مجله دنیای میکروب‌ها
سال ششم شماره چهارم (پیاپی ۱۷) زمستان ۱۳۹۲
صفحات ۲۸۹-۲۸۱

Original Article

مطالعه تنوع ژنتیکی جدایه های بالینی *مایکوباکتریوم فورچوئیتوم* بر اساس تکنیک RAPD-PCR

رسا شینی محراب زاده*[۱]، آذردخت خسروی[۲]، عبدالرزاق هاشمی[۳]، هوشنگ جمالی[۴]

[۱] کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم، گروه میکروب شناسی، [۲] استاد، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، گروه میکروب شناسی، [۳] استادیار، مرکز تحقیقات بیماری های عفونی و گرمسیری اهواز، [۴] استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم، گروه ایمنی شناسی

چکیده

سابقه و هدف: امروزه *مایکوباکتریوم* های غیرتوبرکلوزی (NTM)، به دلیل افزایش شیوع بیماری زایی و ظهور مقاومت های آنتی بیوتیکی اهمیت فراوان یافته اند. رایج ترین *مایکوباکتریوم* غیرسلی در ایران ، *مایکوباکتریوم فورچوئیتوم* می باشد. این مطالعه با هدف شناسایی مولکولی و بررسی تنوع ژنتیکی در میان جدایه های بالینی *مایکوباکتریوم فورچوئیتوم* در ایران با استفاده از روش RAPD-PCR انجام شد.

مواد و روش ها: این مطالعه به صورت مقطعی- توصیفی بر روی ۸۱ ایزوله NTM جداسازی شده از نمونه های مختلف بالینی انجام شد. به منظور شناسایی اولیه *مایکوباکتریوم فورچوئیتوم* از رنگ آمیزی اسیدفست و تست های رایج بیوشیمیایی استفاده گردید. جدایه ها با روش PCR تایید شدند و محصولات PCR به وسیله ۳ آنزیم برش دهنده *Ava*II، *Hph*I و *Hpa*II هضم گردیدند. در نهایت تیپ بندی مولکولی جدایه های *مایکوباکتریوم فورچوئیتوم* به کمک آنالیز RAPD انجام شد.

یافته ها: از مجموع ۸۱ ایزوله NTM بررسی شده، ۳۶ سویه به عنوان *مایکوباکتریوم فورچوئیتوم* شناسایی شدند. این سویه ها بر اساس پرایمرهای RAPD در ۱۰ خوشه اصلی قرار گرفتند. بیشتر جدایه ها در رپید تایپ ۱ (۹ عضو ، ۲۵٪)، ۲ (۸ عضو ، ۲۲/۲٪) و ۶ (۶ عضو ، ۱۶/۶٪) طبقه بندی شدند. در آنالیز رپید، قطعه اصلی ۳۰۰ جفت بازی (۹۴/۴٪) و پس از آن قطعه ۱۰۰۰ جفت بازی (۶۶/۶٪) وجود داشت.

نتیجه گیری: نتایج مطالعه حاضر، قدرت تمایزی بالای RAPD-PCR را نشان می دهد. این آنالیز می تواند تنوع ژنتیکی و اطلاعات اپیدمیولوژیکی را در مورد جدایه های *مایکوباکتریوم فورچوئیتوم* ارائه دهد. آنالیز RAPD ساده، سریع، ارزان و پیچیدگی کمتری نسبت به سایر روش های تیپ بندی مولکولی دارد.

واژگان کلیدی: *مایکوباکتریوم فورچوئیتوم*، RAPD-PCR، تایپینگ مولکولی.

دریافت مقاله: شهریور ماه ۹۲ پذیرش برای چاپ: آبان ماه ۹۲

مقدمه

امروزه *مایکوباکتریوم* های محیطی یا *مایکوباکتریوم* های غیرتوبرکلوزی (Nontuberculous Mycobacteria = NTM) به دلیل افزایش شیوع بیماری زایی و مقاومت آنتی بیوتیکی اهمیت فراوان یافته اند (۱).

NTM عموماً ساپروفیت بوده و در اکوسیستم های طبیعی مانند آب، خاک، غذا و گرد و غبار وجود دارند. اما در شرایط خاصی به عنوان بیماری زاهای فرصت طلب انسانی عمل می نمایند (۲). از میان NTM، *مایکوباکتریوم* های با رشد سریع (Rapid Growing Mycobacteria = RGM) می توانند باعث عفونت های موضعی و نیز عفونت های بیمارستانی

* آدرس برای مکاتبه: جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم، گروه میکروب شناسی
تلفن: ۰۹۳۹۸۰۹۹۶۰۶ پست الکترونیک: rasa.mehrabzade@gmail.com

مانند عفونت های محل جراحی شوند (۳). از جمله شایع ترین RGM که باعث بروز بیماری های انسانی می شوند می توان به *مایکوباکتریوم آبسسوس* (*M. abscessus*)، *مایکوباکتریوم چلونی* (*M. chelonae*)، *مایکوباکتریوم فورچوئیتوم* (*M. fortuitum*) و *مایکوباکتریوم ماسیلینس* (*M. massiliense*) اشاره نمود (۴).

مایکوباکتریوم فورچوئیتوم اولین بار در سال ۱۹۰۵ از یک منبع دوزیست جداسازی شد. به دنبال آن در سال ۱۹۳۸ به عنوان یک بیماری زای انسانی شناسایی و به وسیله داکاستا کروز (Da Costa Cruz) نام گذاری گردید (۵). *مایکوباکتریوم فورچوئیتوم* می تواند موجب ایجاد طیف وسیعی از عفونت های شش (۶)، پوست و بافت نرم (۷) شامل تزریق آبسه و عفونت های زخم (۸ و ۹) ، غلاف تاندون، آبسه و استخوان (۱۰ و ۱۱) در میزبان های با نقص ایمنی شامل بیماران مبتلا به ایدز گردد (۵ و ۱۲). علاوه بر این، *مایکوباکتریوم فورچوئیتوم* مسوول اکثر عفونت هایی است که به دنبال جراحی بای پاس یا تقویت ماموپلاستی رخ می دهند (۱۳).

مقایسه ژنتیکی جدایه های *مایکوباکتریوم فورچوئیتوم* به کمک روش های تایپینگ به دست می آیند. این امر برای ارزیابی میزان شیوع و مطالعات اپیدمیولوژیکی مفید می باشند. امروزه برای مطالعه شیوع NTM از چندین تکنیک وابسته به واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) شامل جدا کننده رونویسی شده داخلی 16S - 23S rRNA (ITS)، PCR بر پایه تکثیر تصادفی DNA پلی مورفیسم (RAPD) و تکثیر توالی های داخلی انتروباکتریال (ERIC) استفاده می شود (۳). امروزه از روش RAPD-PCR به عنوان ابزاری مفید در تیپ بندی و تمایز گونه های *مایکوباکتریومی* از جمله *مایکوباکتریوم فورچوئیتوم* استفاده می گردد (۱۴ و ۱۵). مطالعات انجام شده در ایران نشان می دهند که *مایکوباکتریوم فورچوئیتوم* بیشترین فراوانی را در میان NTM جداسازی شده از نمونه های بالینی دارد (۱۶).

هدف از این پژوهش شناسایی مولکولی و بررسی تنوع ژنتیکی در میان جدایه های بالینی *مایکوباکتریوم فورچوئیتوم* در ایران با استفاده از روش RAPD-PCR بود.

مواد و روش ها

الف) جمع آوری نمونه: این مطالعه به صورت مقطعی-توصیفی بر روی ۸۱ ایزوله بالینی جدا شده از نمونه های خلط، مایع شستشوی برونش، مایع جنب (pleural effusion)، ادرار و زخم در سال ۱۳۹۱ انجام شد. تمامی نمونه ها از مراکز مختلف ایران از جمله بیمارستان مسیح دانشوری تهران، انستیتو پاستور ایران، دو آزمایشگاه خصوصی در تهران و مرکز رفرانس سل خوزستان-جنوب غرب ایران به آزمایشگاه مرکز تحقیقات بیماری های عفونی و گرمسیری دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز ارسال گردیدند.

ب) شناسایی اولیه گونه مایکوباکتریوم فورچوئیتوم: برای این منظور از رنگ آمیزی اسیدفست و آنالیز ویژگی های فنوتیپی مانند تست رشد بر روی محیط لونشتاین جانسون (LJ) (Himedia,India) در دماهای متفاوت ۲۵، ۳۷ و ۴۵ درجه سانتی گراد، فعالیت آریل سولفاتاز، تولید رنگدانه، سرعت رشد (کمتر از ۷ روز)، احیای نیترات، رشد بر روی محیط مک کانکی آگار بدون کریستال ویوله، تحمل نمک (NaCl) ۵٪ ، جذب آهن، وجود اوره آز و احیای تلوریت، فعالیت کاتالازی در دمای ۶۸ درجه سانتی گراد و تولید نیاسین استفاده گردید (۱۷).

در این مطالعه از *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* سویه H37R (*M. tuberculosis* H37R)، *مایکو باکتریوم بوویس* سویه BCG (*M. bovis* BCG)، *مایکوباکتریوم کانساسی* سویه DSM44162 (*M. kansassi* DSM44162) به عنوان کنترل در آزمون های فنوتیپی استفاده شد. جدایه هایی که به عنوان *مایکوباکتریوم فورچوئیتوم* شناخته شدند، با روش های مولکولی مورد بررسی بیشتر قرار گرفتند.

ج) استخراج DNA: برای این منظور از روش پیچر (Pitcher) و همکاران در سال ۱۹۸۹ با کمی تغییرات برای بهبود حساسیت سلول ها به هضم، استفاده شد (۱۸). به طور خلاصه، پس از غیرفعال سازی حرارتی، سلول های باکتریایی با آنزیم لیزوزیم

تیمار و توسط پروتئیناز K در حضور سدیم دودسیل سولفات (SDS) هضم شدند. در ادامه DNA با کیفیت بالا توسط فنل- کلروفورم خالص سازی و با ایزوپروپانول رسوب داده شد. رسوب حاصل در اتانول ۷۰٪ شسته و دهیدراته گردید. سپس در ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر حل و تا زمان استفاده در دمای ۲۰°C- نگهداری گردید.

د) *انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR):* برای این منظور از پرایمرهای اختصاصی جنس *مایکوباکتریوم* با توالی MSGPF : 5'-CTGGTCAAGGAAGGTCTGCG-3' و MSGPR : 5'-GATGACACCCTCGTTGCC-3' استفاده گردید. (۱۹). این پرایمرها می توانند یک قطعه ۲۲۸ جفت بازی مربوط به یک توالی ۶۵ کیلودالتونی از ژن *hsp65* (پروتئین شوک حرارتی) را تکثیر نمایند.

واکنش PCR با حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر شامل ۳۳/۵ میکرولیتر آب مقطر، ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰x، ۴ میکرولیتر از هر پرایمر (غلظت ۱۰ پیکومول)، ۱ میکرولیتر dNTP Mix (غلظت ۱۰ میلی مولار)، ۲/۵ میکرولیتر $MgCl_2$ (غلظت ۲۵ میلی مولار)، ۲ میکرولیتر DNA الگو (غلظت ۲۰ نانوگرم) و ۰/۵ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase (غلظت ۵ واحد در ۱۰۰ میکرولیتر) انجام گردید. در ادامه واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (Biorad, USA) با شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ ثانیه، اتصال در دمای ۵۸ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ ثانیه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد.

محصولات PCR به ژل آگاروز ۳ درصد واجد اتیدیوم برماید منتقل و الکتروفورز گردیدند. قطعات DNA به کمک دستگاه ژل داکیومنتاسیون (UV Tech, UK) مشاهده و عکس برداری شدند. در این مطالعه از *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* سویه H37R، *مایکو باکتریوم بوویس* سویه BCG، *مایکوباکتریوم کانساسی* سویه DSM44162 به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

ه) *آنالیز آنزیم برش دهنده (PCR Restriction Enzyme Analysis = PRA):* برای این منظور از روش توصیه شده توسط کیم (Kim) و همکاران در سال ۲۰۰۵ با اندکی تغییرات استفاده گردید (۲۰). به طور خلاصه، یک قطعه ۶۴۴ جفت بازی *hsp65* تکثیر شد. واکنش PCR با حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر شامل ۳۰/۵ میکرولیتر آب مقطر، ۵ میکرولیتر بافر ۱۰x، ۲ میکرولیتر از هر پرایمر (غلظت ۱۰ پیکومول)، ۲ میکرولیتر dNTP Mix (غلظت ۱۰ میلی مولار)، ۳ میکرولیتر $MgCl_2$ (غلظت ۲۵ میلی مولار)، ۵ میکرولیتر DNA الگو (غلظت ۲۰ نانوگرم) و ۰/۵ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase (غلظت ۵ واحد در ۱۰۰ میکرولیتر) انجام گردید. در ادامه واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (Biorad, USA) با شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد و در ادامه ۳۰ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ ثانیه، اتصال در دمای ۶۲ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۹۰ ثانیه و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد.

محصولات PCR به وسیله ۳ آنزیم برش دهنده *Hph*I، *Ava*II و *Hpa*II (Fermentase) مطابق روش یاد شده هضم داده شد. محصولات هضم شده به ژل آگاروز ۳ درصد واجد اتیدیوم برماید منتقل و الکتروفورز گردیدند. قطعات DNA به کمک دستگاه ژل داکیومنتاسیون مشاهده و عکس برداری شدند. الگوهای به دست آمده از هر گونه با جدول کیم (Kim) و همکاران و همچنین پایگاه داده ها مقایسه و به این ترتیب تعیین گونه شد.

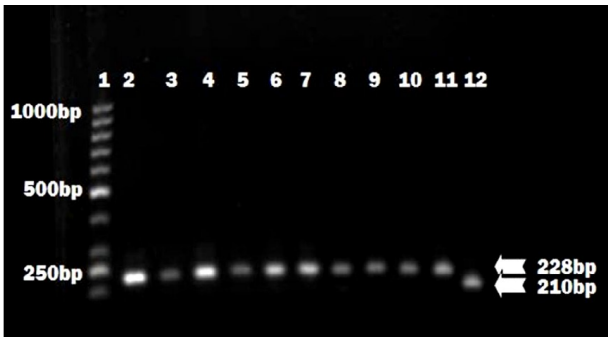
و) *تیپ بندی مولکولی ایزوله های مایکوباکتریوم فورچوئیتوم به کمک آنالیز RAPD:* برای این منظور ۵۰ نانوگرم از DNA استخراج شده از جدایه ها، در معرض آنالیز RAPD با استفاده از پرایمرهای (5'-AGAGTTTGATCCCTGGCTCAG-3') 27F و (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') 1525R همان گونه که در مراحل قبل توصیف شد، قرار داده شد (۲۱).

محصولات PCR توسط الکتروفورز جداسازی و با دستگاه ژل داکیومنتاسیون تصویر برداری شدند. باندهای اصلی شناسایی و معیار های چاپ شده قبلی برای تفسیر باندها مورد استفاده قرار گرفتند (۲۲).

یافته ها

جدایه های مورد پژوهش در مطالعه اخیر، از ۴۷ بیمار (۵۸٪) مرد و ۳۴ بیمار (۴۲٪) زن با عفونت NTM تأیید شده، جداسازی گردید. سن بیماران بین ۶۰-۵۰ سال با میانگین سنی ۵۶/۴ سال بود. از مجموع ۸۱ جدایه جمع آوری شده، ۳۶ (۴۴/۴۴٪) مورد بر اساس سرعت رشد در کمتر از ۷ روز و آزمون های متداول بیوشیمیایی برای تند رشد ها، به عنوان *مایکوباکتریوم فورچوئیتوم* شناخته شدند.

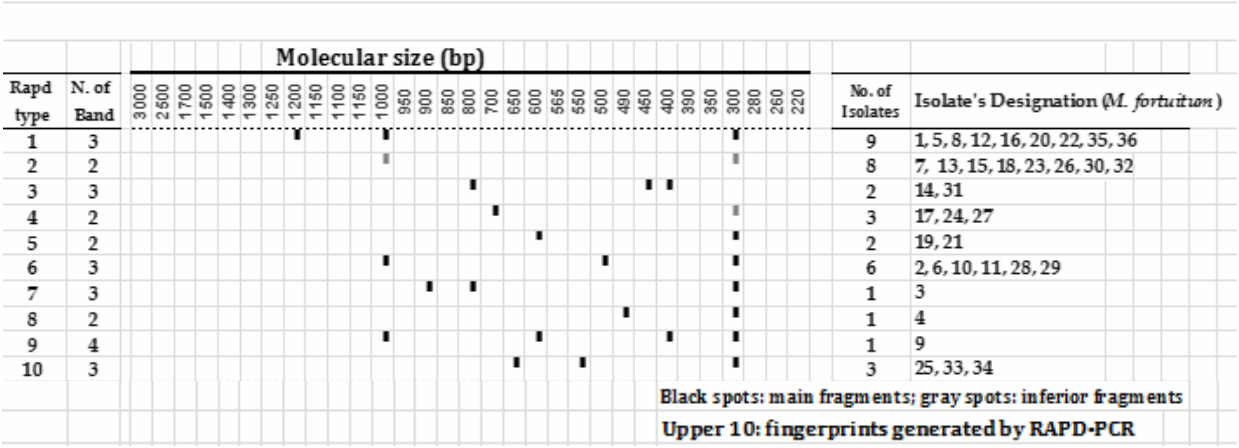
مایکوباکتریوم فورچوئیتوم با فراوانی ۵۲٪ (۱۹ مورد) بیشترین حضور را در نمونه های BAL (Branch Alveolar Lavage) داشت. بقیه موارد از نمونه های ادرار (۲۵٪) (۹ مورد)، مایع جنب (۱۳/۹٪) (۵ مورد) و خلط (۸/۳٪) (۳ مورد) جداسازی شدند. با استفاده از روش PCR حضور گونه *مایکوباکتریوم فورچوئیتوم* در نمونه های مورد بررسی با تکثیر قطعه ۲۲۸ جفت بازی تایید گردید (شکل ۱). در ادامه با استفاده از الگوریتم PRA و تکثیر یک قطعه ۶۴۴ جفت بازی از ژن *hsp65* تمامی ایزوله ها به طور مشخص از دیگر *مایکوباکتریوم* ها متمایز شدند.



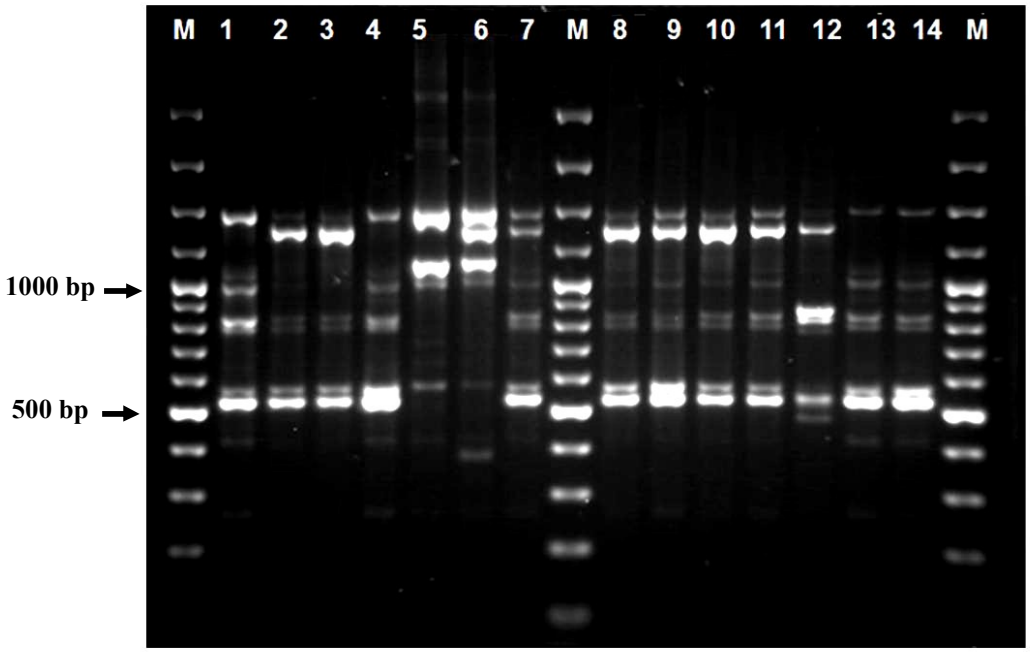
شکل ۱: الکتروفورز حاصل از تکثیر ژن *hsp65* در گونه های *مایکوباکتریوم فورچوئیتوم* با روش PCR. ستون ۱) سایز مارکر (۵۰bp)، ستون ۲) سویه استاندارد *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* سویه H37R به عنوان کنترل مثبت، ستون های ۳ تا ۱۱) ایزوله های *مایکوباکتریوم فورچوئیتوم*، ستون ۱۲) سویه غیر مایکوباکتریومی به عنوان کنترل منفی.

تمامی ایزوله ها، الگوی PRA *Hph*I ،*Ava*II (501 ,119 bp) (254, 207, 97 bp) و *Hpa*II (270, 161, 117 bp) داشتند که بر اساس سویه مرجع بین المللی به گونه *مایکوباکتریوم فورچوئیتوم* سویه ATCC 6841T تعلق داشتند. بر اساس آنالیز RAPD، جدایه های *مایکوباکتریوم فورچوئیتوم* به ۱۰ خوشه اصلی تقسیم بندی شدند. بیشتر جدایه ها در رپید تایپ ۱ (۹ عضو/ ۲۵٪)، ۲ (۸ عضو/ ۲۲/۲٪) و ۶ (۶ عضو/ ۱۶/۶٪) توزیع شدند. بیش از ۹۰٪ از رپید تایپ ۱ و ۲ از نمونه های BAL و خلط جداسازی گردیدند.

در آنالیز RAPD قطعه اصلی، باند ۳۰۰ جفت بازی بود که در تمام رپید تایپ ها به جز رپید تایپ ۳ مشاهده شد (۹۴/۴٪). به



شکل ۲: گراف نرمال سازی شده از پروفایل های RAPD در ۳۶ جدایه *مایکوباکتریوم فورچوئیتوم*



شکل ۳: پروفایل های RAPD-PCR از DNA های تکثیر شده جدایه های *مایکوباکتریوم فورچوئیتوم* ایرانی با استفاده از پرایمر های 27F و 1525R . M) سایز مارکر ۱۰۰۰ جفت بازی (فرمتاز)، ستون های ۱ تا ۱۴) جدایه های متنوعی از *مایکوباکتریوم فورچوئیتوم*.

دنبال آن قطعه ۱۰۰۰ جفت بازی در ایزوله هایی با رپید تایپ ۱ ، ۲ ، ۶ و ۹ (۶۶/۶٪) مشاهده گردید (شکل های ۲ و ۳).

بحث

در این مطالعه از مجموع ۸۱ ایزوله NTM جداسازی شده از نمونه های مختلف بالینی در ایران، ۳۶ سویه با روش PCR به عنوان *مایکوباکتریوم فورچوئیتوم* شناسایی شدند. این سویه ها بر اساس پرایمرهای RAPD بیشتر در رپید تایپ ۱ (۹ جدایه، ۲۵٪)، ۲ (۸ جدایه، ۲۲/۲٪) و ۶ (۶ جدایه، ۱۶/۶٪) طبقه بندی شدند.

مایکوباکتریوم فورچوئیتوم یک گونه تند رشد از NTM می باشد که عموماً در بیماران با نقص ایمنی ژنتیکی یا اکتسابی وجود دارد (۱۳). در دهه اخیر به منظور شناسایی *مایکوباکتریوم* ها چندین روش بر اساس تکنیک های بیولوژی مولکولی شناسایی شده است. از این میان می توان به روش های پالس فیلد ژل الکتروفورز (PFGE)، PRA، RAPD-PCR و ERIC-PCR اشاره نمود. برای مثال پروتئین Hsp (شوک حرارتی)، هدف طرح PRA، اخیراً به طور وسیعی در برخی مطالعات به عنوان مولکولی حفاظت شده در همه *مایکوباکتریوم* ها، مورد استفاده قرار می گیرد. بنابراین تنوع کافی در توالی *مایکوباکتریوم* ها، اجازه تمایز در سطح گونه و سویه را فراهم می نماید (۲۰). در مطالعه حاضر، روش PRA به طور موفقیت آمیزی برای جستجوی مولکولی جدایه های *مایکوباکتریوم فورچوئیتوم* و تشخیص آن ها از دیگر NTM به کار گرفته شد. از آنجایی که این تکنیک نمی توانست در شناسایی تنوع ژنتیکی ایزوله های *مایکوباکتریوم فورچوئیتوم* کافی باشد، ضرورت انجام تکنیک دیگری جهت ژنوتایپینگ احساس می شد. با این وجود مباحثی در میان محققان در مورد استفاده از این روش وجود دارد.

ژانگ (Zhang) و همکاران تکنیک مفیدی را جهت تایپینگ و تمایز گونه های *مایکوباکتریومی* یافتند که قدرت RAPD-PCR را جهت تمایز جدایه های *مایکوباکتریوم زوگلئی* در عین سادگی و سرعت بالا نشان می داد (۱۵). در مطالعه انجام شده توسط سمپیو (Sampaio) و همکاران در سال ۲۰۰۶، گونه های *مایکوباکتریوم فورچوئیتوم* توسط ۴ تکنیک 16S–23S rRNA ژنوتایپینگ فاصله ژنی (gene spacer genotyping)، PFGE،

RAPD-PCR و ERIC-PCR تایپینگ مولکولی شدند.

نتایج این محققان نشان داد که PFGE بیشترین تمایز را در میان باندها آشکار می سازد و بهترین تکنیک در تایپینگ مولکولی *مایکوباکتریوم فورچوئیتوم* می باشد. با این وجود باید خاطر نشان کرد که این تکنیک بسیار مشکل و پر هزینه می باشد. در مقابل، تکنیک های انجام گرفته بر پایه PCR کم هزینه تر و انجام آنها راحت تر است (۳).

هاشمی (Hashemi) و همکاران نیز در سال ۲۰۱۲ در اصفهان تنوع ژنتیکی ایزوله های *مایکوباکتریوم توبکلوزیس* را با تکنیک RAPD-PCR مورد بررسی قرار دادند. نتایج آنالیز آنها، ۳۱ رپید تایپ را در میان ۹۶ ایزوله نشان داد. این روش در مقایسه با PFGE راحت تر و ساده تر است و به مقدار کمی DNA جهت آنالیز نیاز دارد (۲۲). در مطالعه حاضر، از ۱۰ خوشه ژنوتیپی ایجاد شده، اکثریت جدایه ها به رپید تایپ ۱، ۲ و ۳ تعلق داشتند. دو باند اصلی ۳۰۰ و ۱۰۰۰ جفت بازی به ترتیب در ۹۴/۴٪ و ۶۶/۶٪ از جدایه ها آشکار شد. قطعات دیگر در یک تیپ ژنوتیپی توزیع شده بودند. در این مطالعه ارتباط معنا داری بین نوع نمونه و ماهیت ژنوتیپی ایجاد شده وجود داشت (p<۰/۰۰۱). اگرچه توزیع ژنوتیپی در میان نمونه های متفاوت بالینی تنوع وسیعی را نشان داد، اما باکتری های جدا شده از نمونه BAL و خلط بیشترین شباهت را در این تکنیک ژنوتیپی از خود نشان دادند. از آنجایی که انواع اصلی از این نمونه ها، تیپ ۱ و ۲ بودند، ممکن است به این حقیقت منجر شود که تعداد نمونه های BAL در این مطالعه بیشتر بوده است. اگر چه تکنیک RAPD یک آنالیز نسبتاً ساده و مفید اپیدمیولوژیکی می باشد، اما استانداردسازی شرایط PCR برای قابلیت تکثیر مهم می باشد. از این رو، به عنوان یکی از نتایج مهم مشاهده شده در این مطالعه بر اساس تجربیات قبلی، استانداردسازی مقدار DNA در هر واکنش RAPD (۵۰ نانوگرم DNA) برای اطمینان عدم حضور باندهای غیراختصاصی ضروری است.

نتیجه گیری

نتایج مطالعه حاضر، تنوع بیشتری از پلی مورفیسم و اطلاعات اپیدمیولوژیکی مفیدی را از جدایه های *مایکوباکتریوم فورچوئیتوم* آشکار ساخت و قدرت تمایزی بالایی را به منظور نمایان ساختن تنوع ژنتیکی نشان داد. در مجموع نتایج این مطالعه نشان می دهد که تکنیک RAPD-PCR، روشی ساده، سریع، ارزان و با پیچیدگی کمتر نسبت به سایر تکنیک های تیپ بندی مولکولی می باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، خانم دکتر پروین حیدریه و خانم دکتر نسرین شیخی به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

References

1. Parashar D, Das R, Chauhan DS, Sharma VD, Lavania M, Yadav VS, Chauhan SVS, Katoch VM. Identification of environmental mycobacteria isolated from Agra, North India by conventional & molecular approaches. Indian J Med Res. 2009; 129: 424-431.
2. Guevara-Patio A, Sandoval de Mora M, Farreras A, Rivera-Olivero I, Fermin D, de Waard JH. Soft tissue infection due to *Mycobacterium fortuitum* following acupuncture: a case report and review of the literature. J Infect Dev Ctries. 2010; 4(8): 521-525.
3. Sampaio JL, Chimara E, Ferrazoli L, da Silva Telles MA, Del Guercio VM, Jericó ZV, Miyashiro K, Fortaleza CM, Padoveze MC, Leão SC. Application of four molecular typing methods for analysis of *Mycobacterium fortuitum* group strains causing post-mammaplasty

infections. Clin Microbiol Infect. 2006; 12(2): 142-149.

4. Chan ED, Bai X, Kartalija M, Orme IM, Ordway DJ. Host immune response to rapidly growing mycobacteria, an emerging cause of chronic lung disease. Am J Respir Cell Mol Biol. 2010; 43(4): 387-393.

5. Agheli A, Tehranirad M, Cofsky R. An unusual presentation of *Mycobacterium fortuitum*: massive isolated empyema in a patient with HIV. Medscape General Med. 2006; 8(2): 90.

6. Yano Y, Kitada S, Mori M, Kagami S, Taguri T, Uenami T, Namba Y, Yoneda T, Yokota S, Maekura R. Pulmonary disease caused by rapidly growing mycobacteria: a retrospective study of 44 cases in Japan. Respiration. 2013; 85(4): 305-311.

7. Uslan DZ, Kowalski TJ, Wengenack NL, Virk A, Wilson JW. Skin and soft tissue infections due to rapidly growing mycobacteria: comparison of clinical features, treatment, and susceptibility. Arch Dermatol. 2006; 142(10): 1287-1292.

8. Katoch VM. Infections due to non-tuberculous mycobacteria (NTM). Indian J Med Res. 2004; 120: 290-304.

9. Hetsroni I, Rosenberg H, Grimm P, Marx RG. *Mycobacterium fortuitum* infection following patellar tendon repair: a case report. J Bone Joint Surg Am. 2010; 92(5): 1254-1256.

10. Betal D, Mac Neill FA. Chronic breast abscess due to *Mycobacterium fortuitum*: a case report. Betal Mac Neill J Med Case Reports. 2011; 5: 188.

11. Wang SX, Yang CJ, Chen YC, Lay CJ, Tsai CC. Septic arthritis caused by *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium abscessus* in a prosthetic knee joint: case report and review of literature. Intern Med. 2011; 50(19): 2227-2232.

12. Smith MB, Schnadig VJ, Michael C, Boyars MC, Woods GL. Clinical and pathologic features of *Mycobacterium fortuitum* infections. Am J Clin Pathol. 2001; 116: 225-232.

13. Phillips MS, von Reyn CF. Nosocomial infections due to nontuberculous mycobacteria. Clin Infect Dis. 2001; 33(8): 1363-1374.

14. Zhang Q, Kennon R, Koza MA, Hulten K, Clarridge JE. Pseudoepidemic due to a unique strain of *Mycobacterium szulgai*: genotypic, phenotypic, and epidemiological analysis. J Clin Microbiol. 2002; 40: 1134-1139.

15. Englund S. IS900/ERIC-PCR as a tool to distinguish *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from closely related mycobacteria. Vet Microbiol. 2003; 96: 277-287.

16. 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. 2011; 64(4): 265-271.

17. Kent PT, Kubica GP. Public health Mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. Centers for Disease Control, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, Ga.; 1985.

18. Pitcher DG, Saunders NA, Owen RJ. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. Lett Appl Microbiol. 1989; 18: 151-158.

19. Khan IU, Yadav JS. Development of a single-tube, cell lysis-based, genus-specific PCR method for rapid identification of mycobacteria: optimization of cell lysis, PCR primers and conditions, and restriction pattern analysis. J Clin Microbiol. 2004; 42: 453-457.

20. Kim H, Kim SH, Shim TS, Kim MN, Bai GH, Park YG, Lee SH, Cha CY, Kook YH, Kim BJ. PCR restriction fragment length polymorphism analysis (PRA)-algorithm targeting 644 bp heat shock protein 65 (*hsp65*) gene for differentiation of *Mycobacterium* spp. J Microbiol Methods. 2005; 62(2): 199-209.

21. Burucoa C, Lhomme V, Fauchere JL. Performance criteria of DNA finger printing methods for typing of *Helicobacter pylori* isolates: experimental results and meta-analysis. J Clin Microbiol. 1999; 37(12): 4071-4080.

22. Hashemi A, Shojaei H, Heidarieh P, Aslani MM, Naser AD. Genetic diversity of Iranian clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. New Microbiol. 2012; 35(1): 61-65.

23. Sechi LA, Zanetti S, Dupre I, Delogu G, Fadda G. Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences as molecular targets for typing of *Mycobacterium tuberculosis* strains. J Clin Microbiol 1998; 36: 128-132.

24. Christianson S, Wolfe J, Soualhine H, Sharma MK. Comparison of repetitive-sequence-based polymerase chain reaction with random amplified polymorphic DNA analysis for rapid genotyping of nontuberculosis mycobacteria. Can J Microbiol. 2012; 58(8): 953-964.

Journal of Microbial World
Volume 6, No. 4, January 2014

Original Article

Investigation of genetic diversity of *Mycobacterium fortuitum* clinical isolated by RAPD-PCR

Rasa Sheini Mehrabzadeh[1], Azardokht Khosravi[2], Abdolrazzagh Hashemi[3], Hooshang Jamali[4]

[1] MS.c., Department of Microbiology, Islamic Azad University, Jahrom Branch, Jahrom, Iran.
[2] Professor, Department of Microbiology, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran
[3] Assistant Professor, Health Research Institute, Infectious and Tropical Diseases Research Center, Ahvaz, Iran
[4] Assistant Professor, Department of Immunology, Islamic Azad University, Jahrom Branch, Jahrom, Iran

Abstract

Background and Objectives: Non-tuberculosis *Mycobacteria* (NTM) are important due to increase in the rate of clinical outbreaks and emerging antibiotic resistance. *Mycobacterium fortuitum* is the most common NTMs in Iran. This study was aimed to molecular detection and genetic diversity of clinical isolates of *M. foruitum* in Iran using RAPD-PCR method.

Materials and Methods: This cross-sectional study was carried out on 81 isolates of NTM isolated from various clinical samples. The primary identification of *M. fortuitum* was performed based on Acid Fast staining and routine biochemical tests. After confirmation of the isolates based on PCR, the PCR products were digested with *AvaII*, *HphI* and *HpaII*. The molecular typing of the *M. fortuitum* isolates were performed using PAPD analysis.

Results: Out of 81 tested NTM, 36 strains were confirmed as *M. fortuitum*. Based on RAPD primers, these isolates were classified into 10 main clusters. Most of the isolates were distributed into RAPD types of 1 (9 members, 25%), 2 (8 members, 22.2%) and 6 (6 members, 16.6%). In RAPD analysis, the major fragments were 300 bp (94.4%), followed by fragment 1000 bp (66.6%).

Conclusion: The results showed high discriminatory ability of RAPD–PCR method. This analysis is able to sufficiently discriminate the genotypic diversity and to prepare epidemiologic information of the *M. fortuitum* isolates. RAPD techniques is simple, rapid, inexpensive, and is less complicated than most of other molecular typing methods.

Keywords: *Mycobacterium fortuitum*, RAPD-PCR, Molecular typing.

Correspondence to: Rasa Sheini Mehrabzadeh

Tel: +989398099606

E-mail: rasa.mehrabzade@gmail.com

Journal of Microbial World 2014, 6(4): 281-289.