R	R	R	S	R	خلط
M.fortuitum	R	R	R	R	R	R	ادرار
M.fortuitum	R	R	R	R	R	R	خون قاعدگی
M.fortuitum	R	R	R	R	R	R	خلط
M.fortuitum	R	R	R	R	R	R	خلط
M.fortuitum	R	R	R	R	R	R	خلط
M.fortuitum	R	R	R	R	R	R	خلط
M.fortuitum	R	R	R	R	R	R	خلط
M.fortuitum	R	R	R	S	R	R	خلط
M.fortuitum	R	R	R	R	R	R	خلط
M.fortuitum	R	R	R	R	R	R	خلط
M.fortuitum	R	R	R	R	R	R	خلط
M.fortuitum	R	R	R	R	R	R	خلط
M.fortuitum	R	R	R	R	R	R	خلط
M.fortuitum	R	R	R	R	R	R	استریك لاواژ
M.fortuitum	R	S	R	R	S	S	شوره معده
M.fortuitum	R	R	R	R	R	R	خلط
M.triviale	R	R	S	R	R	R	خلط
M.triviale	R	R	R	R	R	R	خلط
M.gallinarum	R	R	R	R	R	R	خلط
M.gallinarum	S	S	S	S	S	S	خلط
M.hassiacum	R	R	S	R	S	S	خلط خوني
M.szulgai	S	S	S	S	S	S	آندوبرانشي
M.szulgai	R	R	R	R	R	R	خلط
M.szulgai	R	S	S	S	S	S	خلط
M.kansasii Type IV	R	R	R	R	R	R	خلط
M.kansasii Type IV	R	R	R	R	R	S	خلط
M.kansasii Type IV	S	S	S	S	S	S	خلط
M.kansasii Type IV	R	R	R	R	R	R	خلط
M.kansasii Type IV	R	R	S	R	S	R	خلط
M.kansasii Type II	R	R	R	R	R	R	خلط
M.gordonae	R	R	R	R	R	R	خلط
M.gordonae	R	R	R	S	S	R	خلط
M.malmoense	R	R	R	R	R	R	خلط
M.aurum	R	R	R	R	R	R	خلط
M.marinum	R	R	R	R	R	R	زخم
Un Known	R	S	R	S	S	S	خلط
M.aichiense	R	R	R	R	R	R	خلط
M.aichiense	R	S	R	S	S	S	خلط
M.abscessus	R	R	R	R	R	R	ترشحات

تصویر۶. دندروگرام افتراق گونه ای سویه های مورد مطالعه

بحث

میکوباکتریوم های آتیپیک تنوع زیادی درسرعت رشد، مرفولوژی کلنی، ویرولانس ومقاومت آنتی بیوتیکی داشته و هیچ گونه اتفاق نظری در مورد درمان عفونت های ناشی از آنها وجودندارد. برخلاف تنوع گونه ای بالایی که در این مطالعه در بین ایزوله های آتیپیک مشاهده شد الگوهای مقاومت آنتی بیوتیکی محدودی در بین آنها وجود داشت. ولی مقاومت هم زمان به ایزونیازید و ریفامپین در ۸۲ درصد موارد و در بین اکثریت گونه ها مشاهده گردید. در طی عفونت با میکوباکتریوم های آتیپیک اغلب شکست درمانی اتفاق می افتد که به دلیل همین مقاومت بالا به آنتی بیوتیک ها است(۲۶و۲۵).

تشخیص صحیح گونه ای در درمان عفونت های میکوباکتریایی بسیار مهم است زیرا به لحاظ بالینی درمان بیماری سل با انواع آتیپیک متفاوت می باشد. بنابراین محققین باید بدنبال تکنیکی باشندکه علاوه بر مقرون به صرفه بودن و قابلیت تکرارپذیری بالا و امکان انجام در کلیه آزمایشگاه های تشخیص سل قادر باشد گونه های آتیپیک را از TB کمپلکس افتراق دهد تا از همان ابتدا سیر درمانی صحیحی برای بیمار درنظر گرفته شود.

روش های بیوشیمیایی در تشخیص مایکوباکتریوم ها زمان گیر بوده و تفسیرهای آن ها اغلب پیچیده است. در مقابل روش های مولکولی مانند PRA با هدف قرار دادن قطعات حفاظت شده در طول ژنوم انواع میکوباکتری ها و تکثیر این مناطق با روش PCR واستفاده از آنزیم های محدوداثر به منظور برش این محصولات PCR محققین را در این زمینه یاری کرده اند(۱۶-۱۴). در این میان استفاده از قطعه ی ۶۴۴ جفت بازی تکثیر شده از ژن hsp65 سریع، دقیق و مقرون به صرفه بوده و میکوباکتریوم ها را در سطح زیرگونه نیز تفکیک میکنند(۱۸). در این مطالعه ۱۲ ٪ از گونه های شناسایی شده میکوباکتریوم کانزاسی بود که از این میان ۱۰٪ از زیرگونهی IV و ۲٪ زیرگونه‌ی II را شامل می شد.

با توجه به دقت بالای این روش و شناسایی NTM در سطح گونه و زیرگونه در حداقل زمان ممکن، این روش بر روش های کلاسیک و بسیاری از روش های مولکولی که یا پیچیده بوده و یا تنها بر روی حجم اندکی از نمونه جواب می دهند، ارجحیت دارد. روش PRA مورد استفاده توسط Devallois(۹) و Brunello (۱۹) با هدف قرار دادن قطعه ۴۳۹bp از ژن hsp65 برای شناسایی گونه های کلینیکی مهمی چون میکوباکتریوم توبرکلوزیس و سویه های MAC به هضم آنزیمی توسط دو آنزیم BsteII وHaeIII وابسته بود در حالی که که در روش PRA که ما مورد استفاده قرار دادیم با هدف قرار دادن قطعه ۶۴۴bp از ژن hsp65 روند هضم آنزیمی تنها با یک آنزیم محدود کننده ی AvaII انجام شد و چنان چه جداسازی MTB یا MAC در نظر باشد، تنها این مرحله از هضم آنزیمی برای افتراق کافی است. هم چنین این روش PRA قدرت تفکیک بهتری نسبت به روش قبلی دارد زیرا پروفایل های PRA اغلب سویه ها اندازه مناسبی داشته بنابراین برای تفسیر به آنالیزهای کامپیوتری که اغلب پیچیده هستند نیز نیاز نیست.

مقایسه فرکانس گونه ای در این مطالعه بین دو سال شیوع ثابت گونه ها در دو سال ۸۹ و ۹۰ را نشان می دهد. بیش ترین گستره سنی درگیربالای ۶۰ سال بوده (۳۶٪) و کمترین شیوع در گستره سنی تا ۱۵ سال (۱۰٪) مشاهده شد. کوچک ترین بیمار دو ماه و مسن ترین آن ها ۹۰ سال سن داشتند. این امر این مسئله را تائید می کند که مایکوباکتریوم های آتیپیک بیشتر افرادی را که دارای ایمنی تضعیف شده یا سیستم ایمنی نابالغ هستند تهدید می کنند(۲۵). اسمیر مستقیم در ۸۰٪ گونه های شناسایی شده منفی بود و در مطالعه حاضر این روش برای غربال گری نمونه های مشکوک به NTM مناسب شناخته نشد که می تواند بدلیل کم بودن تعداد باسیل ها در نمونه های کلینیکی باشد. در این مطالعه بیشترین سویه های شناسایی شده میکوباکتریوم فورتوئیتوم(۳۰٪) و میکوباکتریوم سیمیه(۲۴٪) بودند. با در نظر گرفتن مقاومت دارویی بالای این سویه ها، از فراوانی گسترده ی این دو سویه در جمعیت ژنتیکی سویه های ایران خبر می دهد. این در حالی است که در کره و امریکا و بسیاری از نقاط دنیا MAC شایع ترین میکوباکتریوم گزارش شده است(۸و۱). با استفاده از این دو داده که هیچ کدام از ۴۹سویه ی NTM شناسایی شده متعلق بهMAC نیستند و نیز هیچ کدام از بیماران این مطالعه مبتلا به ایدز نبودند می توان نتیجه گرفت که شیوع آن در جمعیت افرادی که مبتلا به ایدز نیستند در ایران نرخ قابل توجهی را بخود اختصاص نمی دهد و فراوانی آن بیشتر باید در رابطه با افراد مبتلا به ایدز مورد بررسی های آتی قرار گیرد.

در طی این مطالعه یک گونه ی NTM شناسایی نشد و الگوی هضم آنزیمی آن به هیچ کدام از الگوهای موجود در الگوریتم استاندارد شباهت نداشت. علت آن ممکن است مربوط به موتاسیون در ناحیه برش آنزیم یا پیدایش گونه های جدید احتمالی باشد که می تواند موضوعی برای مطالعات بعدی به حساب آید.

در مطالعه ی ما برخی گونه ها (M.szulgae، M.gordonae، M.triviale، M.hassiacum و M.abscessus) فقط در میان نمونه های سال ۸۹ شناسایی شدند. برخی گونه‌ها (M.gallinarum، M.malmoense، M.aurum، M.marinum) نیز فقط از نمونه های سال ۹۰ جدا شدند اما بقیه گونه ها از نمونه های هر دو سال ۹۰ و ۸۹ جدا شدند که فراوانی آن ها در هر سال به قرار زیر بود: میکوباکتریوم فورتیتوم در سال ۸۹(۳۱/۰۴٪) و در سال ۹۰(۲۸/۵۷٪)، میکوباکتریوم سیمیه در سال ۸۹(۲۴/۱۴٪) و در سال ۹۰(۲۳/۸۱٪)، میکوباکتریوم کانزاسی در سال ۸۹(۶/۹٪) و در سال ۹۰(۱۹/۰۵٪)، میکوباکتریوم آیچیئنس در سال ۸۹(۳/۴۵٪) و در سال ۹۰(۴/۷۶٪). همان طور که مشاهده می شود به جز میکوباکتریوم کانزاسی، دیگر میکوباکتریوم های NTM این مطالعه در دو سال ۸۹ و ۹۰ شیوع مشابه داشتند که این امر نشان دهنده توزیع گونه‌ای ثابت در طی این دو سال است.

بهرمند و هم کاران در مطالعه ای در سال ۷۷ اقدام به بررسی تنوع بیوتایپی مایکوباکتریوم ها با روش‌های بیوشیمیایی و تکنیک الکتروفورز آلوزیم‌ها کردند. آن‌ها نشان دادند که Mycbacterium fortuitum و Mycobacterium chelonaeگونه‌های غالب را در ایجاد عفونت های NTM در بیماران مراجعه کننده به انستیتو پاستور تشکیل داده و به دنبال آن سویه‌های مربوط به M. chelonae Like organism و یاM. Mucogenicum قرارداشتند(۲۷). نتایج حاصل از این تحقیق با توجه به غالب بودن مایکوباکتریوم فورتوئیتوم و جدا شدن تعدادی مایکوباکتریوم کانزاسی(۱۲٪) مطابق با مطالعهی بهره‌مند و هم کاران است اما از نظر فراوانی دیگر گونه های NTM با آن ها متفاوت است که این تفاوت نشان دهنده فرکانس تغییرات در شیوع گونه های NTM در جمعیت ایران از سال ۷۷ تا سال ۸۹ و ۹۰ می باشد.

قاضی سعیدی و هم کاران به منظور بررسی فراوانی میکوباکتریوم مارینوم در ماهی ها و نیز ضایعه گرانولوم استخر شنا در کارکنان شیلات مطالعه ای را انجام دادند.از ۲ مورد(۱/۷۶٪) از ماهی های مورد بررسی میکوباکتریوم مارینوم جدا شد. در مطالعه ما یک مورد میکوباکتریوم مارینوم(۲٪) از زخم جدا شد که این مسئله ارتباط این باکتری با زخم های جلدی را تائید می کند(۲۸).

در مطالعه حیدری و هم کاران در سال ۱۳۸۸از میان ۴۳ نمونه ی آتیپیک، ۱۲ نمونه تند رشد(۲۷/۹۱٪) و بقیه کند رشد(۷۲/۱) بودند. ۳۴/۴۹٪ نمونه های مورد مطالعه در این تحقیق تند رشد بوده و سایر نمونه ها (۶۱/۵۱٪) کند رشد می باشند .مایکوباکتریوم سیمیه در این تحقیق بالاترین درصد را به خود اختصاص داد که در مطالعه ما مقام دوم را داشت(۲۹).

بر طبق مطالعه شجاعی و هم کاران در سال ۱۳۸۹ سه گونه NTM شایع شامل فورتوئیتوم، کانزاسی و گوردونه ای بودند که با تنوع گونه ای در مطالعه ما تا حدودی شباهت دارد(۳۰). گزارشات متفاوت در خصوص تنوع گونه ای درسویه های NTM می تواند ناشی از اختلافات حاکم بر محیط های تحقیق به لحاظ زمان، منطقه جغرافیایی و جمعیت باشد.

نتیجه گیری

در مطالعه حاضر نشان داده شد که در بین روش های تشخیص گونه ای در میکوباکتریوم ها استفاده از روش PRA بر روی کلنی های بدست آمده از انواع میکوباکتریوم ها با تکثیر قطعه ۶۴۴ جفت بازی در مقایسه با روش های بیوشیمیایی از سرعت و دقت بالاتری برخوردار است و چنان چه این روش مستقیما برروی نمونه بالینی مورد استفاده قرار گیرد با پیش گیری از اشتباهات احتمالی در تعیین گونه و هم چنین کاهش زمان تشخیص کمک شایانی را به تشخیص ، درمان و کنترل صحیح بیماری سل می نماید و از طرف دیگر آمار دقیق تری از شیوع انواع گونه های آتیپیک در بین نمونه های بالینی به ما ارائه می دهد. از آنجایی که تعیین شیوع انواع میکوباکتریوم های آتیپیک درنمونه های محیطی مانند آب وخاک در مناطق جغرافیایی مختلف نیز همواره از اهمیت بالایی برخوردار است روش PRA در این مورد نیز می تواند راه گشای مشکلات تشخیص گونه ای باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله سپاس گزار جناب آقای دکتر محمدرضا پورشفیع استادگروه باکتری شناسی انستیتو پاستور ایران برای هماهنگی جهت استفاده از نرم افزار GelcomparII هستند.

REFERENCES

1. Bai G.H. Park K.S, Kim S.J. Clinically isolated Mycobacteria other than Mycobacterium tuberculosis from 1980 to 1990 in Korea. J. Korean Soc. Microbiol. 1993 Feb; 28(1): 1 – 5.

2. Jenkins P.A, Duddridge L.R, Yates M.D. Identification of pathogenic and environmental mycobacteria. Appl. Bacteriol.Tech. Ser. 1992: 29: 311 – 324.

3. Chris A. Gentry, Pharm D. Atypical Mycobacterium,microbiological book,5th edition. 2010:99-119.

4. Falkinham J.O. Epidemiology of Mycobacterium avium infections in the pre- and post-HIV era. Res. Microbiol. 1994 Mar-Apr;145(3):169– 172.

5. Domenech P, Menendez M.C, Garcia M.J. Restriction fragment length polymorphisms of 16S rRNA genes in the differentiation of fast-growing mycobacterial species. FEMS Microbiol. Lett. 1994 Feb;116(1):19– 24.

6. Palomino J.C. Nonconventional and new methods in the diagnosis of tuberculosis:feasibility and applicability in the field. Eur Respir J. 2005 Aug;26(2):339-350.

7. Richter E, Niemann S, Rusch-Gerdes S, Hoffner S. Identification of Mycobacterium kansasii by using a DNA probe (AccuProbe) and molecular techniques. J. Clin. Microbiol. 1999 Apr; 37(4):964–970.

8. Bannalikar A.S,Verma R. Detection of Mycobacterium avim&M.tuberculosis from human sputum cultures by PCR-RFLP analysis of hsp65 gene & pncA PCR. division of bacteriology & mycology, 2006 Feb;123(2):165-172.

9. Devallois A, Goh K.S, Rastogi N. Rapid identification of mycobacteria to species level by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the hsp65 gene and proposition of an algorithm to differentiate 34 mycobacterial species. J.Clin. Microbiol. 1997 Nov ;35(11): 2969– 2973.

10. Hafner B, Haag H, Geiss H. K. , Nolte O. Different molecular methods for the identification of rarely isolated nontuberculous mycobacteria and description of new hsp65 restriction fragment length polymorphism patterns. Mol Cell Probes. 2004 Feb;18(1): 59–65.

11. Kanaujia G.V, KatochV.M, Shivannavar C.T, Sharma V.D,Patil M.A. Rapid characterization of Mycobacterium fortuitum–chelonei complex by restriction fragment length polymorphism of ribosomal RNA genes. FEMS Microbiol.Lett. 1991Jan; 61(2-3): 205– 208.

12. Kim B.J, Lee K.H, Park BN, Kim SJ, Bai GH, Kim S J, Kook Y.H. Differentiation of mycobacterial species by PCR-restriction analysis of DNA (342 base pairs) of the RNA polymerase gene (rpoB). J. Clin. Microbiol. 2001 Jun;39(6):2102– 2109.

13. Kim b H, Kim S, Shim T, Kim M, Bai G.,et al. Differentiation of Mycobacterium species by analysis of the heat-shock protein 65 gene(hsp65). International journal of systematic and evolutionary microbiology.2005 Jul;55(4):1649-1656.

14. Lee H, Park H.J, Cho S.N, Bai G.H, Kim S.J. Species identification of mycobacteria by PCR-restriction fragment length polymorphism of the rpoB gene. J. Clin. Microbiol. 2000 Aug;38(8):2966– 2971.

15. Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Bottger E.C, Bodmer T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. J. Clin. Microbiol. 1993 Feb;31(2):175– 178.

16. Takewaki S, Okuzumi K, Manabe I, Tanimura M, Miyamura K, Nakahara, K, et al. Nucleotide sequence comparison of the mycobacterial dnaJ gene and PCR-restriction fragment length polymorphismanalysis for identification of mycobacterial species. Int. J. Syst.Bacteriol. 1994 Jan;44(1):159– 166.

17. TaylorT.B, Patterson C, Hale Y, Safranek W.W. Routine use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis for identification of mycobacteria growing in liquid media.J. Clin. Microbiol. 1997 Jan;35(1):79– 85.

18. Kim a H, Kim S, Shim T, Kim M, Bai G,et al. 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 Aug; 62(2):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 Aug;39(8):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 Jan-Feb;43(1):25-8.

21. Steingrube V.A, Gibson J.L, Brown B.A, Zhang Y, Wilson R.W, Rajagopalan, M, Wallace J.R. 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 Jan ;33(1):149–153.

22. Eriks I.S, Munck K.T, Besser T.E, Cantor G.H, Kapur V. Rapid differentiation of Mycobacterium avium and M.paratuberculosis by PCR and restriction enzyme analysis. J.Clin. Microbiol. 1996 Mar;34(3): 734– 737.

23. Brooks,Carroll,Butel,Morse. Jawet's Medical Microbiology.2007.

24. Walker T.Stuart,Walker Medical Bacteriology.2005

25. Rosenzweig D.Y. Nontuberculous mycobacterial disease in the immunocompetent adult. Semin. Respir. Infect. 1996 Dec;11(4):252–261.

26. Sexton P, Harrison A.C. Susceptibility to nontuberculous mycobacterial lung disease, Eur Respir J.2008 Jun;31(6):1322-1333.

27. Bahrmand A.R, Madani H, Samar G, Khalilzadeh L, Bakayev W, Babaei M.H. Detection and identification of non-tuberculous mycobacterial infections in 6472 tuberculosis suspected patients. Scand J Infect Dis. 1996;28(3):275-278.

28. Ghazisaidi K, Hashemzadeh R, Mohammadi M, Fatemi-Nasab F.D. Mycobacterium marinum infection in caviar fishes and fishermans in Ashorada of Golestan province in north of Iran. J Gorgan Uni Med Sci. 2006;8(2):60-62

29. Heidari F, Farnia P, Noroozi J, Majd A, Tajedin E, Masjedi M, Velayati A. The Rapid Identification of Atypical Mycobacterium in Pulmonary Tuberculosis (PTB) Patients: Evaluation of QUB3232 Locus Using the VNTR Method. J Zanjan University Med Scien. 2009 Jun; 67(17):37-44(Full text in Persian)

30. Shojaei H, Heidarieh P, Hashemi A, Feizabadi MM, Daei Naser A. Species identification of neglected nontuberculous Mycobacteria in a developing country. Jpn J Infect Dis. 2011Apr ;64(4):265-271.