جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و یکم/شماره ۲۶۶/هفته چهارم بهمن ماه ۱۳۹۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۸/۱۳
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۰/۲۰

شناسایی ایزوله‌های بالینی مایکوباکتریوم‌های غیر توبرکلوزیس شایع اصفهان با روش PCR-RFLP Analysis ژن rpoB

شیما هادی‌فر[۱]، دکتر شراره مقیم[۲]، دکتر حاجیه قاسمیان صفایی[۳]، دکتر حسین فاضلی[۴]، دکتر فریبا فرید[۵]، محسن موقوفه‌یی[۱]، منصور صدیقی[۱]، دکتر بهرام نصر اصفهانی[۳]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: مطالعه جهت تشخیص جنس مایکوباکتریوم، معیاری را برای بررسی اپیدمیولوژی و پاتوژنز این گروه از باکتری‌ها در نواحی جغرافیایی مختلف فراهم می‌کند. با توجه به شیوع عفونت‌های ناشی از مایکوباکتریوم در ایران و همچنین همسایگی ایران با دو کشور افغانستان و پاکستان که در زمره‌ی ۲۲ کشور High burden دنیا هستند، ضرورت توجه بیش از پیش به این بیماری و ارایه‌ی مولکولار اپیدمیولوژی بیماری‌های مایکوباکتریال روشن می‌گردد. PCR-RFLP analysis (PRA یا Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis) یک روش دقیق و ارزان می‌باشد که تشخیص گونه‌های مایکوباکتریوم را فراهم می‌آورد. این مطالعه با هدف تعیین پروفایل قطعات محدود شونده با استفاده از روش پیش‌گفته برای مشخص نمودن تایپ‌های شایع مایکوباکتریوم‌های غیر توبرکلوزیس اصفهان انجام گردید.

روش‌ها: ۳۴ ایزوله‌ی بالینی پس ازگردآوری و کشت توسط روش فنوتیپی تشخیص داده شدند. یک قطعه‌ی ۳۶۰ bp از ژن rpoB با روش PCR (Polymerase chain reaction) تکثیر گردید و سپس محصولات PCR تحت تأثیر دو آنزیم MspI (Moraxella sp.) و HaeIII (Haemophilus aegyptius bacteria) قرار گرفتند. قطعات حاصل از هضم توسط آنزیم با استفاده از ژل متافور آگارز ۴ درصد الکتروفورز شدند و مورد آنالیز قرار گرفتند.

یافته‌ها: در بین ۳۴ گونه NTM (Nontuberculous mycobacteria) مورد بررسی تایپ I مایکوباکتریوم فورچئیتوم با فراوانی ۸۲/۳۵ درصد بیشترین نمونه‌ی جدا شده از مجموعه‌ی نمونه‌های بالینی این منطقه بود و پس از آن، مایکوباکتریوم کانزاسی تایپ I و مایکوباکتریوم گوردونه تایپ I هر دو با ۵/۸۸ درصد و مایکوباکتریوم گوردونه‌ی تایپ II و مایکوباکتریوم اینتراسلولار با ۲/۹۴ درصد جدا گردیدند.

نتیجه‌گیری: روش PRA rpoB gene به کار گرفته شده جهت تشخیص گونه‌های مایکوباکتریوم، نتایج معتبری را با توجه به نتایج دیگر مطالعات، در این منطقه‌ی جغرافیایی ارایه نمود. الگوی PRA گونه‌های مایکوباکتریوم کانزاسی ساب تایپ I (MspI: ۳۰/۴۰/۶۰/۱۷۵، HeaIII: ۹۰/۲۰۵) و مایکوباکتریوم اویوم (MspI: ۴۰/۸۰/۱۰۵، HeaIII: ۲۷۰) حاصل از این مطالعه با الگوی به دست آمده از بعضی مطالعات، یکسان بود؛ اما با پروفایل تعدادی دیگر همسان نبود. این روش، توانست ۱۰۰ درصد ایزوله‌های مایکوباکتریوم غیر توبرکلوزیس را شناسایی کند.

واژگان کلیدی: ژن rpoB، PRA، مایکو باکتریوم غیر توبرکلوزیس

ارجاع: هادی‌فر شیما، مقیم شراره، قاسمیان صفایی حاجیه، فاضلی حسین، فرید فریبا، موقوفه‌یی محسن، صدیقی منصور، نصر اصفهانی بهرام. **شناسایی ایزوله‌های بالینی مایکوباکتریوم‌های غیر توبرکلوزیس شایع اصفهان با روش PCR-RFLP Analysis ژن rpoB.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۲؛ ۳۱ (۲۶۶): ۲۱۳۸-۲۱۳۱

* این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است.

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- استادیار، مرکز تحقیقات عفونت‌های بیمارستانی و گروه میکروب‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳- دانشیار، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۴- استادیار، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری و گروه میکروب‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۵- پزشک عمومی، مرکز سل استان، معاونت درمان، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: دکتر بهرام نصراصفهانی
Email: nasr@hlth.mui.ac.ir

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه

مایکوباکتریوم‌ها یک گروه از باکتری‌ها هستند که از نظر ویژگی‌های ژنوتیپی و بیماری‌های مرتبط هتروژنوس می‌باشند. این ارگانیسم‌ها می‌توانند موجب افزایش حساسیت، پنومونی، آسم، برونشیت، عفونت پوست، زخم‌ها و غدد شوند. همچنین، این عفونت‌ها تهدید جدی برای بیماران فیبروز کیستیک محسوب می‌شوند (۱). امروزه به دلیل اینترکشن زیاد انسان با محیط‌های گوناگون و همچنین افزایش بیماران مبتلا به نقایص ایمنی به علت ویروس HIV (Human immunodeficiency virus) و بیماری ایدز، بیماری زمینه‌ای، سرطان‌ها و در پی آن رادیوتراپی و کموتراپی، عفونت‌های مایکوباکتریوم‌های غیر توبرکلوزیس (NTM یا Nontuberculous mycobacteria) به شدت افزایش یافته است (۳-۲).

NTMها در محیط‌های طبیعی در سراسر جهان یافت می‌شوند و بیش از ۱۲۵ گونه‌ی مختلف را شامل می‌شوند و طیف وسیعی از بیماری‌ها را ایجاد می‌کنند (۴). با توجه به این موارد، به نظر می‌رسد شناسایی و تشخیص کلینیکی و درمان عفونت‌های NTM تبدیل به یک چالش برای کلینیسین‌ها شده است (۵). به منظور مقابله با این چالش و با توجه به افزایش تنوع بین مایکوباکتریوم‌ها، استفاده از روش‌های فنوتیپی به تنهایی ممکن است با هدف شناسایی این گروه از باکتری‌ها کافی نباشد و راه‌های مناسب‌تری برای شناسایی بایستی مورد توجه قرار گیرد. ضمن آن که آگاهی از چگونگی پراکنش این باکتری‌ها در مناطق جغرافیایی مختلف و تایپ‌های مختلف مولکولی آن که ممکن است استراتژی‌های درمانی متفاوتی را لازم داشته باشد، می‌تواند در اتخاذ روش‌های مناسب کنترل و درمان در هر منطقه توسط پزشکان مؤثر باشد (۶). روش‌های رایج فنوتیپی جهت شناسایی این گروه از باکتری‌ها، دارای محدودیت‌هایی از جمله زمان‌بر بودن و پاسخ‌های نه چندان دقیق می‌باشد (۷).

امروزه، تکنیک‌های مولکولی ابزارهای تشخیصی نوین را جهت تشخیص باکتری‌ها فراهم نموده است (۸). در بین روش‌های مولکولی موجود، روش‌های بر پایه‌ی PCR (Polymerase chain reaction) برای تشخیص NTMها مناسب‌تر و قابل اعتمادتر می‌باشند (۹، ۱). ژن‌های زیادی از جمله rpoB، ۱۶srRNA، dnaj و hsp۶۵ با هدف شناسایی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۰-۹). در این بین، ژن rpoB کد کننده‌ی زیر واحد β آنزیم RNA پلیمراز به عنوان یک ژن مناسب برای تشخیص باکتری‌ها به ویژه باکتری‌هایی که ارتباطات بسیار نزدیک و تنوع بین گونه‌ای محدود دارند، مطرح می‌باشد (۱۱).

روش PCR-RFLP analysis (PRA یا Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis) یک روش دقیق و ارزان است که جهت شناسایی این گروه از باکتری‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۱). با توجه به این که پروفایل قطعات محدود شونده‌ی ایزوله‌های مایکوباکتریوم در برخی نقاط جهان تعیین شده است و با توجه به مشکلات فراوانی که در مورد مایکوباکتریوم‌های آتیپیک از نظر پاتوژنیکی، اپیدمیولوژیکی، درمان و مقاومت دارویی وجود دارد و در کشور ایران نیز این باکتری‌ها به صورت گسترده از منابع محیطی، حیوانی و انسانی جدا شده است،

www.mui.ac.ir

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

شناسایی این گروه از باکتری‌ها با استفاده از PRA ژن rpoB جهت مشخص نمودن پروفایل قطعات طولی محدود شونده و ارایه‌ی اطلاعات مرتبط با اپیدمیولوژی و پایه‌های ژنتیکی این منطقه‌ی جغرافیایی انجام پذیرفت.

روش‌ها

سویه‌های باکتریایی

در این مطالعه ۳۴ ایزوله‌ی مختلف از مراکز مختلف آزمایشگاهی از جمله کلکسیون مایکوباکتریوم گروه میکروب‌شناسی دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان و مرکز سل استان اصفهان مورد بررسی قرارگرفت. این ایزوله‌ها در جدول ۱ لیست شده‌اند.

جدول ۱. گونه‌های باکتریایی مورد استفاده در این مطالعه

گونه	سویه
مایکوباکتریوم فورچئیتوم	ATCC49403
مایکوباکتریوم فورچئیتوم	۲۷ ایزوله‌ی بالینی
مایکوباکتریوم کانزاسی	۲ ایزوله‌ی بالینی
مایکوباکتریوم اینتراسلولار	۱ ایزوله‌ی بالینی
مایکوباکتریوم گوردونه	۳ ایزوله‌ی بالینی

آزمایش‌های فنوتیپی

نمونه‌ها روی محیط لوون اشتاین جانسون جهت رشد و بررسی مورفولوژی کلنی کشت داده شد و به مدت ۳ روز تا ۸ هفته در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد با ۱۰-۵ درصد CO_2 انکوبه گردید. گونه‌های مختلف مایکوباکتریوم با توجه به ظاهر کلنی، مدت رشد و آزمایش‌های بیوشیمیایی (تولید نیاسین، احیای نیترات، آزمایش کاتالاز در ۶۸ درجه‌ی سانتی‌گراد و آزمایش کاتالاز نیمه کمی- هیدرولیز آریل سولفاتاز- هیدرولیز Tween ۸۰ و دیگر آزمایش‌های فنوتیپیک) از یکدیگر افتراق داده شدند.

استخراج DNA

کشت تازه‌ی باکتری‌ها روی محیط ۷H۱۰ تهیه گردید و جداسازی DNA باکتری‌های مورد مطالعه با استفاده از روش سیتیل تری متیل آمونیوم بروماید (CTAB یا Cetyl trimethylammonium bromide) صورت پذیرفت.

PCR

به منظور PCR منطقه‌ی ۳۶۰ bp از ژن rpoB (باز ۹۰۲ تا ۱۲۶۱) با استفاده از پرایمرهای:

(RPO۵'-) ۳'-

Forward :۵'-TCAAGGAGAAGCGCTACG

(RPO۳'-) ۳'-

Reverse :۵'-GGATGTTGATCAGGGTCTGC

تکثیر قطعه‌ی مورد نظر در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر می‌باشد که حاوی:

۲ میکرولیتر از DNA سوپرناتانت (۵ng genomic DNA)

۱µl of each prime (۱۰ pmol/ml)

۱/۲۵ µl $MgCl_2$ (۱/۵ mM)

۰/۵ µl dNTP (۲۰۰ mM)

۰/۲۵ µl Taq polymerase (۵۰۰ U)

۲/۵ µl ۱۰X Buffer

سپس Denaturation اولیه در ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و ادامه‌ی سیکل شامل ۳۵ سیکل Denaturation در ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، Annealin در ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، Extention در ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱دقیقه و Extention

www.mui.ac.ir

نهایی در ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه انجام شد. جهت تأیید تولید محصول مورد نظر طی فرایند PCR، بخشی از محصول روی ژل آگارز، الکتروفورز شد.

RFLP

۱۴ میکرولیتر محصول PCR در حجم نهایی ۲۰ µl – حاوی ۲ µl بافر ۱۰x، ۳/۵ µl DH_2 uMspI Enzyme ۵– در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴ ساعت انکوبه شد. سپس ۴ µl از Loading buffer اضافه گردید و نمونه‌ها روی ۴ درصد متافور آگارز الکتروفورز شدند. سپس اندازه‌ی قطعات تعیین گردید. مراحل ذکر شده به صورت مشابه برای ۵ U Hae III Enzyme نیز انجام شد. ۴ µl از Loading buffer اضافه و نمونه‌ها روی ۴ درصد متافور آگارز الکتروفورز شدند. سپس اندازه‌ی قطعات تعیین گردید.

یافته‌ها

با روش فنوتایپیک هر ۳۴ ایزوله‌ی مورد بررسی به عنوان NTM شناسایی شدند. از بین ۳۴ ایزوله‌ی مورد بررسی در این مطالعه با روش PRA، ۲۸ ایزوله‌ی متعلق به ایزوله‌ی NTM دارای رشد سریع و ۷ ایزوله‌ی NTM دارای رشد کند بودند.

در بین ایزوله‌های دارای رشد سریع شناسایی شده بر اساس پروفایل قطعات محدود شونده‌ی حاصل از PRA ژن rpoB، ۲۸ مورد مایکوباکتریوم فورچئیتوم ساب تایپ I بودند و در بین ایزوله‌های دارای رشد کند، ۱ مورد م.اینتراسلولار تایپ I، ۲ مورد م.کانزاسی ساب تایپ I و ۳ مورد م.گوردونه (۲ مورد آن ساب تایپ I و ۱ مورد ساب تایپ II) بودند.

پروفایل حاصل از آنالیز قطعات طولی محدود شونده‌ی ایزوله‌های مورد مطالعه در جدول ۲ لیست شده است.

بحث

تشخیص کلینیکی و درمان عفونت‌های NTM تبدیل به یک چالش برای کلینیسین‌ها شده است (۵). همچنین با توجه به انتشار بیماری ایدز در سراسر دنیا عفونت با NTM مانند TB (Tuberculosis) در بسیاری از قسمت‌های جهان بیش از دهه‌های گذشته افزایش یافته است (۱۲). مطالعه جهت تشخیص جنس مایکوباکتریوم در سطح تایپ و حتی ساب تایپ، معیاری را برای بررسی اپیدمیولوژی و پاتوژنز این گروه از باکتری‌ها فراهم می‌کند (۱۳). همچنین امکان یک مسیر تشخیصی و درمانی موفق را میسر می‌سازد (۵).

جدول ۲. پروفایل قطعات طولی محدود شونده‌ی ایزوله‌های مایکوباکتریوم

ایزوله‌ها	الگوی قطعات طولی محدود شونده	
	MspI	HeaIII
مایکوباکتریوم فورچئیتوم ساب تایپ I	۱۷۵/۱۰۵/۷۰	۱۲۰/۹۰/۸۰
مایکوباکتریوم گوردونه‌ی ساب تایپ I	۱۴۵/۹۵/۴۰/۳۰	۲۱۰/۹۸/۹۰
مایکوباکتریوم گوردونه‌ی ساب تایپ II	۱۴۵/۱۰۰/۴۰	۳۳۰
مایکوباکتریوم کانزاسی ساب تایپ I	۱۷۵/۶۰/۴۰/۳۰	۲۰۵/۹۰
مایکوباکتریوم اینتراسلولار ساب تایپ I	۱۷۵/۱۰۵/۸۰	۱۸۰/۹۰

MspI: Moraxella sp.; HeaIII: Haemophilus aegyptius bacteria

مایکوباکتریوم‌ها به طور معمول با روش‌های فنوتیپی در سطح گونه شناسایی می‌شوند؛ اما تشخیص بر این اساس دارای محدویت‌هایی است (۷-۶). روش‌های جایگزین مانند HPLC (High-performance liquid chromatography) نیازمند تجهیزات ویژه و گران قیمت و نیز مقدار قابل توجهی از میکروارگانیسم می‌باشند (۱۴). امروزه روش‌های مولکولار از جمله Sequencing، Accu probe، Inno-LipA و v_2 Mycobacteria برای شناسایی دقیق و سریع گونه‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند؛ اما این روش‌ها با وجود قدرت افتراق و تشخیص بالا، محدویت‌هایی در استفاده به ویژه در کشورهای در حال توسعه به دلیل هزینه‌ی بالا و امکانات خاص دارد (۱۶-۱۵، ۱۰).

همچنین در دهه‌های گذشته، روش‌های رایج طبقه‌بندی مانند باکتریوفاژتایپینگ و سروتایپینگ با روش‌های ملکولی مانند Ribotyping، PCR-based methods، Fingerprinting plasmid و آنالیز قطعات محدود شونده‌ی DNA کروموزومی به وسیله‌ی (Pulsed-field gel electrophoresis) PFGE جایگزین گردیده است (۱۷). در این بین PCR-RFLP analysis یک روش دقیق و ارزان می‌باشد که تشخیص و طبقه‌بندی تایپ‌ها و حتی ساب تایپ مایکوباکتریوم‌ها را فراهم می‌آورد (۱۱-۱۰).

ژن‌های مختلفی از جمله dnaj، rpoB، hsp۶۵ و ۱۶srRNA با این روش جهت شناسایی مایکوباکتریوم می‌توانند مورد هدف قرار گیرند (۱۰-۹). در این بین، ژن rpoB کد کننده‌ی زیر واحد β آنزیم RNA پلیمراز به عنوان یک ژن مناسب برای آنالیز فیلوژنتیک و تشخیص باکتری‌ها به ویژه باکتری‌هایی که ارتباطات بسیار نزدیک و تنوع بین گونه‌ای محدود دارند، مطرح می‌باشد (۱۱).

با توجه به مشکلات فراوانی که در مورد مایکوباکتریوم‌های آتیپیک از نظر پاتوژنیسیته، اپیدمیولوژیک، درمان و مقاومت دارویی وجود دارد و این که این باکتری‌ها به طور گسترده از منابع محیطی، حیوانی و انسانی جدا شده‌اند، مطالعه‌ی حاضر با هدف تعیین پروفایل قطعات محدود شونده و شناسایی با استفاده از یک روش سریع و در عین حال دقیق برای مشخص نمودن انواع شایع در منطقه‌ی جغرافیایی مورد نظر انجام گردیده است. در این مطالعه، از بین ۳۴ گونه‌ی NTM مورد بررسی، تایپ I م.فورچئیتوم با فراوانی ۸۲/۳۵ درصد بیشترین نمونه‌ی جدا شده از مجموعه نمونه‌های بالینی این منطقه بود و پس از آن، مایکوباکتریوم کانزاسی تایپ I و مایکوباکتریوم گوردونه‌ی تایپ I هر دو با ۵/۸۸ درصد و مایکوباکتریوم گوردونه‌ی تایپ II و مایکوباکتریوم اینتراسلولار با ۲/۹۴ درصد جدا گردیده‌اند. این یافته‌ها با نتایج حاصل از مطالعات دیگر در مورد تایپ‌های شایع در هر منطقه به طور کامل یکسان نبود. در مطالعه‌ی Lee و همکاران بر روی ایزوله‌های NTM، بیشترین فراوانی مربوط به م.اینتراسلولار تایپ I با فراوانی ۲۶/۷ درصد و م.اویوم با فراوانی ۲۵ درصد بوده است (۵).

در مطالعه‌ی Ong و همکاران، تایپ I م.فورچئیتوم با فراوانی ۳۰ درصد، م.اویوم ۱۱/۴۲ درصد، م.گوردونه‌ی تایپ I ۸/۵۷ درصد و م.کانزاسی تایپ I ۵/۷۱ درصد به عنوان گونه‌های با فراوانی بیشتر گزارش شده‌اند (۱۸). این تفاوت در

الگوی PRA ایزوله‌های یکسان از نظر فنوتیپی در مناطق مختلف جغرافیایی نیز دیده می‌شود. بر اساس روش به کار گرفته شده در این بررسی، ۱۰۰ درصد ایزوله‌ها قابل شناسایی بودند.

در مطالعه‌ی Kazumi و Mitarai گزارش شده است که سکانس ژن rpoB موجب بهبود سیستم تشخیص و شناسایی دقیق گونه‌های مایکوباکتریوم می‌گردد (۶). همچنین Lee و همکاران، PRA ژن rpoB را جهت تشخیص و افتراق مایکوباکتریوم‌ها برای ۴۴ گونه، مورد استفاده قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که مایکوباکتریوم‌ها در سطح گونه به وسیله‌ی این روش قابل شناسایی هستند و همچنین توانایی تشخیص گونه و ساب تایپ‌های گوردونه، فورچئیتوم، کانزاسی و گاستری را نیز دارا می‌باشد. در حالی که rRNA۱۶S در این موارد محدویت دارد (۵).

مطالعه‌ی Ong و همکاران نشان داد که حساسیت PRA *ژن* rpoB برای تمایز و تشخیص مایکوباکتریوم ۸۵/۶ درصد می‌باشد (۱۸). در مطالعات دیگر، PRA برای rRNA۱۶S، hsp۶۵ و dnaj نیزانجام شد، اما به چندین آنزیم هضم کننده نیاز بود و همین امر، تفسیر قطعات حاصل را مشکل می‌ساخت. همچنین مطالعات دیگر که در مناطق مختلف صورت گرفته‌اند، تأیید کننده‌ی این است که rpoB یک ابزار قدرتمند شناسایی برای شناسایی NTMها به ویژه RGM (Rapidly growing mycobacteria)ها و همچنین بررسی ارتباط بین گونه‌ای و درون گونه‌ای (Intra-interspecies) می‌باشد (۲۵-۱۹).

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از طرح پژوهشی می‌باشد که با تأمین اعتبار از معاونت تحقیقات و فن آوری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان به انجام رسید. بدین وسیله از این معاونت، کارکنان محترم آزمایشگاه مرجع سل، کارکنان و مدیر محترم گروه میکروب‌شناسی دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

1. Konig B, Tammer I, Sollich V, Konig W. Intra- and interpatient variability of the hsp65 and 16S-23S intergenic gene region in Mycobacterium abscessus strains from patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol 2005; 43(7): 3500-3.
2. Lee AS, Jelfs P, Sintchenko V, Gilbert GL. Identification of non-tuberculous mycobacteria: utility of the GenoType Mycobacterium CM/AS assay compared with HPLC and 16S rRNA gene sequencing. J Med Microbiol 2009; 58(Pt 7): 900-4.
3. Ellis SM. The spectrum of tuberculosis and non-tuberculous mycobacterial infection. Eur Radiol 2004; 14(Suppl 3): E34-E42.
4. 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.
5. Lee H, Park HJ, Cho SN, Bai GH, Kim SJ. Species identification of mycobacteria by PCR-restriction fragment length polymorphism of the rpoB gene. J Clin Microbiol 2000; 38(8): 2966-71.
6. Kazumi Y, Mitarai S. The evaluation of an identification algorithm for Mycobacterium species using the 16S rRNA coding gene and rpoB. International Journal of Mycobacteriology 2012; 1(1): 21-8.
7. Nasr EB, Rezaei YH, Moghim S, Ghasemian SH, Zarkesh EH. 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. Foxman B, Zhang L, Koopman JS, Manning SD, Marrs CF. Choosing an appropriate bacterial typing technique for epidemiologic studies. Epidemiol Perspect Innov 2005; 2: 10.
9. Covert TC, Rodgers MR, Reyes AL, Stelma GN, Jr. Occurrence of nontuberculous mycobacteria in environmental samples. Appl Environ Microbiol 1999; 65(6): 2492-6.
10. Varma-Basil M, Garima K, Pathak R, Dwivedi SK, Narang A, Bhatnagar A, et al. Development of a novel PCR restriction analysis of the hsp65 gene as a rapid method to screen for the Mycobacterium tuberculosis complex and nontuberculous mycobacteria in high-burden countries. J Clin Microbiol 2013; 51(4): 1165-70.
11. Adekambi T, Drancourt M, Raoult D. The rpoB gene as a tool for clinical microbiologists. Trends Microbiol 2009; 17(1): 37-45.
12. Lee H, Bang HE, Bai GH, Cho SN. Novel polymorphic region of the rpoB gene containing Mycobacterium species-specific sequences and its use in identification of mycobacteria. J Clin Microbiol 2003; 41(5): 2213-8.
13. Neonakis IK, Gitti Z, Krambovitis E, Spandidos DA. Molecular diagnostic tools in mycobacteriology. J Microbiol Methods 2008; 75(1): 1-11.
14. Butler WR, Guthertz LS. Mycolic acid analysis by high-performance liquid chromatography for identification of Mycobacterium species. Clin Microbiol Rev 2001; 14(4): 704-26, table.
15. Tortoli E, Mariottini A, Mazzarelli G. Evaluation of INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2: improved reverse hybridization multiple DNA probe assay for mycobacterial identification. J Clin Microbiol 2003; 41(9): 4418-20.
16. Cheunoy W, Prammananan T, Chaiprasert A, Foongladda S. Comparative evaluation of polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis: two amplified targets, hsp65 and rpoB, for identification of cultured mycobacteria. Diagn Microbiol Infect Dis 2005; 51(3): 165-71.
17. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol 1995; 33(9): 2233-9.
18. Ong CS, Ngeow YF, Yap SF, Tay ST. Evaluation of PCR-RFLP analysis targeting hsp65 and rpoB genes for the typing of mycobacterial isolates in Malaysia. J Med Microbiol 2010; 59(Pt 11): 1311-6.
19. Whang J, Lee BS, Choi GE, Cho SN, Kil PY, Collins MT, et al. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism of the rpoB gene for identification of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis and differentiation of Mycobacterium avium subspecies. Diagn Microbiol Infect Dis 2011; 70(1): 65-71.
20. Macheras E, Roux AL, Bastian S, Leao SC, Palaci M, Sivadon-Tardy V, et al. Multilocus sequence analysis and rpoB sequencing of Mycobacterium abscessus (sensu lato) strains. J Clin Microbiol 2011; 49(2): 491-9.
21. Simmon KE, Low YY, Brown-Elliott BA, Wallace RJ, Jr., Petti CA. Phylogenetic analysis of Mycobacterium aurum and Mycobacterium neoaurum with redescription of M. aurum culture collection strains. Int J Syst Evol Microbiol 2009; 59(Pt 6): 1371-5.
22. Adekambi T, Colson P, Drancourt M. rpoB-based identification of nonpigmented and late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. J Clin Microbiol 2003; 41(12): 5699-708.
23. Kim BJ, Lee SH, Lyu MA, Kim SJ, Bai GH, Chae GT, et al. Identification of mycobacterial species by comparative sequence analysis of the RNA polymerase gene (rpoB). J Clin Microbiol 1999; 37(6): 1714-20.
24. Devulder G, Perouse de MM, Flandrois JP. A multigene approach to phylogenetic analysis using the genus Mycobacterium as a model. Int J Syst Evol Microbiol 2005; 55(Pt 1): 293-302.
25. Adekambi 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(Pt 1): 133-43.

Journal of Isfahan Medical School Received: 04.11.2013

Vol. 31, No. 266, 4th Week, February 2014 Accepted: 10.01.2014

Identification of Non-Tuberculosis Mycobacteria Isolates by Polymerase Chain Reaction–Restriction Enzyme Analysis of 360-bp Fragment of rpoB Gene

Shima Hadifar[1], Sharareh Moghim PhD[2], Hajieh Gasemian-Safaei PhD[3], Hosein Fazeli PhD[4], Fariba Farid MD[5], Mohsen Moghoofei[1], Mansour Sedighi[1], Bahram Nasr-Esfahani PhD[3]

Original Article

Abstract

Background: Diagnosis of mycobacterium genus provides a basis for investigating the epidemiology and pathogenesis of this group of bacteria. Regarding the prevalence of mycobacterial infection in Iran and because of the being neighborhood with countries among 22 high-burden countries, increasing attention to mycobacterial diseases and introducing molecular epidemiology of Mycobacteria seems to be necessary. Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Fragments (PCR-RFLP) is an inexpensive and accurate method providing diagnosis of mycobacterial species. The present study aimed to determine the common types of Mycobacteria in this geographical region by mentioned method.

Methods: 34 clinical isolates were collected and cultured and identified by phenotypic methods. A 360-bp fragment of the rpoB gene was amplified by PCR and then, PCR products were digested by the two enzymes, MspI and HaeIII. Digested fragments were analyzed by using 4% metaphor agarose gel electrophoresis.

Findings: Out of 34 species of nontuberculous mycobacteria (NTMs), *M. fortuitum* type I with the frequency of 82.35% was the most frequent type and M. *gordonae type* I and *M. kansasii* type I both with the frequency of 5.88% and *M. gordonae* type II and M. *intracellular* both with the frequency of 2.94% were the next.

Conclusion: The PCR-RFLP analysis of *rpoB* gene used for identification of Mycobacteria provided valid results in this geographical area. In this study, *M. kansasii* type I (HeaIII: 90/205, MspI: 30/40/60/175) and *M. avium* (HeaIII: 270; MspI: 40/80/105) were identical to the patterns of some studies and different from others. This study demonstrated the high sensitivity (100%) of used PCR-RFLP analysis method for identification of Mycobacteria.

Keywords: Nontuberculous mycobacteria, Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Fragments (PCR-RFLP), *rpoB* gene, Identification

Citation: Hadifar Sh, Moghim Sh, Gasemian-Safaei H, Fazeli H, Farid F, Moghoofei M, et al. **Identification of Non-Tuberculosis Mycobacteria Isolates by Polymerase Chain Reaction–Restriction Enzyme Analysis of 360-bp Fragment of rpoB Gene.** J Isfahan Med Sch 2014; 31(266): 2131-8

* This paper is derived from a MSc thesis in Isfahan University of Medical Sciences.

1- MSc Student, Department of Microbiology, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Assistant Professor, Nosocomial Infection Research Center AND Department of Microbiology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
3- Associate Professor, Department of Microbiology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
4- Assistant Professor, Infectious Diseases and Tropical Medicine Research Center AND Department of Microbiology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
5- General Practitioner, Isfahan Provincial Tuberculosis Center, Deputy of Treatment, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Bahram Nasr-Esfahani PhD, Email: nasr@hlth.mui.ac.ir