ارزیابی ژن های S rRNA۱۶، hsp65 و rpoB در شناسایی دقیق گونه های مایکوباکتریوم غیرتوبرکلوزی

مهدی رشدی ملکی[1]*

۱- استادیار، گروه میکروبیولوژی، واحد ملکان، دانشگاه آزاد اسلامی، ملکان، ایران

***نشانی برای مکاتبه: ملکان-کیلومتر ۲ اتوبان ملکان – تبریز، مجتمع آموزشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ملکان، معاونت پژوهشی دانشگاه، تلفن: ۰۹۱۴۳۲۰۰۸۴۶ آدرس ایمیل mehdiroshdi@gmail.com**

دریافت مقاله: آذر نود ونه پذیرش برای چاپ: بهمن نود و نه

چکیده

زمینه و هدف: مایکوباکتریوم های غیرتوبرکلوزی (NTM) خانوادۀ بزرگی از باکتری های اسید فست هستند که بطور گسترده در محیط پراکنده اند. اگر چه اکثر این گونه ها ساپروفیت هستند، حدود ۳۰٪ این گونه ها با بیماری های انسانی در ارتباط اند. NTM ها و اعضای مجموعۀ *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* دارای ویژگی های میکروبیولوژیکی مشترک هستند مانند القاء پاسخ ایمنی مشابه و تظاهرات بالینی یکسان. با این حال، بیماری های ناشی از گونه های NTM یک چالش تشخیصی برای پزشکان است زیرا نمی توانند بر اساس تاریخچۀ بالینی، نتایج آزمون پوستی توبرکولین، الگوهای رادیولوژیکی و گزارش های اولیۀ آزمایشگاهی به آسانی از بیماری سل تشخیص دهند. لذا شناسایی دقیق مایکوباکتریوم های غیرتوبرکلوزی به دلیل متفاوت بودن استراتژی های درمانی ضروری بوده و لازم است مورد توجه جدی قرار گیرد.

روش کار: تعداد ۱۲۰ نمونه آب به منظور جداسازی گونه های NTM جمع آوری و پس از آلودگی زدایی و پردازش، در محیط لونشتاین- جانسون کشت داده شدند. سپس دقت و حساسیت ۳ ژن محافظت شدۀ *16S rRNA*، *hsp65* و *rpoB* در شناسایی گونه های NTM جداسازی شده مورد ارزیابی قرار گرفتند.

یافته ها: در این مطالعه ۸۷ کلنی NTM از نمونه های آب جداسازی شدند. نتایج بررسی توالی ژنهای *16S rRNA*، *hsp65* و *rpoB* نشان داد که ژن *hsp65* در مقایسه با ۲ ژن دیگر از دقت و حساسیت بالایی در تشخیص گونه ها برخوردار است.

نتیجه گیری: بر خلاف ژن *hsp65*، تعیین توالی جزئی از ژنهای *16S rRNA* و *rpoB* برای تشخیص گونه های NTM کافی نیست.

واژگان کلیدی: مایکوباکتریوم های غیرتوبرکلوزی، شناسایی، ژن های *16S rRNA*، *hsp65*، *rpoB*

مقدمه

جنس مایکوباکتریوم به سه گروه اصلی اعضای مجموعۀ مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، مایکوباکتریوم لپره و NTM (Nontuberculous mycobacteria) تقسیم می شوند. NTM ها خانوادۀ بزرگی از باکتری های اسید فست هستند که بطور گسترده در محیط پراکنده اند و مخازن مهم آنها شامل آب و خاک است(۱). اگر چه اکثر گونه های NTM ساپروفیت هستند، حدود ۳۰٪ این گونه ها با بیماری های انسانی در ارتباط اند(۴-۲).

گونه های NTM و اعضای مجموعۀ مایکوباکتریوم توبرکلوزیس صفات میکروبیولوژیکی مشترکی مانند القاء پاسخ ایمنی مشابه و تظاهرات بالینی مشترک بخصوص بیماری های غدد لنفاوی و ریه دارند. با این حال، بیماری های ناشی از گونه های NTM یک چالش تشخیصی برای پزشکان ریه، پزشکان اطفال و سایر پزشکان است زیرا نمی توانند بر اساس تاریخچۀ بالینی، نتایج آزمون پوستی توبرکولین، الگوهای رادیولوژیکی و گزارش های اولیۀ آزمایشگاهی به آسانی بیماری های ناشی از NTM را از سل تمییز دهند(۱). شیوع بیماری های ناشی از NTM در حال افزایش است و گزارش شده که در ایالات متحدۀ آمریکا شیوع این بیماری ها احتمالاً بیشتر از بیماری سل است (۵). مدارکی وجود دارد که این دسته از مایکوباکتریوم ها قادرند انواع مختلفی از بیماری ها را در ریه، پوست، کلیه، مغز و سایر نقاط بدن ایجاد کنند اما شایعترین بیماری های ناشی از NTM لنفادنیت در کودکان و عفونت های ریوی در

بزرگسالان هستند. کودکان سرطانی، دریافت کنندگان پیوند عضو و پیوند سلول های بنیادی و افراد دچار نقص سیستم ایمنی قربانیان اصلی هستند(۶). درمان عفونت های ناشی از NTM ها بسیار متفاوت از درمان بیماری های ناشی از مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بوده و مستلزم استفاده از چندین آنتی بیوتیک با دورهٔ درمانی طولانی است. به عوان مثال؛ جراحی بدون درمان آنتی بیوتیکی سنگ بنای درمان لنفادنیت ناشی از NTM است، برخلاف لنفادنیت مرتبط با MTB که درمان آنتی بیوتیکی بسیار مهم است(۱, ۷). رویکرد به درمان و انتخاب دارو با توجه به گونه های NTM جدا شده نیز متفاوت است. مقاوم بودن این دسته از مایکوباکتریوم ها به اکثر داروهای ضد سل و انتشار وسیع آنها در طبیعت اهمیت مطالعه بر روی NTM ها را دو چندان کرده است. اگرچه اعضای مجموعهٔ مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به عنوان عامل اصلی بیماری های ریوی در انسان شناخته شده اند اما امروزه بسیاری از محققان قدرت بیماریزایی NTM ها را کمتر از این دسته نمی دانند(۸).

در حال حاضر NTM ها به عنوان پاتوژن واقعی و از علل مهم عفونت های انسانی شناخته شده اند. لذا شناسایی دقیق گونه های NTM به دلیل متفاوت بودن استراتژی های درمانی ضروری بوده و یکی از مباحث اساسی مایکوباکتریولوژی در سالهای اخیر بوده است (3). اگرچه این باکتری ها با روشهای فنوتیپیک تشخیص داده می شوند، اما این روش ها وقت گیر بوده، دقت و حساسیت کمتری دارند. در حال حاضر با پیشرفت در میکروبیولوژی مولکولی روشهایی در دسترس هستند که تشخیص سریع تر و دقیق تر NTM ها را ممکن می سازند. از میان روشهای مولکولی، روشهای بر پایهٔ PCR مناسب تر و قابل اطمینان تر هستند. ژن های زیادی مانند ژن 16S rRNA، hsp65، ITS، rpoB و dnaj بطور گسترده به منظور شناسایی مایکوباکتریوم ها در سطح گونه مورد استفاده قرار گرفته اند(۱۲-۹). دراین مطالعه دقت و حساسیت ۳ ژن محافظت شدهٔ 16S rRNA، hsp65 و rpoB در تشخیص صحیح گونه های NTM مورد ارزیابی و مقایسه قرار گرفت. تا به این سؤال که کدامیک از این ژنها در تشخیص صحیح گونه ها کمک کننده است؟ پاسخ داده شود.

روش کار

در این مطالعه تعداد ۱۲۰ نمونه آب (هر کدام ۵۰۰ میلی لیتر) از منابع مختلف آب شهر تبریز در شرایط کاملاً استریل جمع آوری شدند. برای آلودگی زدایی نمونه ها و جداسازی NTM از مادهٔ ضد عفونی کنندهٔ ستیل پیریدینیوم کلراید ۰/۰۱ ٪ (CPC 0.01%) (مرک، آلمان) به مدت ۳۰ دقیقه استفاده شد. نمونه ها از میان فیلترهایی با قطر منافذ ۰/۴۵ میکرون (ارنج ساینتیفیک، بلژیک) عبور داده شدند. رسوبات حاصل در ۲ میلی لیتر آب مقطر استریل حل و در محیط کشت لونشتاین جانسون کشت داده شدند. پس از ۸ هفته انکوباسیون در دمای ۳۰ درجهٔ سلسیوس، کلنی های مشکوک به اسید فست، با استفاده از رنگامیزی اختصاصی زیل نلسون و یکسری آزمون های بیوشیمیایی از جمله آریل سولفاتاز، کاتالاز نیمه کمی، کاتالاز مقاوم به حرارت، و آزمون احیای نیترات شناسایی اولیه شدند و برای انجام مطالعات بعدی از آنها کشت خالص تهیه شد.

استخراج DNA: برای استخراج DNA از روش جوشاندن و انجماد استفاده شد. برای اینکار، یک لوپ از کلنی های کشت خالص در ۵۰۰ میکرولیتر از بافر TE (1X) حل و به مدت ۳ دقیقه ورتکس شد تا سوسپانسون یکنواخت بدست آمد. در مرحلهٔ بعد سوسپانسیون به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجهٔ سلسیوس جوشانده شد و سپس به مدت ۱۵ دقیقه به دمای ۲۰- درجه سلسیوس انتقال داده شد. این عمل ۳ بار تکرار شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ xg سانتریفیوژ گردید. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رویی برای انجام واکنشهای PCR به میکروتیوب دیگری انتقال داده شد. پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه از مقالات (۱۵-۱۳) مستخرج شدند. نام و مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق به همراه منابع آنها در جدول شماره ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱: نام و مشخصات پرایمر های مورد استفاده جهت تکثیر قسمتی از ژن های محافظت شدهٔ *16S rRNA*، *hsp65* و *rpoB*

نام پرایمر	طول	اندازه محصول PCR	ژن هدف برای تکثیر	توالی پرایمر (۵ به ۳)	منابع
Tb 11	۲۰	۴۴۱ جفت باز	*hsp65*	F: ACCAACGATGGTGTGTCCAT	**Telenti et al. (1993)**
Tb 12	۲۰			R: CGGATCACTCGTGAACGCTA	
16S27 F	۲۰	۹۲۱ جفت باز	*16S rRNA*	F: AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	**Harmsen et al. (2003)**
16S907 R	۲۰			R: CCGTCAATTCMTTTRAGTTT	
Myco F	۲۰	۷۶۴ جفت باز	*rpoB*	F: GGCAAGGTCACCCCGAAGGG	**Adekambi et al. (2003)**
Myco R	۲۱			R: AGCGGCTGCTGGGTGATCATC	

برای واکنش های زنجیره ای پلیمراز(PCR) از میکروتیوب های ۰/۲ میلی لیتری استفاده شد و حجم کل اجزای شرکت کننده در واکنش ۲۵ میکرولیتر بود. ترکیبات مورد استفاده برای انجام واکنش های PCR به همراه مقادیر آنها در جدول ۲ نشان داده شده است. پس از بدست آوردن دمای اتصال پرایمرها، هر کدام از ژن های *16S rRNA*، *hsp65* و *rpoB* برای هر کدام از نمونه ها مطابق برنامهٔ زمانی و سیکل حرارتی جدول۳ انجام گردید.

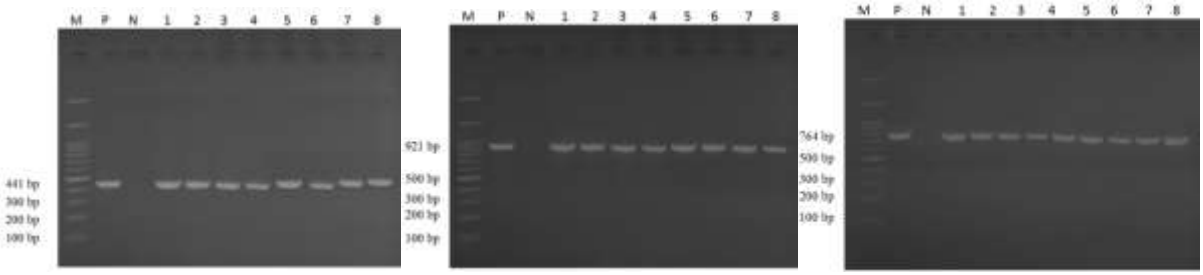
جدول ۲: ترکیبات مورد استفاده و مقادیر آنها برای تکثیر ژن های *16S rRNA* ، *hsp65* و *rpoB*

نام ترکیب	حجم بر اساس میکرو لیتر (µl)	غلظت نهایی
Taq DNA Polymerase 2x Master Mix $MgCl_2$ 4 mM	12.5 µl	**1X** **$MgCl_2$ 2 mM**
Template DNA	variable	**< 1.000 ng**
Forward Primer (10 pmol)	1 µl	**0.4 pmol**
Reverse Primer (10 pmol)	1 µl	**0.4 pmol**
Nuclease-free water	9.5 µl	-
Total Volume	**25 µl**	-

جدول۳: برنامه زمانی و سیکل حرارتی PCR برای تکثیر ژن های *16S rRNA* ، *hsp65* و *rpoB*

تعداد سیکل ها	زمان	دما بر حسب سلسیوس	مراحل
۱ سیکل	۴ دقیقه	۹۵	دناتوراسیون اولیه
۳۵ سیکل	۳۰ ثانیه	۹۴	دناتوراسیون
	۳۰ ثانیه	۶۰ تا ۶۵ (متفاوت برای هر کدام از ژن ها)	دمای اتصال پرایمر
	۵۰ ثانیه	۷۲	توسعه
۱ سیکل	۱۰ دقیقه	۷۲	توسعهٔ نهایی
		۴	نگهداری

برای کنترل صحت واکنشهای PCR از DNA سویهٔ استاندارد مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (H37Rv) و آب مقطر استریل به ترتیب به عنوان کنترل مثبت و کنترل منفی استفاده شد. محصولات PCR در ژل آگارز ۱/۵٪ الکتروفورز شدند (شکل۱). محصولات PCR نمونه های مثبت با استفاده از کیت های مخصوص شرکت کیاژن آلمان خالص سازی و برای تعیین توالی به شرکت ماکروژن کرهٔ جنوبی ارسال شدند. برای آنالیز توالی های بدست آمده از نرم افزارهای Chromas pro (version 2.1) و DNASTAR Lasergene (version 7.1) استفاده شد. به منظور شناسایی گونه های جداسازی شده و مقایسهٔ توالی های نوکلئوتیدی بدست آمده با سایر توالی های نوکلوئیدی موجود در پایگاه داده NCBI ، بلاست نوکلئوتیدی (blastn) برای هر کدام از ژنهای 16S rRNA، hsp65 و rpoB انجام گرفت (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).



شکل ۱: الکتروفورز محصولات PCR . شکل سمت راست الکتروفورز ۴۴۱ جفت باز از ژن *hsp65*، شکل وسطی الکتروفورز ۹۲۱ جفت باز از ژن *16S rRNA* و شکل سمت چپ الکتروفورز ۷۶۴ جفت باز از ژن *rpoB* . (M: Marker, P: Positive, N: Negative).

یافته ها

از مجموع ۱۲۰ نمونه آب، ۸۷ کلنی NTM جداسازی شدند. نتایج این مطالعه نشان داد که PCR و تعیین توالی ژن hsp65 در مقایسه با ژن های 16S rRNA و rpoB از دقت و حساسیت بالاتری در شناسایی گونه های NTM برخوردار است. با استفاده از این ژن تمامی کلنی های NTM در سطح گونه شناسایی شدند و مشکلی در شناسایی گونه های بسیار نزدیک از جمله اعضای گروه م. فورچوئیتوم مشاهده نشد. به عنوان مثال شناسایی گونهٔ م. فوکائیکوم که متعلق به گروه م. فورچوئیتوم بوده و در تعیین توالی ژن 16S rRNA به عنوان م. موکوژنیکوم شناسایی می شد، در استفاده از این ژن از یکدیگر متمایز شدند. با استفاده از تعیین توالی این ژن حتی زیرگونه های م. آبسسوس هم قابل شناسایی بودند(جدول ۴).

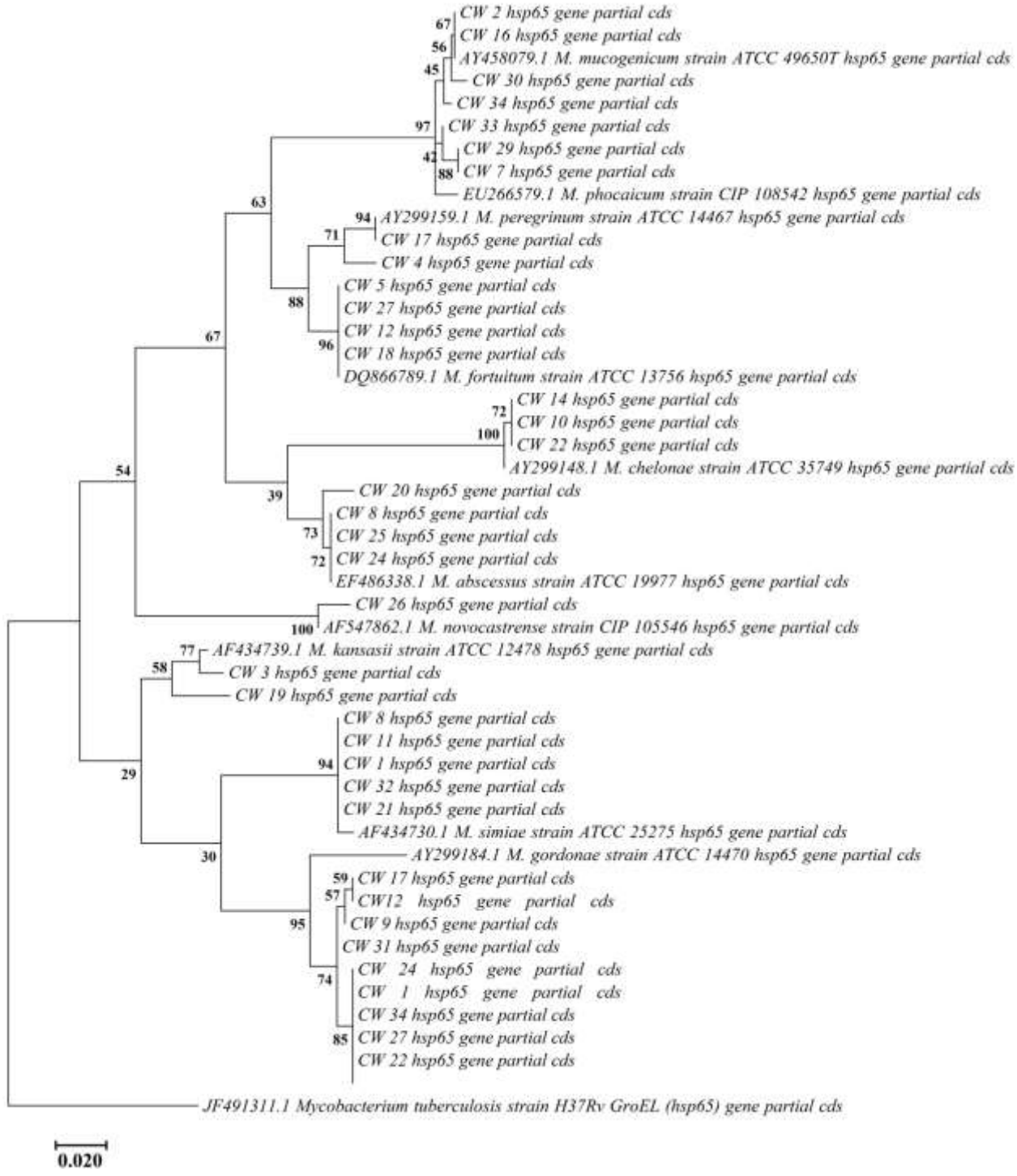
جدول ۴: نام و تعداد گونه های شناسایی شده بر اساس تعیین توالی ژنهای *hsp65*، *16S rRNA* و *rpoB*.

hsp65 gene (441 bp)	*16S rRNA gene (921 bp)*	*rpoB gene (764 bp)*
گونه های شناسایی شده	گونه های شناسایی شده	گونه های شناسایی شده
م. *آبسسوس*	بلی	بلی
م. *چلونه*	بلی	بلی
م. *فوکائیکوم*	خیر	بلی
م. *فورچوئیتوم*	خیر	بلی
م. *گوردونه*	بلی	بلی
م. *کانزاسی*	بلی	بلی
م. *مارینوم*	بلی	بلی
م. *موکوژنیکوم*	بلی	بلی
م. *نووکاسترنس*	خیر	خیر
م. *پاراگوردونه*	خیر	خیر
م. *پره گرینوم*	خیر	بلی
م. *سیمیه*	خیر	بلی

با استفاده از تعیین توالی ۹۲۱ جفت باز از ژن 16S rRNA تنها تعداد ۶ گونه شناسایی شدند. با استفاده از این ژن، م. نووکاسترنس از م. فلاوسنس تشخیص داده نشد و درصد تشابه هر دو گونه یکسان بود. ضمن اینکه مشکل شناسایی گونه های بسیار نزدیک نیز وجود داشت. بطوریکه م. پاراگوردونه از م. گوردونه، م فوکائیکوم و م. پره گرینوم از م. فورچوئیتوم قابل تمایز از یکدیگر نبودند. همچنین م. سیمیه از م. لنتی فلاووم قابل تفکیک نبود.

نتایج حاصل از تعیین توالی ژن rpoB نشان داد، اگر چه اکثر گونه های مایکوباکتریوم با استفاده از تعیین توالی این ژن قابل تشخیص بودند اما بطور کلی نسبت به ژن hs65 درصد تشابه پایین تری را نشان می داد. در مقایسه با ژن 16S rRNA از دقت بالایی برخوردار بود. بطوریکه با آنالیز ژن rpoB می توان گونه های نزدیک از جمله م. فوکائیکوم را از م. موکوژنیکوم و م. پورسینوم را از م. فورچوئیتوم متمایز کرد که با استفاده از آنالیز ژن 16S rRNA قابل تفکیک نبودند. با استفاده از ژن rpoB، م. پاراگوردونه از م. گوردونه قابل تمایز نبود. م. نووکاسترنس دیگر گونه ای بود که با استفاده از این ژن شناسایی نشد.

در شکل ۲ درخت فیلوژنتیکی سویه های جدا شده از نمونه های آب بر اساس تعیین توالی ژن محافظت شدهٔ hsp65 که توالی آنها با سویه های ATCC مقایسه شده اند، نشان داده شده است. برای رسم درخت فیلوژنتیکی از نرم افزار MEGA نسخهٔ ۷ استفاده شد. از سویه استاندارد M. tuberculosis (H37Rv) به عنوان شاخه فرعی (Out Group) استفاده شده است.



شکل۲: درخت فیلوژنتیکی سویه های تشخیص داده شده بر اساس توالی ژن *hsp65* با ۱۰۰ تکرار و مقایسه آنها با سویه های ATCC. از سویهٔ استاندارد *M. tuberculosis H37Rv* به عنوان شاخه فرعی (Out group) استفاده شده است. تفاوت در توالی نوکلئوتیدها بر اساس مقیاس 0.02 نشان داده شده است.

بـحث

شناسایی دقیق مایکوباکتریوم های غیرتوبرکلوزی در سطح گونه به لحاظ متفاوت بودن استراتژی های درمانی از اهمیت بسیاری برخوردار است (۳, ۷). روشهای متفاوتی برای شناسایی این باکتری ها در سطح گونه پیشنهاد شده است. PCR و تعیین توالی ژنهای محافظت شده *16S rRNA*، *hsp65* و *rpoB* یکی از این روش ها است که توسط پژوهشگران مختلف بکار گرفته شده اند (۱۲-۹).

تعدادی از محققان روش توسعه داده شده توسط Telenti و همکاران (۱۳)، یعنی *hsp65* -PRA را برای شناسایی گونه های NTM مورد استفاده قرار داده اند. Sartori و همکاران (۱۶) در کشور برزیل برای تشخیص گونه های NTM نیز از روش پیشنهاد شده توسط Talenti استفاده کرده اند. برتری روش مولکولی تعیین توالی ژن های محافظت شده بخصوص ژن *hsp65* نسبت به سایر روش های مولکولی از جمله PRA به اثبات رسیده است. Scobar و همکاران (۱۷) نتیجه گرفتند که تعیین توالی ژن *hsp65* یک ابزار شناسایی بهتر و دقیقتر برای تمایز گونه های NTM است. این محققان ۱۰٪ از جدایه های NTM را که با استفاده از روش PRA قابل تشخیص نبودند را با استفاده از تعیین توالی ژن *hsp65* شناسایی کردند. در این تحقیق با استفاده از ژن *hsp65*، گونه های متعلق به یک گروه که از نظر ژنتیکی بسیار نزدیک هستند در سطح گونه و زیر گونه شناسایی شدند. لذا به نظر میرسد که این روش بطور موفقیت آمیزی برای تمایز گونه های NTM مورد استفاده قرار گیرد.

نتایج این مطالعه نشان داد که ژن *hsp65* در مقایسه با ژن های *16S rRNA* و *rpoB* از ناهمگنی ژنتیکی بالایی برخوردار است و می تواند در تشخیص گونه هایی که با تعیین توالی ژنهای *16S rRNA* و *rpoB* قابل تشخیص نیستند بکار رود. آنالیز ژن *hsp65* بطور موفقیت آمیزی توسط Kim و همکاران (۱۸) برای تمایز گونه های مایگوباکتریوم بکار رفته است. خسروی و همکاران (۱۹) در خوزستان برای شناسایی گونه های NTM از ۲ روش *hsp65*- PRA و تعیین توالی ژن *rpoB* استفاده کرده اند. Hussein و همکاران (۲۰) در کشور آلمان برای تشخیص گونه های NTM از تعیین توالی ۱۰۳۷ جفت باز از ژن *16S rRNA* استفاده کرده اند. در کشور کره جنوبی Shin و همکاران (۲۱) برای شناسایی گونه های NTM جدا سازی شده از نمونه های آب از روش *rpoB*- PRA استفاده کرده اند. آنها برای گونه هایی که با استفاده از این روش قابل تشخیص نبودند از روش تعیین توالی ژنهای *rpoB* و *hsp65* استفاده کرده اند که استفاده از روش تعیین توالی ژن *hsp65* رضایت بخش بوده است.

تکثیر و تعیین توالی ۹۲۱ جفت باز از ژن *16S rRNA* دارای محدودیت هایی بود. یکی از محدودیت ها این بود که گونه های متعلق به یک گروه قابل تمییز از یکدیگر نبودند. از دیگر محدودیت های این ژن عدم تفکیک *م. فوکائیکوم*، از *م. موکوژنیکوم*، *م. پاراگوردونه* از *م. گوردونه*، *م. سیمیه* از *م. لنتی فلاووم* و همچنین عدم تفکیک *م. آبسسوس* از *م. چلونه* بود. تعیین توالی این ژن بخصوص در تمایز گونه های کند رشد مایکوباکتریوم دارای محدودیت هایی است.

دیباج و همکاران (۲۲) در سال ۲۰۱۲ موفق به جداسازی و شناسایی *م. نووکاسترنس* از نمونه های آب شدند. آنها در مطالعه خود ۱۴۲۰ جفت باز از ژن *16S rRNA* را تعیین توالی کردند. در حالیکه در مطالعهٔ حاضر با استفاده از همین ژن، *م. نووکاسترنس* تشخیص داده نشد. ممکن است دلیل عدم شناسایی *م. نووکاسترنس* و تعدادی از گونه های NTM در استفاده از ژن *16S rRNA* تعیین توالی طول کوتاهتری از این ژن باشد. لذا می توان اینگونه استنباط کرد که برای شناسایی دقیق گونه های NTM با استفاده از ژن *16S rRNA* ، از توالی کامل این ژن استفاده شود.

استفاده از ژن *rpoB* در مقایسه با استفاده از طول کوتاهـتری از ژن *16S rRNA* از دقت و حساسیت بالاتری برخوردار بود. هرچند در استفاده از این ژن، درصد تشابه گونه های NTM بیش از ۹۹٪ مشاهده نشد.

نتیجه گیری

اگرچه ژنهای محافظت شدهٔ زیادی از جمله *16S rRNA* ، *rpoB* و *hsp65* برای تشخیص گونه های مایکوباکتریوم توسط پژوهشگران مختلف مورد استفاده قرار میگیرد، نتایج این تحقیق نشان داد که ژن *hsp65* دارای هتروژنیسیتهٔ بالایی در قیاس با دو ژن دیگر است. همچنین بر خلاف ژن *hsp65*، تعیین توالی بخشی از ژنهای محافظت شدهٔ *16S rRNA* و *rpoB* برای تشخیص دقیق گونه های NTM کافی نیست و لازم است توالی کامل یا یلند تری از این ژنها در تشخیص NTM ها استفاده گردد.

تعارض منافع

تعارض منافع وجود ندارد.

REFERENCES

1. Lopez-Varela E, Garcia-Basteiro AL, Santiago B, Wagner D, van Ingen J, Kampmann B. Non-tuberculous mycobacteria in children: muddying the waters of tuberculosis diagnosis. Lancet Respir Med. 2015;3(3):244-56.
2. Dovriki E, Gerogianni I, Petinaki E, Hadjichristodoulou C, Papaioannou A, Gourgoulianis K. Isolation and identification of nontuberculous mycobacteria from hospitalized patients and drinking water samples--examination of their correlation by chemometrics. Environ Monit Assess. 2016;188(4):247.
3. Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, et al. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. Am J Respir Crit Care Med. 2007;175(4):367-416.
4. Makovcova J, Slany M, Babak V, Slana I, Kralik P. The water environment as a source of potentially pathogenic mycobacteria. J Water Health. 2014;12(2):254-63.
5. Henkle E, Winthrop KL. Nontuberculous mycobacteria infections in immunosuppressed hosts. Clin Chest Med. 2015;36(1):91-9.
6. Al-Anazi KA, Al-Jasser AM, Al-Anazi WK. Infections caused by non-tuberculous mycobacteria in recipients of hematopoietic stem cell transplantation. Front Oncol. 2014;4:311.
7. van Ingen J. Diagnosis of nontuberculous mycobacterial infections. Semin Respir Crit Care Med. 2013;34(1):103-9.
8. Esteban J, Garcia-Pedrazuela M, Munoz-Egea MC, Alcaide F. Current treatment of nontuberculous mycobacteriosis: an update. Expert Opin Pharmacother. 2012;13(7):967-86.
9. Da Costa AR, Lopes ML, Furlaneto IP, de Sousa MS, Lima KV. Molecular identification of nontuberculous mycobacteria isolates in a Brazilian mycobacteria reference laboratory. Diagn Microbiol Infect Dis. 2010;68(4):390-4.
10. Joao I, Cristovao P, Antunes L, Nunes B, Jordao L. Identification of nontuberculous mycobacteria by partial gene sequencing and public databases. Int J Mycobacteriol. 2014;3(2):144-51.
11. Moghim S, Sarikhani E, Nasr Esfahani B, Faghri J. Identification of Nontuberculous Mycobacteria Species Isolated from Water Samples Using Phenotypic and Molecular Methods and Determination of their Antibiotic Resistance Patterns by E- Test Method, in Isfahan, Iran. Iran J Basic Med Sci. 2012;15(5):1076-82.
12. Slany M, Pavlik I. Molecular detection of nontuberculous mycobacteria: advantages and limits of a broad-range sequencing approach. J Mol Microbiol Biotechnol. 2012;22(4):268-76.
13. 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. Journal of clinical microbiology. 1993;31(2):175-8.
14. Adekambi T, Colson P, Drancourt M. rpoB-based identification of nonpigmented and late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. Journal of clinical microbiology. 2003;41(12):5699-708.
15. Harmsen D, Dostal S, Roth A, Niemann S, Rothganger J, Sammeth M, et al. RIDOM: comprehensive and public sequence database for identification of Mycobacterium species. BMC infectious diseases. 2003;3:26.
16. Sartori FG, Leandro LF, Montanari LB, de Souza MG, Pires RH, Sato DN, et al. Isolation and identification of environmental mycobacteria in the waters of a hemodialysis center. Curr Microbiol. 2013;67(1):107-11.

17. Escobar-Escamilla N, Ramirez-Gonzalez JE, Gonzalez-Villa M, Torres-Mazadiego P, Mandujano-Martinez A, Barron-Rivera C, et al. Hsp65 phylogenetic assay for molecular diagnosis of nontuberculous mycobacteria isolated in Mexico. Arch Med Res. 2014;45(1):90-7.
18. Kim H, Kim SH, Shim TS, Kim MN, Bai GH, Park YG, et al. Differentiation of Mycobacterium species by analysis of the heat-shock protein 65 gene (hsp65). Int J Syst Evol Microbiol. 2005;55(Pt 4):1649-56.
19. Khosravi AD, Hashemi Shahraki A, Hashemzadeh M, Sheini Mehrabzadeh R, Teimoori A. Prevalence of Non-Tuberculous Mycobacteria in Hospital Waters of Major Cities of Khuzestan Province, Iran. Front Cell Infect Microbiol. 2016;6:42.
20. Hussein Z, Landt O, Wirths B, Wellinghausen N. Detection of non-tuberculous mycobacteria in hospital water by culture and molecular methods. International journal of medical microbiology : IJMM. 2009;299(4):281-90.
21. Shin JH, Lee EJ, Lee HR, Ryu SM, Kim HR, Chang CL, et al. Prevalence of non-tuberculous mycobacteria in a hospital environment. Journal of Hospital Infection. 2007;65(2):143-8.
22. Dibaj R, Azadi D, Karami M, Naser AD, Shojaei H. First report of isolation of Mycobacterium novocastrense from water supplies. APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica. 2014;122(5):459-61.