بررسی محاسباتی ژن‌هایخانه‌دار در افتراق مایکوباکتریوم‌های غیر سلی

مسعود کیخا[۱]، شهرام شهرکی‌زاهدانی[۲]، حسینعلی راهدار[۳]*

۱. گروه میکروب شناسی و ویروس شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد ، ایران
۲. گروه میکروب‌شناسی، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران
۳. گروه میکروب‌شناسی، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۸/۱۹
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۰/۲۴

چکیده

زمینه و هدف مایکوباکتریوم‌های غیر سلی باکتری‌های اسید فاستی هستند که در منابع محیطی از قبیل: آب، خاک، گردوغبار، شیر و سبزیجات در حال فساد زندگی می‌کنند. براساس طبقه‌بندی رانیون این باکتری‌ها به دو دستهٔ مایکوباکتریوم‌های تند رشد و سخت رشد تقسیم‌بندیمی‌شوند که هر دو گروه آن‌ها از نمونه‌های بالینی جدا می‌شوند. هدف از این مطالعه ارزیابی سه ژن خانه‌دار در شناسایی افتراق مایکوباکتریوم‌های غیر سلی بود.

روش کار در این مطالعه توالی ژن‌های16SrRNA، *rpoB*و *hsp65*بیست‌ودو مایکوباکتریوم تند رشد و سخت رشد از بانک ژنی (آدرس: www.ncbi.nlm.nih.gov) دریافت شد. سپس هر یک از این توالی‌هاهم‌ردیف شدند و به نرم‌افزارMEGA5 انتقال داده شدند. در نهایت درخت فیلوژنتیک براساس هر یک از ژن‌های16SrRNA، *rpoB*و *hsp65*با استفاده از روش Neighbor-joiningو مدل Kimura 2-Parameterرسم شد.

یافته‌ها و بحث تجزیه‌وتحلیل روابط فیلژنتیک بر اساس توالی ژن‌های16SrRNA، *rpoB*و *hsp65*نشان داد که به جز ژن *rpoB*مابقی ژن‌ها نتوانستند برخی گونه‌های مایکوباکتریومی را تشخیص و تفریق دهند. همچنین دریافتیم که ژن *rpoB*بهترین گزینه برای شناسایی مایکوباکتریوم‌های سریع الرشد و کند رشد است.با توجه به مشاهدات این مطالعه به نظر می‌رسد که به‌منظور شناسایی اختصاصی و صحیح مایکوباکتریوم‌های غیر سلی می‌بایستژن‌های*rpoB* و *hsp65*به‌طورهم‌زمان مطالعه شود.

کلیدواژه‌ها:
مایکوباکتریوم‌های غیر سلی، *rpoB*، *rpoB*، *16SrRNA*

مقدمه

مایکوباکتریوم‌های محیطی و یا غیرتوبرکلوزیس یکی از مهم‌ترینباکتری‌های ساکن منابع محیطی از قبیل: آب، خاک، شیر وگردوغبارهستند که قادرند عفونت‌های تنفسی، جلدی، بافت نرم و منتشره را در بیماران نقص سیستم ایمنی و سالم به وجود آورند[۱]. طبق رده‌بندی رانیون مایکوباکتریوم‌ها براساس سرعت رشد به دو گروه اصلی مایکوباکتریوم‌های سریع الرشد و کند رشد تقسیم می‌شوند[۲]؛ طبق شواهد موجود، هر دو گروه از مایکوباکتریوم‌ها از نمونه‌های بالینی جداسازی و گزارش شده‌اند. از مهم‌ترین مایکوباکتریوم‌های تند رشد جدا شده از بیماران می‌توان به مایکوباکتریوم فورچئیتوم، چلونه و آبسسوس اشاره کرد در حالیکه

* نویسندهٔ مسئول: حسینعلی راهدار
نشانی:

تلفن: ۰۹۱۰۳۹۸۳۱۰۹ دورنگار:
رایانه: rahdar_hossein@yahoo.com
شناسه ORCID: 0000-0003-1208-8479
شناسه ORCID نویسنده اول: 0000-0003-1583-9936

مجلهٔ علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، دورهٔ ۲۵، شمارهٔ ۵، آذر و دی ۱۳۹۷، ص
آدرس سایت: http://jsums.medsab.ac.ir رایانامه: journal@medsab.ac.ir
شاپای چاپی: ۷۴۸۷-۱۶۰۶

مایکوباکتریوم‌های آویوم کمپلکس، کانزاسی، گوردونه و سیمیه از شایع‌ترین مایکوباکتریوم‌های سخت رشد نمونه‌های بالینی بیمارستانی است[۳-۴].

روش‌های جداسازی و تشخیص اولیه (رنگ‌آمیزی اسید فاست) مایکوباکتریوم‌های محیطی و توبرکلوزیس مشابه هستند؛ در کشورهایی همچون ایران که بیماری سل اندمیک است این گروه از باکتری‌ها به جای سل اشتباه گرفته می‌شود و به‌عنوان مایکوباکتریوم توبرکلوزیس گزارش می‌شوند؛ با توجه به متفاوت بودن رژیم‌های درمانی عفونت‌های سل و مایکوباکتریوم‌های غیر سلی بیماران درمان نشده و به‌عنوان سل مقاوم به دارو گزارش می‌شوند[۵-۶]. روش‌های فنوتیپیک (مرسوم) شناسایی مایکوباکتریوم‌ها با توجه به‌وقت گیر بودن، هزینه بالا و عدم شناسایی دقیق هویت برخی گونه‌ها نیازمند استفاده از روش‌های مکملی همچون روش‌های مولکولیست[۳،۱]. روش‌هایی مانند: تجزیه‌وتحلیل پلی مورفیسم حاصل از آنزیم‌های محدود کننده (RE) بر ژن‌های *hsp65*، *rpoB* و ITS (16S-23S internal Transcribed Spacer)، توالی‌یابی (Squencing) ژن‌های 16SrRNA، *hsp65*، *rpoB*، *dnaJ*، *dnaK*، *sodA*، *gyrB*، *recA*، *tuf*، *ssrA*، *smpB* و *rpoBC* از پرکاربردترین روش‌های مولکولی شناسایی مایکوباکتریوم‌ها به‌حساب می‌آیند[۷،۳،۱]. هر چند ژن 16SrRNA یکی از بهترین کاندیدهای شناسایی مایکوباکتریوم‌هاست اما مطالعات نشان داده‌اند که این ژن توانایی تشخیص و افتراق گونه‌های نزدیک به هم را ندارد. برای مثال این ژن قادر نیست گونهٔبیماری‌زای مایکوباکتریوم کانزاسی را از باکتری غیرپاتوژن مایکوباکتریوم گاستری تشخیص دهد همچنین ژن16SrRNAنمی‌تواندگونه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس (MTBC) و مایکوباکتریوم آویوم (*M. avium*) را تشخیص دهد. علاوه براین برخی گونه‌های مایکوباکتریومی دو اپرون مختلف rRNA (rRNA operons) را دارند که تشخیص بر اساس ژن‌های16SrRNA و ITS را با ابهام مواجه می‌کند. همچنین طبق مطالعات صورت گرفته در زمینهٔشناسایی گونه‌های مایکوباکتریومی ژن *gyrB* بیشتر برای شناسایی و افتراق مایکوباکتریوم‌های سخت رشد (SGM) کاربرد دارد. طراحی پرایمر برای ژن‌های *dnaJ1* و *sodA* دشوار است و این پرایمرها طی واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (PCR) برای بسیاری از مایکوباکتریوم‌ها محصولی تولید نمی‌کنند. *hsp65* کاندید با ارزش و پرکاربردی در شناسایی مایکوباکتریوم‌هاست اما توانایی تشخیص گونه‌های کمپلکس مایکوباتریوم توبرکلوزیس به جز مایکوباکتریوم آفریکانوم را ندارد. ژن *rpoB* نیز از جمله ژن‌های پرکاربرد در تشخیص مایکوباکتریوم‌هاست که زیرواحد بتا (β) آنزیم DNA پلی مراز را کد می‌کند؛ این ژن با توجه به متحمل شدن جهش در ایزوله‌های کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به ریفامپین نمی‌تواند ژنی مرجع برای تشخیص اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به‌حساب آید[۷،۱].

ازآنجایی‌که شناسایی و معرفی بهترین ژن‌های کاندید برای شناسایی و افتراق گونه‌های مایکوباکتریومی به درک بیشتر ما نسبت به شناسایی مایکوباکتریوم‌ها و در نتیجهگونه‌های بیماریزای مایکوباکتریومی مؤثر و کمک کننده است، از این روهدف از این مطالعه بررسی بیوانفورماتیکی عملکرد ژن‌هایخانه‌دار16SrRNA، *rpoB* و *hsp65* در شناسایی و افتراق سویه‌های مرجع ثبت شده در بانک ژنی (NCBI) بیست‌ودو گونه از مایکوباکتریوم‌های سریع الرشد و سخت رشد بود.

روش کار

دریافت توالی ژن‌های16SrRNA، *rpoB* و *hsp65* مایکوباکتریوم‌های مورد نظر از بانک اطلاعاتی NCBI

نخست توالی ژن‌های مورد نظر برای ۲۲ گونهٔ تند رشد و سخت رشد مایکوباتریوم‌های غیرتوبرکلوزیس را از بانک ژنی موجود در بانک اطلاعاتی NCBI(به آدرس: https://www.ncbi.nlm.nih.gov) به فرمت FASTA دریافت شد. شایان ذکر است مایکوباکتریوم‌های سریع الرشد انتخاب شده برای این مطالعه شامل: مایکوباکتریوم فارسینوژنس (*M. farcinogenes*)مایکوباکتریوم سنگالنس (*M. senegalense*)، مایکوباکتریوم موکوژنیکوم (*M. mucogenicum*)، مایکوباکتریوم کانارینس (*M. canariense*)، مایکوباکتریوم چلونه (*M. chelonae*)، مایکوباکتریوم اسمگماتیس (*M. smegmatis*)، مایکوباکتریوم فورچئیتوم (*M. fortuitum*)، مایکوباکتریوم نواکاسترنس (*M. novacastrense*)، مایکوباکتریوم آبسسوس (*M.abscessus*)، مایکوباکتریوم پرگرینوم (*M. peregrinum*)، مایکوباکتریوم ستنس (*M. setense*) و مایکوباکتریوم‌های سخت رشد وارد شده در این مطالعه مایکوباکتریوم سیمیه (*M. simiae*)، مایکوباکتریوم آویوم زیرگونه پاراتوبرکلوزیس (*M. aviumsubsp. paratuberculosis*)، مایکوباکتریوم مارینوم (*M.marinum*)، مایکوباکتریوم کوکی (*M. cookii*)، مایکوباکتریوم لنتیفولوم(*M. lentiflavum*)، مایکوباکتریوم گزنوپی (*M. xenopi*)، مایکوباکتریوم ترآ (*M. terrae*)، مایکوباکتریوم

اولسرانس (*M. ulcerans*)، مایکوباکتریوم گوردونه (*M. gordonae*)، مایکوباکتریوم گاستری (*M. gastri*)، مایکوباکتریوم کانزاسی (*M. kansasii*) بودند.

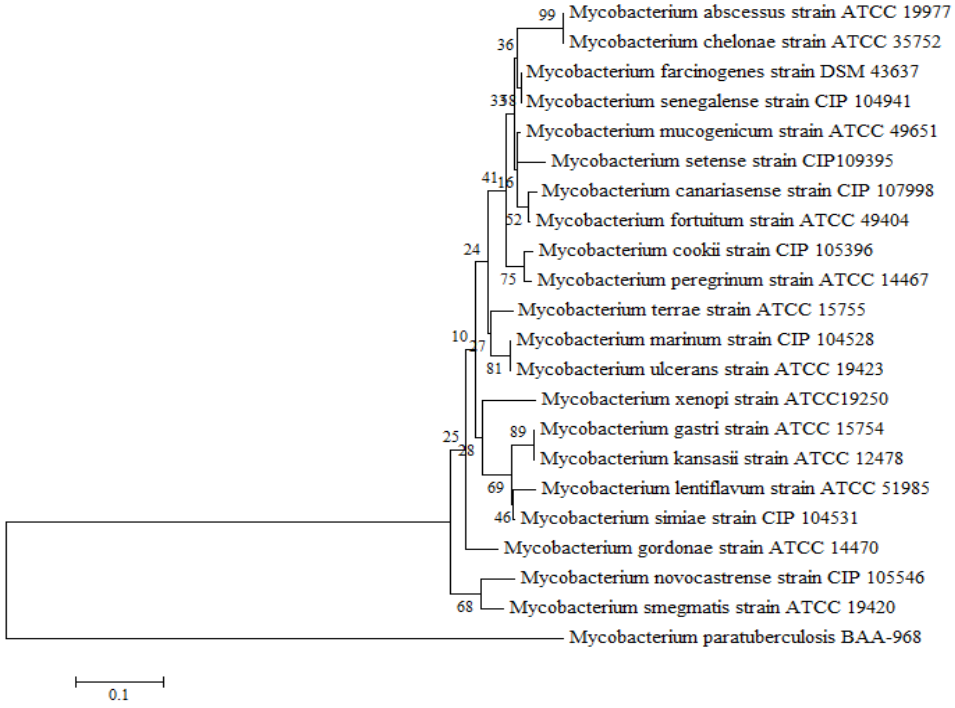
تجزیه‌وتحلیل داده‌ها و رسم درخت فیلوژنیک

توالی‌های دریافت شده به‌طور جداگانه برای هر ژن توسط نرم‌افزارClustalW2 هم ردیف (Alignment) شدند.شایان ذکر است که پایگاه اینترنتی Clustal یکی از مهم‌ترین بانک‌های اطلاعاتی اینترنتی است که به‌منظور هم ردیف ساختن توالی‌های ژنی و پروتئینی و همچنین بررسی روابط فیلوژنیک استفاده می‌شود؛ همچنین ضرورت هم ردیف کردن (Alignment)توالی‌های مختلف پروتئینی و اسیدهای نوکلئیک به این دلیل است که نقاط مشترک و اختلاف توالی‌های مورد بررسی مشخص شود. سپس به‌منظور بررسی کارایی هر ژن در شناسایی و افتراق گونه‌های تند رشد و سخت رشد بر اساس هر ژن به‌طور جداگانه درخت فیلوژنتیکی با استفاده از آزمون Neighbor-joining و با روش K2P (Kimura 2-Parameter model)، و همچنین عدد bootstrap محاسبه شده با 1000 Replication توسط نرم‌افزارMEGA5 رسم شد[۸].نرم‌افزارMEGA از جمله بهترین نرم‌افزارهایرایانه‌ای برای محاسبه و تحلیل آماری تغییرات و تحولات توالی‌هایژن‌ها در طول تکامل است؛ مهم‌ترین کاربرد این نرم‌افزار محاسبه و رسم درخت فیلوژنتیک بوده که برای این منظور؛ روش‌ها و مدل‌های مختلفی ارائه شده و می‌توان بسته به هدف مناسب‌ترین درخت فیلوژنتیک را ترسیم کرده و دوری و نزدیکی گونه‌های موجود در یک خانواده از میکروارگانیسم‌ها را در طول تکامل بررسی کرد.

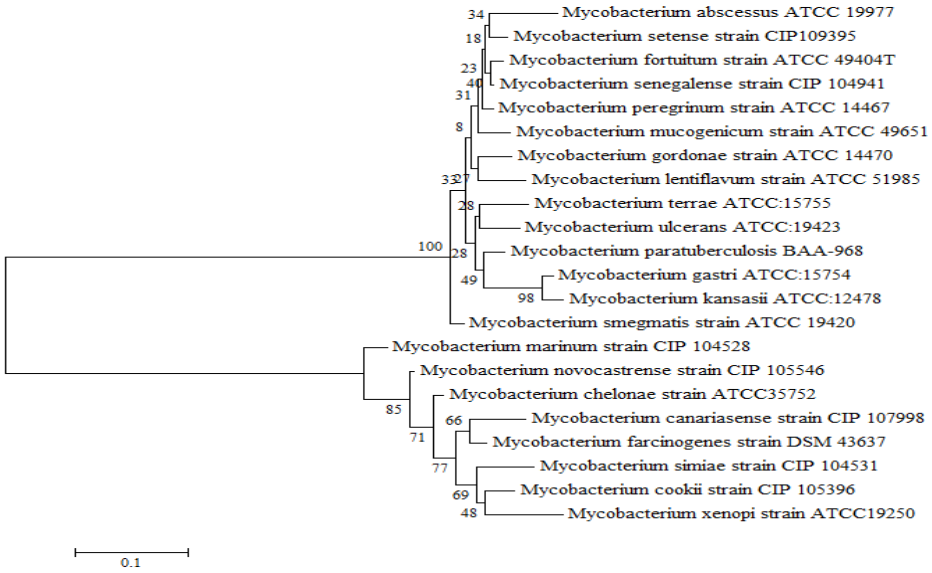
یافته‌ها و بحث

عملکرد ژن 16S rRNA در جداسازی مایکوباکتریوم‌ها

به‌طورکلی درخت فیلوژنتیک بر پایه این ژن ۸ گره (node) با bootstrap vlue بیش از ۵۰٪ دارد(شکل ۱). مایکوباکتریوم‌های افتراق داده شده توسط این ژن در شخه‌های متعدد با bootstrap valueنسبتاً پایینی قرار گرفته‌اند.بر اساس این ژن مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس به تنهایی در یک شاخه قرار دارد و نکته جالب این که بر اساس این ژن مایکوباکتریوم نوکاترنس و مایکوباکتریوم اسمگماتیس هر دو در یک شاخه قرار گرفته‌اندحال‌آنکه مایکوباکتریوم نوکاسترنس یک مایکوباکتریوم سریع الرشد است. این ژن توانایی تشخیص و افتراق گونه‌های مایکوباکتریوم آبسسوس را از چلونه، مایکوباکتریوم فارسینوژنز را از سنگالنس، مایوباکتریوم مارینوم را از اولسرانس، گونه بیماری‌زای مایکوباکتریوم کانزاسی را از گونهٔ غیر پاتوژن مایکوباکتریوم گاستری را ندارد. به نظر می‌رسد عملکرد این ژن در افتراق مایکوباکتریوم‌های مورد بررسی این پژوهش چندان چشمگیر نیست.



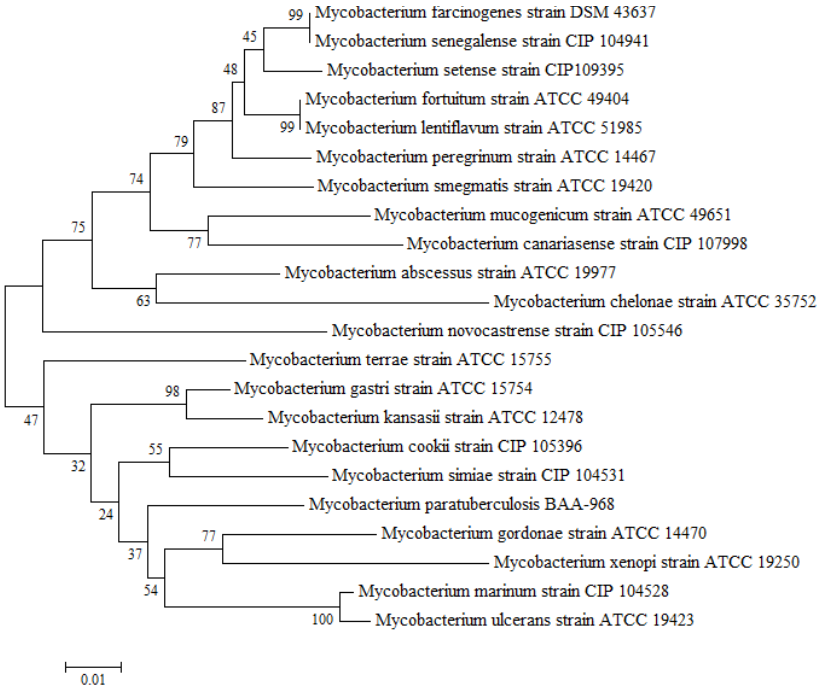
شکل ۱. درخت فیلوژنتیک مایکوباکتریوم‌ها بر اساس ژن 16SrRNA



شکل ۲. درخت فیلوژنتیک مایکوباکتریوم‌ها براساس ژن *rpoB*

عملکرد ژن *rpoB* در جداسازی مایکوباکتریوم‌ها

درخت فیلوژنتیک حاصل از این ژن حاوی ۷ گره با bootstrap value بیش از ۵۰درصد است. به‌طورکلی این ژن تمامی مایکوباکتریوم‌ها را در سه کلاد (دسته) اصلی تقسیم‌بندی کرده است کهاین ژن تمامی گونه‌های مایکوباکتریومی را شناسایی و افتراق داده است. طبق شکل ۲ مایکوباکتریوم‌های سریع الرشد چون مایکوباکتریوم کانارینس و فارسینوژنز همراه با مایکوباکتریوم‌های سختی رشدی چون مایکوباکتریوم سیمیه، کوکی و گزنوپی در یک زیر شاخه قرار گرفته‌اند. با توجه به درخت فیلوژنتیک حاصل این ژن می‌توانتیجه‌گیری کرد که عملکرد این ژن در جداسازی و افتراق مایکوباکتریوم‌ها نسبت به ژن16S rRNA قابل قبول‌تر است.



شکل ۳. درخت فیلوژنتیک مایکوباکتریوم‌ها بر اساس ژن *hsp65*

عملکرد ژن *hsp65* در جداسازی مایکوباکتریوم‌ها

درخت فیلوژنتیک حاصل از این ژن حاوی ۱۲ عدد گره با bootstrapvalue بیش از ۵۰درصداست. صرف‌نظر مایکوبکتریوم لنتیفولوم (سخت رشد) که همراه مایکوباکتریوم فورچئیتوم (تند رشد) با هم در یک زیر شاخه قرار گرفته‌اند، این ژن به درستی گونه‌های تند رشد و سخت رشد را در دو کلاد کلی قرار داده است. براساس شکل ۳ این ژن توانایی تشخیص گونه‌های مایکوباکتریوم فارسینوژنز از مایکوباکتریوم سنگالنس و مایکوباکتریوم لنتیفولوم از مایکوباکتریوم فورچئیتوم را ندارد. هر چند عملکرد ژن *hsp65* در جداسازی و افتراق گونه‌های مایکوباکتریومی بهتر از ژن 16SrRNAاست؛ اما در مقایسه با ژن *rpoB* عملکرد ژن *hsp65*ضعیف‌تر است و به نظر می‌رسد ژن *rpoB* در مقایسه با ژن‌های*hsp65* و 16SrRNAگونه‌های مایکوباکتریومی را بهتر تشخیص و افتراق می‌دهد.

افزایش گزارش‌هایعفونت‌های بیمارستانی ناشی از مایکوباکتریوم‌های غیر توبرکلوزیس در سال‌های اخیر موجب شده که این مسئلهبه‌عنوان یکی از معضلات اخیر سیستم‌های بهداشتی در سراسر جهان شناخته شود. باوجوداینکهاز دیربازاعضای کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس رامهم‌ترین پاتوژن‌های انسانی می‌شناسند؛ اما با پیشرفت علوم مولکولی در قرن اخیر و پی بردن به جایگاه مایکوباکتریوم‌های محیطی در ایجاد عفونت‌های مختلف بیمارستانی،می‌بایست در حوزهٔ مایکوباکتریولوژی این اعتقاد به وجود آید که آزمایشگاه‌های تشخیص طبی مایکوباکتریوم‌ها را تا سطح گونه شناسایی کنند[۹]. همان‌طور که اشاره شد روش‌هایمرسوم از قبیل: سرعت رشد، مورفولوژی کلنی، تولید پیگمان، تجمع نیاسین، احیای نیترات، هیدرولیز توئین، جذب آهن، توانایی رشد در محیط مک کانکی آگار بدون کریستال ویوله، تحمل نمک ۵درصد، کاتالاز، آریل سولفاتاز، اوره آز و رشد در دماهای مختلف هر چند به‌عنوان استاندارد طلایی شناخته می‌شوند؛ اما با توجه به نیازمندی به تکنسین‌های آموزش دیده، وقت‌گیر بودن و پرهزینه بودن روش‌های مرسوم پیشنهاد می‌شود از روش‌های مولکولی استفاده شود؛ روش‌های مولکولی ساده، کم‌هزینه و سریع هستند و درعین‌حالگونه‌های مایکوباکتریومی را با دقت و صحت بسیار بالایی تشخیص و افتراق می‌دهند[۳]. از شناخته‌شده‌ترینروش‌هابرای شناسایی مایکوباکتریوم‌ها می‌توان به روش تعیین توالی با استفاده از ژن‌های16SrRNA، *rpoB*، *hsp65* و *IS6110* اشاره کرد که به‌طور متعدد در مطالعات مختلف به کار می‌روند[۷،۳].

با توجه به اینکه عفونت‌های ریوی مایکوباکتریوم‌های محیطی و بیماری سل به تظاهرات بالینی و یافته‌های رادیولوژیک بسیار مشابه هستند ممکن است در مواردی عفونت‌های تنفسی مایکوباکتریوم‌های غیر سلی به‌عنوان بیماری سل در نظر گرفته شود؛ طبق گزارش‌های موجود، برخی گزارش‌ها مربوط به سل مقاوم به دارویی که از کشورهای در حال توسعه منتشر می‌شود اشتباه است؛ در واقع با توجه به اینکه روش‌های جداسازی، نتایج کشت و رنگ‌آمیزی مایکوباکتریوم‌های غیر سلی و مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مشابه است و همچنین در بسیاری از آزمایشگاه‌های مایکوباکتریولوژی کشورهای در حال توسعه، مایکوباکتریوم‌ها تا سطح گونه شناسایی نمی‌شوندازاین‌رو مایکوباکتریوم‌های محیطی تشخیص داده نمی‌شوند؛ همچنین باید توجه داشت رژیم درمانی سل و عفونت‌های مایکوباکتریوم‌های غیر سلی متفاوت است و در موارد تشخیص اشتباه بیماران رژیم درمانی ضد سل را دریافت می‌کنند، با توجه به اینکه مایکوباکتریوم‌های محیطی معمولاً نسبت به داروهای ضد سلی مقاومند بنابراین بیمار بهبود نیافته و به‌عنوان سل مقاوم به دارو گزارش می‌شود[۱،۵-۶].

در مطالعهٔ Devulder و همکارانش در خصوص شناسایی و افتراقنودوهفتگونهٔ مایکوباکتریومی با استفاده از چهار ژن خانه‌دار(housekeeping genes) 16SrRNA، *rpoB*، *hsp65* و *sodA* طی این مطالعه مشخص شد درخت فیلوژنتیک بر اساس ژن *rpoB* عملکرد قابل‌قبول‌تری را نسبت به مابقی ژن‌ها ارائه کرد. در مطالعهٔ ما نیز مشابه این مطالعه ژن *rpoB* توانست تمامی مایکوباکتریوم‌های مورد بررسی را تفکیک و شناسایی کند. همچنین طی این مطالعه در بررسی روابط فیلوژنتیکی بر اساس هر ۴ ژن به‌طورهم‌زمان مشخص شد که به‌کارگیری چند ژن هم‌زمان نتایج بهتری دارد[۱۰]. طی مطالعهٔ دیگری که بر ۲۰ گونهٔ سریع‌الرشد مایکوباکتریومی جدا شده از نمونه‌های بالینی کشورمان صورت گرفت سه روش شناسایی مایکوباکتریوم‌ها از قبیل تست‌های فنوتیپیک (مرسوم)، *hsp65*-RFLLP و توالی‌یابی ژن *rpoB*ارزیابی شدند. طی این بررسی مشخص شد که توالی‌یابی ژن *rpoB* قادر است مایکوباکتریوم‌های سریع‌الرشد را بهتر از دو روش دیگر تشخیص دهد[۱۱]. شایان ذکر است در خصوص شناسایی باکتری‌ها عوامل مختلفی همچون تنوع ژنتیکی تصادفی، انتقال افقی ژن و نوترکیبی ژن‌ها از جمله مواردی هستند که شناسایی مولکولی باکتری‌ها را با چالش روبه‌رومی‌کند، دانشمندان برای رفع این چالش تکنیک‌هایی از قبیل MLSA (Multi-locus sequence analysis) را پیشنهاد می‌دهند که

در این روش چند ژن خانه‌داربه‌طورهم‌زمان مطالعه و بررسی می‌شوند [۱۲]. براساس مطالعهٔ Ade´kambi در زمینهٔ شناسایی نوزده گونه از مایکوباکتریوم‌های سریع‌الرشد با استفاده از توالی کامل ژن‌های16S rRNA، *hsp65*، *sodA*، *recA* و *rpoB* که انجام شد. طی ارزیابی‌های اولیه روابط فیلوژنتیکی مایکوباکتریوم‌ها بر اساس هر ژن به تنهایی نتایجی مشابه نتایج مطالعهٔ حاضر به دست آمد و ژن *rpoB* در مقایسه با دیگر ژن عملکرد بهتری را در افتراق مایکوباکتریوم‌ها ارائه کرده بود هر چند در مواردی نتوانسته بود برخی مایکوباکتریوم‌ها را تشخیص دهد اما طی بررسی هم‌زمانچند ژن ذکر شده مشخص شد که بهترین راه برای تشخیص مایکوباکتریوم،مطالعهٔ هم‌زمان چند ژن و طی نتایج به‌دست‌آمده از این مطالعه درخت فیلوژنتیک حاصل از بررسی هم‌زمانژن‌های*rpoB* و *recA* نسبت به بقیهٔ ژن‌هامناسب‌ترارزیابی شد[۸]. همچنین طی مطالعهٔ دیگری در این زمینه و با استفاده از ژن‌های۴۶ گونه از مایکوباکتریوم‌های کند و سریع‌الرشد با استفاده از ژن‌های*rpoBC*، *dnaK* و *hp65* صورت گرفت مشخص شد که بررسی روابط فیلوژنیک با استفاده از *dnaK* نتیجه بهتری از *hsp65* را ارائه می‌دهد و همچنین مشخص شد که شناسایی و افتراق مایکوباکتریوم‌ها با استفاده از ژن‌های*rpoB* و *rpoC* (*rpoBC*) در مقایسه با دو ژن دیگر نتیجه بهتری را دربر دارد[۷]. طبق مطالعه Bhattacharya و همکارانش مشخص شد که Multiplex-PCR تکنیکی ارزشمند در تشخیص و افتراق مایکوباکتریوم‌های سلی و غیر سلی است؛ در این مطالعه از ژن‌های*hsp65* و *dnaJ* برای شناسایی مایکوباکتریوم‌های غیر سلی و همچنین قطعه الحاقی *IS6110* برای شناسایی مایکوباکتریوم‌های سلی استفاده شد؛ در این مطالعه مشخص شد که این روش با اختصاصیت بالای ۹۰ درصد قادر است تا مایکوباکتریوم‌های سلی و غیر سلی را از هم افتراق دهد[۱۳]. در مطالعه‌ای دیگر از نخستین گزارش جداسازی و شناسایی *Mycobacterium massiliense* مشخص شد که ژن 16S rRNA قادر به افتراق این‌گونه از مایکوباکتریوم آبسسوس نبوده و مطالعهٔ توالی ژن‌های*hsp65* و *sodA* موجب شد تا این‌گونه از کمپلکس مایکوباکتریوم آبسسوس افتراق داده شود[۱۴]. طی مطالعات بلندمدت در زمینهٔ افتراق و شناسایی اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم آبسسوس (*Mycobacterium abscessus*) مشخص شد که ژن *rpoB* در مقایسه با دیگر ژن‌هایخانه‌دار عملکرد بهتری دارد اما برای شناسایی و افتراق کامل و دقیق گونه‌های موجود در کمپلکس مایکوباکتریوم آبسسوس می‌بایست توالی چند ژن خانه‌دار بررسی شود و استفاده از تکنیک‌هایی از قبیل ترادف‌یابی چند جایگاهی (Multi-locus sequence analysis) یکی از بهترین و قدرتمندترین این روش‌هاست[۱۵].

به‌طورکلی، با توجه به متفاوت بودن درمان عفونت‌های مایکوباکتریوم‌های سلی و مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و همچنین تشابهات تظاهرات بالینی و عکس‌های رادیولوژیک عفونت‌های این دو گروه از مایکوباکتریوم‌ها ضروریاست مایکوباکتریوم‌ها تا سطح گونه شناسایی شوند؛ با توجه به زمان‌بر بودن و هزینه‌های فراوانی که تست‌های تشخیصی مرسوم مایکوباکتریوم‌ها دارند می‌توان برای شناسایی و تعیین گونهٔ میکوباکتریوم‌ها از روش‌های مولکولی نظیر تعیین توالی ژن‌هایخانه‌داری همچون: 16S rRNA، *rpoB* و *hsp65* استفاده کرد[۱۶].

نتیجه‌گیری

بر اساس این مطالعه در رابطه با شناسایی و افتراق مایکوباتریوم ها، ژن *rpoB* در مقایسه با ژن‌های16S rRNA و *hsp65* بهتر عمل می‌کند. هر چند در مواردی مشاهده شد که ژن *rpoB* ماکوباکتریوم‌ها را با bootstrap valueهای پایینی جدا کرده است ولی نکتهٔ قابل‌توجه این بود که این ژن تمامی گونه‌های مایکوباکتریومی را شناسایی و تفریق داد؛ همچنین برای رفع این مشکل پیشنهاد می‌شود که دو یا چند ژن به‌طورهم‌زمان مطالعه شوند.

References

[1]. Keikha M. The importance of molecular techniques in identification and phylogenetic studies of Non Tuberculosis Mycobacteria. Iranian journal of medical microbiology. 2017;10(6):72-75.
[2]. Runyon EH. Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. Medical Clinics of North America. 1959;43(1):273-90.
[3]. ZakerBostanabad S, Heidarieh P, Sheikhi N, Ghalami M, Pour Azar S, Nojumi S A et al . Identification of Clinical Isolates of Mycobacteria Recovered from Iranian Patients by Phenotypic and Molecular Methods. NCMBJ. 2012; 2 (7) :49-56.
[4]. Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, Holland SM, Horsburgh R, Huitt G, Iademarco MF, Iseman M, Olivier K, Ruoss S, von Reyn CF, Wallace RJ Jr, Winthrop K, et al. An Official ATS/IDSA Statement: Diagnosis, Treatment, and Prevention of Nontuberculous Mycobacterial Diseases. Am J RespirCrit Care Med. 2007 15;367-416.
[5]. Azadi D, Shojaei H. The role of the laboratory in the diagnosis of tuberculosis. Iran J Med Microbiol. 2016; 10 (2) :1-15.
[6]. Nasiri MJ, Dabiri H, Darban-Sarokhalil D, Shahraki AH. Prevalence of non-tuberculosis mycobacterial infections among tuberculosis suspects in Iran: systematic review and meta-analysis. PloS one. 2015;10(6):e0129073.
[7]. Dai J, Chen Y, Dean S, Morris JG, Salfinger M, Johnson JA, et al. Multiple-genome comparison reveals new loci for

Mycobacterium species identification. Journal of clinical microbiology. 2011;49(1):144-53.
[8]. Adékambi T, Drancourt M. Dissection of phylogenetic relationships among 19 rapidly growing Mycobacterium species by 16S rRNA, *hsp65*, *sodA*, *recA* and *rpoB* gene sequencing. International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2004;54(6):2095-105.
[9]. Hashemi-Shahraki A, ZakerBostanabad S, Heidarieh P, Titov L P , Khosravi A, Sheikhi N, Ghalami M, Nojoumi A, et al. Species Spectrum of Nontuberculous Mycobacteria Isolated from Suspected Tuberculosis Patients, Identificationby Multi Locus Sequence Analysis. Infection, Genetics and Evolution. 2013; 24,20: 312-24.
[10]. Devulder G, de Montclos MP, Flandrois J. A multigene approach to phylogenetic analysis using the genus Mycobacterium as a model. International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2005;55(1):293-302.
[11]. Nasiri MJ, Shahraki AH, Fooladi AAI, Dabiri H, Feizabadi MM. rpoB Gene Sequencing for Identification of Rapidly Growing Mycobacteria. Archives of Pediatric Infectious Diseases. 2016[in press].
[12]. Salehipour M, ZakerBostanabad S, Rezaee S, Hashemi-Shahraki A. Species spectrum of pathogenic Nocardia isolated from patients. NCMBJ. 2016; 6 (21) :75-84.
[13]. Bhattacharya B, Karak K, Ghosal AG, Roy A, Das S, Dandapat P, Khetawat D, Mondal DK, Bhattacharya S, Chakrabarti S, et al. Development of a new sensitive and efficient multiplex polymerase chain reaction (PCR) for identification and differentiation of different mycobacterial species. Tropical Medicine & International Health. 200;8(2):150-7.
[14]. Adékambi T, Reynaud-Gaubert M, Greub G, Gevaudan MJ, La Scola B, Raoult D, Drancourt M, et al. Amoebalcoculture of "Mycobacterium massiliense" sp. nov.from the sputum of a patient with hemoptoic pneumonia. Journal of clinical microbiology. 2004:42(12):5493-501.
[15]. Zelazny AM, Root JM, Shea YR, Colombo RE, Shamputa IC, Stock F, Conlan S, McNulty S, Brown-Elliott BA, Wallace RJ, Olivier KN, et al. Cohort study of molecular identification and typing of Mycobacterium abscessus, Mycobacterium massiliense, and Mycobacterium bolletii. Journal of clinical microbiology. 2009;47(7):1985-95.
[16]. Jacobs SE, Zhong E, Hartono C, Satlin MJ, Magro CM, Jenkins SG, Westblade LF. The Brief Case: Disseminated *Mycobacterium haemophilum* Infection in a Kidney Transplant Recipient. Journal of clinical microbiology. 2018;56(1):e00561-17.

Computational study of Housekeeping Genes in Differentiation of Non–Tuberculosis Mycobacteria

Masoud Keikha[1], Shahram Shahraki-Zahedani[2], Hossein Ali Rahdar[3*]

1. M.Sc. Student, Department of Microbiology, School of Medicine and Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2. Department of Microbiology, School of Medicine, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran
3. Department of Microbiology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives Non-tuberculosis mycobacteria is acid-fast bacteria that lives in environmental sources such as water, soil, dust, milk and decaying vegetables. Based on Runyon's classification, these bacteria classified in tow group of slow and rapid growing mycobacteria; Both of them isolated from clinical specimens. The purpose of this study is evaluation of three housekeeping genes in identification and differentiation of non-tuberculosis mycobacteria.

Materials & Methods In our study, we obtained 16S rRNA, *rpoB* and *hsp65* sequences of 22 slow and rapid growing mycobacteria from Genebank (www.ncbi.nlm.nih.gov). Then, these sequences aligned and transferred to MEGA 5.0 program. Finally, phylogenetic relationships were determined by constructing 16S rRNA, *rpoB* and *hsp65* genes tree using the neighbor-joining method with Kimura 2-Parameter model.

Results and Conclustion Phylogenetic analysis based on 16S rRNA, *rpoB* and *hsp65* gene sequences indicated that except of *rpoB* gene. Other genes cannot identificate and separate of some species. Also we found that for identification both of rapid growth mycobacteria (RGM) and slow growth mycobacteria (SGM) *rpoB* gene is the best option. Due to findings of this study, it seems that for appropriate and accurate identification of non-tuberculosis mycobacteria, we must studied *rpoB* and *hsp65* genes simultaneously.

Received: 2017/11/10
Accepted: 2018/01/14

Keywords: *hsp65*, non-tuberculosis mycobacteria, *rpoB*, 16S rRNA.