Letters to the Editor

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 10, Number 6 (January - February)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Farname Inc.

The importance of molecular techniques in identification and phylogenetic studies of *Non Tuberculosis Mycobacteria*

Masoud Keikha

Department of Medical Microbiology, Isfahan Medical School, Isfahan, Iran

Article Information

Article history:
Received: 2016/09/04
Accepted: 2016/11/21
Available online: 2017/02/05

Article Subject:
Molecular Microbiology

IJMM 2017; 10(6): 78-81

Corresponding author at:

Masoud Keikha

Department of Medical Microbiology, Medical School, Isfahan Medical School, Isfahan, Iran

Tel: 0989386836425

Email:
Masoud.keykha90@gmail.com

Abstract

Due to immune deficiency diseases (cancer, transplant recipients and HIV) environmental mycobacteria infections are increasing. Forasmuch as the clinical symptons of environmental mycobacteria lung infections and tuberculosis are similar, due to difference of diet therapy between environmental mycobacterium infections and *Mycobacterium tuberculosis*, it is necessary to identify and differentiate *Mycobacterium* species. Molecular methods seem to be a useful tool for detection and differentiation of *Mycobacterium* species.

KeyWords: *Nontuberculosis Mycobacteria*, *hsp65*, *rpoB*, 16S rRNA

Copyright © 2017 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Keikha M. The importance of molecular techniques in identification and phylogenetic studies of *Non Tuberculosis Mycobacteria.* Iran J Med Microbiol. 2017; 10 (6): 72-75

نامه به سردبیر

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۰ – شماره ۶ – بهمن و اسفند ۱۳۹۵

Journal homepage: www.ijmm.ir

Farname Inc.

اهمیت روش های مولکولی در شناسایی و مطالعات فیلوژنیک *مایکوباکتریوم های محیطی*

مسعود کیخا

گروه میکروب‌شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۵/۰۶/۱۴

پذیرش:۱۳۹۵/۰۹/۰۱

انتشار آنلاین:۱۳۹۵/۱۱/۱۷

موضوع:

میکروب‌شناسی مولکولی

IJMM 1395; 10(6): 78-81

نویسنده مسئول:

مسعود کیخا

میکروب‌شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

تلفن: ۰۹۸۹۳۸۶۸۳۶۴۲۵

پست الکترونیک:

Masoud.keykha90@gmail.com

چکیده

امروزه با توجه به افزایش بیماران نقص سیستم ایمنی (سرطان، دریافت‌کنندگان پیوند و ایدز) عفونت‌های حاصل از مایکوباکتریوم های محیطی در حال افزایش است. ازآنجایی‌که تظاهرات بالینی عفونت‌های ریوی مایکوباکتریوم های محیطی و بیماری سل مشابه هستند و با توجه به اینکه رژیم‌درمانی عفونت‌های *مایکوباکتریوم های محیطی* و *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* متفاوت است؛ لذا شناسایی و افتراق گونه‌های *مایکوباکتریوم* امری ضروری به‌حساب می‌آید. روش‌های مولکولی ابزار مفیدی جهت تشخیص و افتراق گونه‌های *مایکوباکتریوم* می‌باشد.

کلمات کلیدی: *مایکوباکتریوم غیر توبرکلوزیس*، *hsp65*، *rpoB*، 16S rRNA

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

سردبیر محترم مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

مایکوباکتریوم های محیطی که *مایکوباکتریوم های آتیپیک* (*Non-Tuberculosis Mycobacterium*) نیز نامیده و غیر سلی می‌شوند اغلب به‌صورت ساپروفیت در آب، خاک، شیر، ذرات گردوغبار و حیوانات حضور دارند. تا اوایل ۱۹۵۰ تصور می‌شد مایکوباکتریوم های محیطی برای انسان بیماری‌زا نیستند، درحالی‌که امروزه این دسته از باکتری‌ها به‌عنوان مهم‌ترین عامل عفونت‌های فرصت طلبانه ناشی از محیط شناخته می‌شوند. شواهد زیادی مبنی بر وجود *مایکوباکتریوم های آتیپیک* (NTM) در منابع آبی وجود دارد و آب به‌عنوان یکی از مهم‌ترین منابع انتقال عفونت‌های مایکوباکتریوم های آتیپیک در بین انسان‌ها به‌حساب می‌آید (۲-۱). عفونت‌های حاصل مایکوباکتریوم های محیطی اغلب به‌صورت عفونت‌های ریوی، جلدی، بافت نرم و عفونت‌های منتشر بوده که بیماران نقص سیستم ایمنی و حتی افراد با سیستم ایمنی کارآمد را نیز تحت تأثیر قرار می‌دهند. گونه‌های *مایکوباکتریوم فورچئیتوم* (*Mycobacterium fortuitum*)، *مایکوباکتریوم کانزاسی* (*Mycobacterium kansasii*) و *مایکوباکتریوم سیمیه* (*Mycobacterium simiae*) شایع‌ترین مایکوباکتریوم های محیطی جداشده از بیماران کشورمان می‌باشند (۵-۳).

شناسایی *مایکوباکتریوم های محیطی* توسط روش‌های فنوتیپیک (کشت و استفاده از تست‌های بیوشیمیایی) زمان‌بر بوده و در برخی موارد منجر به‌اشتباه در تشخیص می‌گردد (۶،۱). روش‌های مولکولی ابزار مفیدی جهت تشخیص و افتراق گونه‌های *مایکوباکتریوم* می‌باشند. این روش‌ها از حساسیت و دقت بالایی برخوردار بوده و در مقایسه با روش‌های فنوتیپیک از سرعت بالاتری برخوردارند، ازجمله روش‌های مولکولی که برای شناسایی و افتراق گونه‌های *مایکوباکتریوم* مورداستفاده قرار می‌گیرند می‌توان به روش‌های: DNA probes، PCR-RFLP، Multiplex Real-time PCR، Microarray Technology، Real-time PCR و توالی یابی اشاره کرد (۸-۷). ژن‌هایی که جهت شناسایی و افتراق گونه‌های *مایکوباکتریوم* استفاده می‌شود شامل: 16S rRNA، *rpoB*، *hsp65*، *dnaK*، *sodA*، *gyrB*، *recA1*، *dnaJ1*، *tuf*، *ssrA*، *smpB* و 16S-23S rRNA internal transcribed spacer (ITS) می‌باشند (۹،۷). تکنیک توالی یابی (Sequencing) ژن 16S rRNA به‌عنوان روش مرجع (Reference method) جهت شناسایی و گونه‌های غیرمعمول و شناخته‌نشده مایکوباکتریومی می‌باشد، این ژن حاوی توالی بسیار حفاظت‌شده‌ای بوده و شناخته‌شده‌ترین شاخص جهت شناسایی و طبقه‌بندی گونه‌های *مایکوباکتریوم* محسوب می‌شود (۱۱،۱۰،۸). سایر ژن‌های ذکرشده کاربرد کمتری دارند به‌عنوان‌مثال: ژن *gyrB* تنها جهت شناسایی و افتراق گونه‌های کند رشد مایکوباکتریومی قابل‌استفاده است (۹). همچنین استفاده از ژن *dnaJ1* به دلیل عدم شناسایی برخی گونه‌های مایکوباکتریومی مناسب نیست به‌عنوان‌مثال: این ژن توانایی تفریق گونه‌های *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* (*M.tuberculosis*) از *مایکوباکتریوم اینترمدیوم* (*M.intermedium*) را ندارد (۹). طبق مطالعات انجام‌شده ژن *sodA* نیز توانایی افتراق ۱۵ گونه مایکوباکتریومی را نداشته و بنابراین توصیه می‌شود این ژن‌ها به‌تنهایی مورداستفاده قرار نگیرند (۹)؛ ژن‌های *hsp65* و *dnaK* جزء ژن‌های خانه‌دار (housekeeping gene) بوده و پروتئین‌های شوک حرارتی را کد می‌کنند توالی این ژن‌ها بسیار محافظت‌شده و در تمامی میکروارگانیسم‌ها حضور دارند، بر اساس مطالعات صورت گرفته ژن *dnaK* نسبت به ژن *hsp65* کارآمدتر بوده و استفاده از این ژن نتایج بهتری را به دنبال دارد هرچند ژن *hsp65* نیز یکی از بهترین ابزار جهت شناسایی و افتراق مایکوباکتریوم های سریع الرشد (Rapid Growth Mycobacteria) می‌باشد (۱۰-۹). ژن *rpoB* نیز ابزار مفیدی جهت انجام این‌گونه مطالعات می‌باشد، این ژن عضو دیگری از خانواده ژن‌های خانه‌دار بوده که حاوی مناطق متغیر و محافظت‌شده می‌باشد و در تمامی میکروارگانیسم‌ها تنها یک کپی از این ژن وجود دارد و جهت شناسایی مایکوباکتریوم‌های سریع الرشد و همچنین بررسی ارتباط بین‌گونه‌ای و درون‌گونه‌ای به کار می‌رود (۱۱،۸). ژن 16S rRNA نسبت به سایر ژن‌های ذکرشده طی تکامل کمتر دچار تغییر و تحول شده و محافظت‌شده‌تر بوده به همین دلیل بیشتر موردمطالعه قرار می‌گیرد (۱۲-۹)، لذا می‌توان نتیجه گرفت ژن‌های 16S rRNA، *rpoB*، *dnaK* و *hsp65* از بهترین مارکر های ژنتیکی جهت افتراق مولکولی *مایکوباکتریوم ها* می‌باشند. هرچند تکنیک توالی یابی ژن 16S rRNA یکی از بهترین روش‌های تعیین روابط فیلوژنیک باکتری‌ها می‌باشد، اما استفاده از این روش به علت شباهت ژنتیکی بالای درون‌گونه‌ای مایکوباکتریوم ها با محدودیت‌هایی همراه بوده و برخی گونه‌ها قابل‌تشخیص و افتراق نمی‌باشند (۹-۸). برای مثال گونه‌های *مایکوباکتریوم کانزاسی* (*Mycobaterium kansasii*) و *مایکوباکتریوم گاستری* (*Mycobacterium gastri*) توسط توالی یابی ژن 16S rRNA قابل‌تشخیص و افتراق نمی‌باشند. موارد مشابه فراوان دیگری نیز وجود دارد که نشان می‌دهد ژن‌های *rpoB*، *dnaK* و یا *hsp65* در برخی موارد بهتر عمل می‌کند بنابراین جهت شناسایی و تعیین روابط فیلوژنیک مایکوباکتریوم ها به روش‌های مولکولی مکمل نیازمندیم؛ پیشنهاد می‌شود به‌منظور کاهش خطای روش‌های مولکولی علاوه بر مطالعه ژن 16S rRNA به‌طور هم‌زمان یکی از ژن‌های *rpoB*، *dnaK* و *hsp65* نیز بررسی شود (۱۲-۸).

References

1. Falsafi S, Bostanabad SZ, Feizabadi MM, Ali R, Khavari-Nejad AS, Sheikhi N, et al. Isolation and Molecular Identification of *Mycobacterium fortuitum* isolates from Environmental water and clinical samples at different regions of Iran. Bull Env Pharmacol Life Sci 2015;4:63-8.
2. Velayati AA, Farnia P, Mozafari M, Malekshahian D, Seif S, Rahideh S, et al. Molecular epidemiology of nontuberculous mycobacteria isolates from clinical and environmental sources of a metropolitan city. PLoS ONE 2014;9(12):e114428.
3. Heidarieh P, Mirsaeidi M, Hashemzadeh M, Feizabadi MM, Bostanabad SZ, Nobar MG, et al. In Vitro Antimicrobial Susceptibility of Nontuberculous Mycobacteria in Iran. Microb Drug Resist 2016;22(2):172-8.
4. Heidarieh P, Shojaei H, Feizabadi MM, Havaei A, Hashemi A, Ataei B, et al. Molecular identification and conventional susceptibility testing of Iranian clinical *Mycobacterium fortuitum* isolates. Iran J Basic Med Sci 2010;13(1):210-5.
5. Shamaei M, Marjani M, Farnia P, Tabarsi P, Mansouri D. Human infections due to *Mycobacterium lentiflavum*: first report in Iran. Iran J Microbiol 2010;2(1):29-31.
6. Hashemi-Shahraki A, Darban-Sarokhalil D, Heidarieh P, Feizabadi MM, Deshmir-Salameh S, Khazaee S, et al. *Mycobacterium simiae*: a possible emerging pathogen in Iran. Jpn J Infect Dis 2013;66(6):475-9.
7. Esfahani BN, Yazdi HR, Moghim S, Safaei HG, Esfahani HZ. Rapid and accurate identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex and common non-tuberculous mycobacteria by multiplex real-time PCR targeting different housekeeping genes. Curr Microbiol 2012;65(5):493-9.
8. Adékambi T, Berger P, Raoult D, Drancourt M. *rpoB* gene sequence-based characterization of emerging non-tuberculous mycobacteria with descriptions of *Mycobacterium bolletii* sp. nov., *Mycobacterium phocaicum* sp. nov. and *Mycobacterium aubagnense* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol 2006;56(1):133-43.
9. Dai J, Chen Y, Dean S, Morris JG, Salfinger M, Johnson JA, et al. Multiple-genome comparison reveals new loci for Mycobacterium species identification. J Clin Microbiol 2011;49(1):144-53.
10. Ringuet H, Akoua-Koffi C, Honore S, Varnerot A, Vincent V, Berche P, et al. *hsp65* sequencing for identification of rapidly growing mycobacteria. J Clin Microbiol 1999;37(3):852-7.
11. Adékambi T, Drancourt M, Raoult D. The *rpoB* gene as a tool for clinical microbiologists. Trends Microbiol 2009;17(1):37-45.
12. Vos M, Quince C, Pijl AS, de Hollander M, Kowalchuk GA. A comparison of *rpoB* and 16S rRNA as markers in pyrosequencing studies of bacterial diversity. PLoS ONE 2012; 7(2):e30600.