

بررسی بیوانفورماتیک ژن‌های خانه‌دار در افتراق مایکوباکتریوم‌های سریع‌الرشد

مسعود کیخا*

دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروبی‌شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اهفهان، اهفهان، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۲/۲۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۲/۱۸

چکیده

مقدمه: مایکوباکتریوم‌های سریع‌الرشد (RGM: Rapid Growing Mycobacterium) قادر هستند عفونت‌های ریوی، لنفاوی، پوست و بافت نرم را در انسان به وجود آورند. ما می‌توانیم با استفاده از ژن‌های خانه‌دار، این گروه از باکتری‌ها را شناسایی کنیم. در این ارتباط، هدف از پژوهش حاضر مقایسه و ارزیابی سه ژن خانه‌دار در شناسایی و طبقه‌بندی برخی از مایکوباکتریوم‌های سریع‌الرشد با استفاده از درخت فیلوژنیک بود.

مواد و روش‌ها: برای انجام این مطالعه ابتدا توالی‌های سه ژن *16S rRNA*، *hsp65* و *rpoB* برای ۱۰ گونه سریع‌الرشد مایکوباکتریومی از پایگاه‌های (National Center for Biotechnology Information) NCBI، (Remote Desktop Protocol) RDP و (European Molecular Biology Laboratory) EMBL دریافت شد. سپس این توالی‌ها توسط نرم‌افزار Custal W هم‌تراز گردیدند و درخت فیلوژنیک با استفاده از برنامه MEGA5 ترسیم گشت.

یافته‌ها: بر مبنای نتایج، الگوی شناسایی و افتراق هر ژن متفاوت بود. ژن *16S rRNA* قادر به شناسایی و افتراق مایکوباکتریوم‌های سریع‌الرشد بیماری‌زایی چون مایکوباکتریوم آبسسوس (Abscessus) و چلونه (*Chelonei*) نبود. به‌طور کلی، ژن *rpoB* نسبت به سایر ژن‌ها بهتر عمل کرد؛ اگرچه قادر به شناسایی مایکوباکتریوم نووکاسترنس (*novocastrense*) نبود. نتیجه‌گیری: به‌منظور شناسایی کامل و صحیح مایکوباکتریوم‌های سریع‌الرشد باید هر سه ژن *16S rRNA*، *rpoB* و *hsp65* به‌طور هم‌زمان مورد مطالعه قرار گیرند.

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

مقدمه

مایکوباکتریوم‌ها باکتری‌های هوازی و غیرمتحرکی هستند که به دلیل وجود مایکولیک اسید در دیواره سلولی به عنوان باکتری‌های اسید فاست شناخته می‌شوند. این گروه از باکتری‌ها حاوی گوانین+سیتوزین (G+C%) ۶۲-۷۲ درصد می‌باشند. به طور کلی، مایکوباکتریوم‌ها به لحاظ قدرت بیماری‌زایی به دو دسته مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس (MTBC: Mycobacterium Tuberculosis Complex) و مایکوباکتریوم‌های غیر توبرکلوزیس (NTM: Nontuberculous Mycobacteria) تقسیم می‌شوند. مطابق با تقسیم‌بندی Runyon، مایکوباکتریوم‌های غیر توبرکلوزیس یا محیطی براساس سرعت رشد و تولید رنگ‌دانه (پیگمان) طبقه بندی و شناسایی می‌گردند. براساس این طبقه بندی، گروه‌های یک تا سه متعلق به مایکوباکتریوم‌های محیطی کند رشد بوده و گروه چهار مربوط به مایکوباکتریوم‌های سریع‌الرشد می‌باشد. مایکوباکتریوم‌های محیطی کند رشد گروه اول را فوتوکروموژن (در حضور نور رنگ‌دانه تولید می‌کنند)، گروه دوم را اسکوتوکروموژن (تولید رنگ‌دانه در غیاب نور) و گروه سوم را نان کروموژن (فاقد تولید رنگ‌دانه) می‌نامند. باید خاطر نشان ساخت که گروه چهارم حاوی مایکوباکتریوم‌های سریع‌الرشدی که کمتر از هفت روز رشد می‌کنند می‌باشد (۳-۱). امروزه شواهد مهمی مبنی بر وجود مایکوباکتریوم‌های محیطی در منابع آب، خاک و گرد و غبار بیمارستان‌ها وجود دارد. مایکوباکتریوم‌های محیطی موجود در منابع محیطی بیمارستان‌ها از طریق آلودگی ابزارآلات و تجهیزات پزشکی و انتشار از طریق ذرات گرد و غبار، عفونت‌های تنفسی، مننژیت، پریتونیت، مفاصل، لنف، عفونت‌های جلدی و منتشره را در بیماران با نقص سیستم ایمنی و افراد دارای سیستم ایمنی کارآمد به وجود می‌آورند (۴،۵). در رابطه با عفونت‌های

بیمارستانی گونه‌های سریع‌الرشد مایکوباکتریوم‌های محیطی نظیر کمپلکس مایکوباکتریوم فورچئی‌توم (Fortuitum) و چلونه نقش قابل توجهی دارند. علاوه بر این، مقاومت‌های دارویی مایکوباکتریوم آبسوس (Abscessus) یکی دیگر از معضلات پزشکی ناشی از گونه‌های سریع‌الرشد مایکوباکتریوم‌های محیطی محسوب می‌شود (۸-۶).

شناسایی مایکوباکتریوم‌ها براساس روش‌های مرسوم (کشت و آزمون‌های فنوتیپیک) زمان‌بر بوده و این روش‌ها نمی‌توانند برخی از گونه‌ها را شناسایی کنند؛ بنابراین، به‌کارگیری روش‌های مولکولی در کنار روش‌های مرسوم توصیه می‌شود. رایج‌ترین روش‌های مولکولی شناسایی مایکوباکتریوم‌ها عبارت هستند از: PCR (Polymerase Chain Reaction)، PCR Restriction Fragment Hybridization (RFLP)، PCR Length Polymorphism (Nucleic Acid Sequence)، Multiplex PCR و Real-time PCR و مهم‌ترین ژن‌هایی که در این روش‌ها مورد بررسی قرار می‌گیرند، ژن‌های خانه‌دار (Housekeeping Genes) *hsp65*، *rpoB*، *recA*، *gyrB*، *32 KDa Protein Gene* و *16S rRNA* می‌باشند (۹). *16S rRNA* یک ژن ۱۵۵۰ جفت بازی بوده که حاوی مناطق متغیر و حفاظت شده می‌باشد. بررسی نواحی متغیر برای تاکسونومی مقایسه‌ای به کار می‌رود. توالی این ژن در باکتری‌ها بسیار حفاظت شده می‌باشد؛ از این رو به طور معمول برای شناسایی باکتری‌ها از توالی‌یابی ژن *16S rRNA* استفاده می‌شود؛ اما مطالعات نشان داده‌اند که این ژن فاقد توانایی تشخیص و افتراق برخی از گونه‌های مایکوباکتریومی می‌باشد؛ به‌عنوان مثال ژن *16S rRNA* توانایی تشخیص و افتراق مایکوباکتریوم کانزاسی (*Kansasii*) و گاستری (*Gastri*)

گردید (۱).

نتایج

درخت فیلوژنی براساس ژن 16S rRNA

در درخت فیلوژنی حاصل چهار خوشه (کلاد) اصلی به چشم می‌خورد (شکل ۱). در کلاد اول گونه‌های میکوباکتریومی با درصد Bootstrap پایین با یکدیگر یک کلاد را تشکیل داده‌اند. گونه‌های میکوباکتریوم چلونه و آبسوس نیز با ۱۰۰ درصد Bootstrap کلاد دوم را تشکیل داده‌اند. کلاد سوم نیز حاوی میکوباکتریوم پرگرینوم (*Peregrinum*) و کانارینس (*Canariasense*) می‌باشد که با ۸۴ درصد Bootstrap کلاد سوم را تشکیل داده‌اند. در نهایت میکوباکتریوم نووکاسترنس و اسمگماتیس (*Smegmatis*) با ۶۱ درصد Bootstrap کلاد چهارم را تشکیل داده‌اند. لازم به ذکر است که درخت فیلوژنی ترسیم شده قادر به شناسایی میکوباکتریوم‌های چلونه، آبسوس و سنگالنس نمی‌باشد.

درخت فیلوژنی براساس ژن hsp65

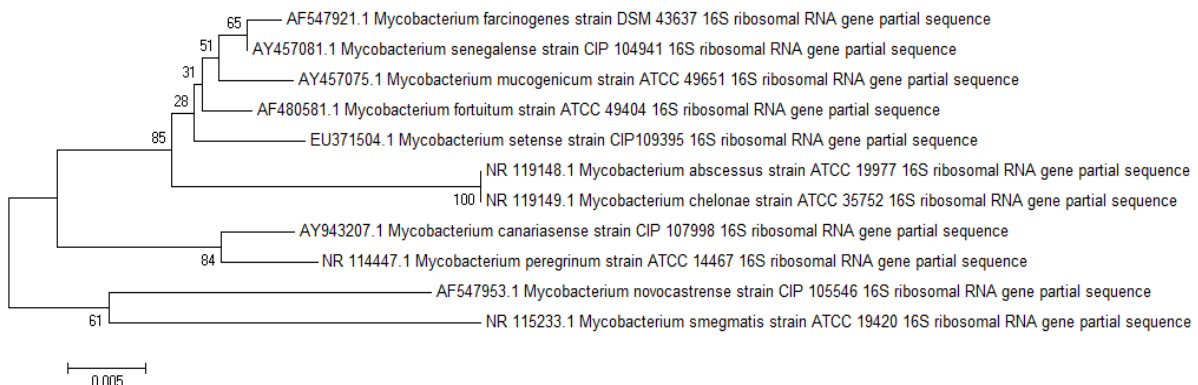
درخت فیلوژنی رسم شده حاصل از این ژن دارای چهار خوشه اصلی است (شکل ۲). بر مبنای شکل ۲، ژن *hsp65* قادر به شناسایی و افتراق گونه‌های میکوباکتریوم

یا میکوباکتریوم سنگالنس (*Senegalense*) و فارسینوژ (*Farcinogenes*) را ندارد. در این موارد توصیه می‌شود که از ژن‌های دیگری نظیر *hsp65* و یا *rpoB* در کنار ژن 16S rRNA استفاده گردد تا شناسایی به بهترین نحو صورت پذیرد (۱۱، ۱۰، ۱). یکی دیگر از کاربردهای ژن‌های خانه دار، تعیین روابط فیلوژنیک می‌باشد. این روابط نشان دهنده روابط تکاملی بین گونه‌های باکتریایی هستند (۱۲).

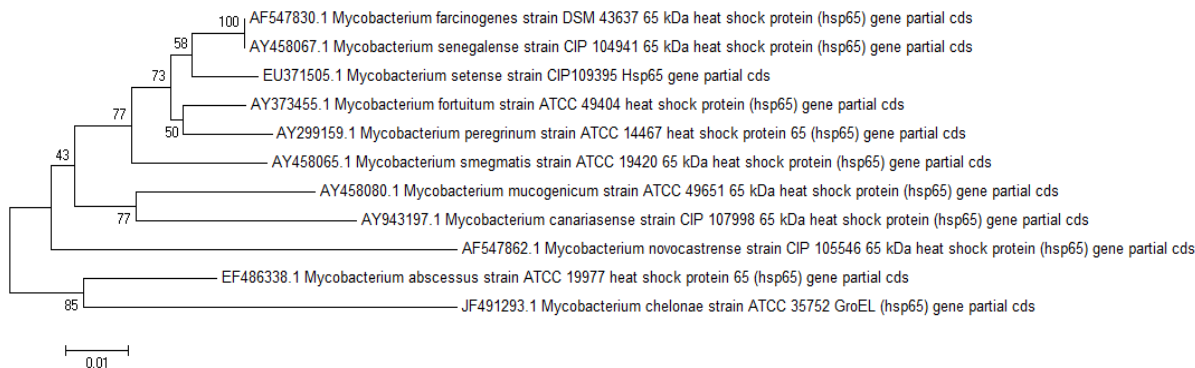
در مجموع، هدف از پژوهش حاضر ارزیابی عملکرد ژن‌های 16S rRNA، *rpoB* و *hsp65* در شناسایی و تعیین روابط فیلوژنیک بین برخی از میکوباکتریوم‌های سریع‌الرشد (RGM) بود.

مواد و روش‌ها

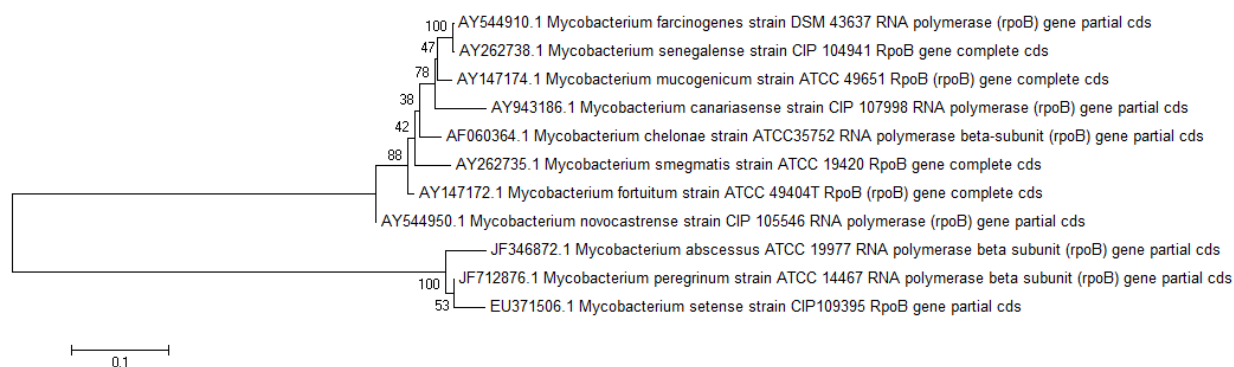
ابتدا با جستجو در پایگاه‌های اطلاعاتی NCBI، RDP و EMBL توالی‌های ثبت شده از برخی میکوباکتریوم‌های سریع‌الرشد برای ژن‌های 16S rRNA، *hsp65* و *rpoB* به صورت فرمت FASTA دریافت گردید. سپس هم‌ردیفی توالی‌ها برای هر ژن به صورت جداگانه توسط Clustal W انجام شد. در نهایت درخت فیلوژنی با استفاده از روش Neighbor Joining و عدد Bootstrap محاسبه شده با Replication 1000 توسط نرم‌افزار MEGA5 رسم



شکل ۱: درخت فیلوژنی براساس تجزیه و تحلیل ژن 16S rRNA



شکل ۲: درخت فیلوژنی براساس تجزیه و تحلیل ژن *hsp65*



شکل ۳: درخت فیلوژنی براساس تجزیه و تحلیل ژن *rpoB*

که مهم‌ترین پاتوژن‌های سریع‌الرشد چون مایکوباکتریوم چلونه و آبسوسوس را بر خلاف ژن 16S rRNA شناسایی نموده و افتراق می‌دهد.

فارسینوژنز و سنگالنس نمی‌باشد. این گونه‌ها با ۱۰۰ درصد Bootstrap جزئی از کلاد اول را تشکیل داده‌اند. مایکوباکتریوم آبسوسوس نیز به تنهایی کلاد سوم را به خود اختصاص داده است.

بحث

امروزه شاهد افزایش گزارش عفونت‌های مایکوباکتریوم‌های محیطی هستیم که در این میان مایکوباکتریوم‌های سریع‌الرشدی مانند مایکوباکتریوم چلونه، فورچئیتوم و آبسوسوس سهم قابل توجهی دارند (۱۳). پیشرفت دانش ژنتیک و تشخیص مولکولی طی سال‌های اخیر، شناسایی مایکوباکتریوم‌ها را بهبود بخشیده است. روش‌های مولکولی در مقابل HPLC (High-performance Liquid Chromatography) و سایر روش‌های مرسوم

درخت فیلوژنی براساس ژن *rpoB*

درخت فیلوژنی ترسیم‌شده بر مبنای این ژن حاوی نه خوشه و زیرخوشه است (شکل ۳). مطابق با این تصویر، گونه‌های مایکوباکتریوم موکوژنیکوم (*Mucogenicum*)، کانارینس، چلونه، اسمگماتیس، فورچئیتوم، نووکاسترنس و آبسوسوس کلادهای مجزایی را به خود اختصاص داده‌اند. باید عنوان نمود که ژن *rpoB* قادر به شناسایی و افتراق مایکوباکتریوم نووکاسترنس و پرگرینوم نمی‌باشد؛ در حالی

عمل می‌کند (۱۶،۱۷). در پژوهش حاضر نیز مشاهده شد که ژن *rpoB* دارای عملکرد بهتری می‌باشد. علاوه بر این، در پژوهش Ade'kambi و همکاران درخت فیلوژنتیک مبنی بر ژن *rpoB* نسبت به ژن‌های 16S rRNA و *recA* دقیق‌تر بود (۱). با توجه به مطالعات صورت گرفته در مورد شناسایی مولکولی گونه‌های میکروبی، دانشمندان به این نتیجه رسیده‌اند که با توجه به تنوع تصادفی ژن‌ها و انتقال افقی و نوترکیبی آن‌ها، بررسی یک ژن به تنهایی نتایج قابل قبولی را به همراه ندارد و بهتر است چند ژن را به طور همزمان مطالعه کرد (۱۸). باید خاطر نشان ساخت که ژن *rpoB* در برخی از موارد قادر به تشخیص مایکوباکتریوم‌ها نمی‌باشد؛ از این رو شناسایی قابل اطمینان مایکوباکتریوم‌ها نیازمند بررسی همزمان چند ژن است (۲۱-۱۸). تکنیک (Multilocus Sequence) MLST (Typing) روشی نسبتاً جدید برای شناسایی و طبقه‌بندی میکروارگانیسم‌ها می‌باشد که طی آن میکروارگانیسم‌ها براساس تعدادی از ژن‌های خانه‌دار شناسایی گشته و افتراق داده می‌شوند (۲۱). براساس مطالعات صورت گرفته ثابت شده است که شناسایی دقیق مایکوباکتریوم‌ها نیازمند بررسی همزمان ژن‌های 16S rRNA، *rpoB* و *hsp65* dnaK می‌باشد (۱،۱۵).

نتیجه‌گیری

بهترین نتایج در ارتباط با شناسایی مولکولی دقیق و کامل مایکوباکتریوم‌های محیطی سریع‌الرشد (RGM) زمانی حاصل می‌شود که چند ژن خانه‌دار از قبیل 16S rRNA و *rpoB* و *hsp65* به طور همزمان مورد مطالعه قرار گیرند.

ملاحظات اخلاقی

مطالعه حاضر مشمول هیچ یک از بند های اخلاقی

بیوشیمیایی نه‌تنها سریع‌تر هستند؛ بلکه بر خلاف HPLC نیازمند تجهیزات خاصی نمی‌باشند و هر آزمایشگاهی می‌تواند به این روش‌ها مجهز گردد (۱۴). هرچند توالی‌یابی ژن 16S rRNA یکی از بهترین کاندیدها برای تشخیص و افتراق گونه‌های میکروبی می‌باشد؛ اما در رابطه با مایکوباکتریوم‌ها در برخی از موارد محدودیت دارد؛ به‌عنوان مثال این ژن قادر نیست گونه‌های نزدیک به هم را تشخیص بدهد. علاوه بر این، برخی از گونه‌های مایکوباکتریومی حاوی بیش از یک نسخه از اپرون rRNA هستند؛ از این رو در این گونه‌ها شناسایی براساس ژن‌های 16S rRNA و ITS امکان‌پذیر نمی‌باشد (۱۵). در مطالعه حاضر عملکرد برخی از ژن‌های خانه‌دار (16S rRNA، *rpoB* و *hsp65*) در افتراق گونه‌های سریع‌الرشد مایکوباکتریومی با استفاده از ترسیم درخت فیلوژنتیک براساس هر ژن به‌طور جداگانه ارزیابی شد که ژن *rpoB* در مقایسه با ژن‌های 16S rRNA و *hsp65* عملکرد قابل قبول‌تری را ارائه کرد. هرچند ژن *rpoB* در برخی از موارد قادر نبود برخی از مایکوباکتریوم‌های سریع‌الرشد را تشخیص دهد؛ اما این ژن به‌طور کلی گونه‌های مایکوباکتریومی را با دقت بالاتری (Bootstrap) تشخیص و افتراق داده بود. به نظر می‌رسد که برای بیان قطعی این گزاره بهتر بود تعداد بیشتری از مایکوباکتریوم‌ها را بررسی می‌کردیم؛ با این حال با توجه به اینکه در این پژوهش ژن *rpoB* توانست مایکوباکتریوم‌های سریع‌الرشد شایع جداشده از نمونه‌های بالینی را با دقت تشخیص دهد و نیز با توجه به نتایج مطالعات مشابه می‌توان گفت که ژن *rpoB* می‌تواند به‌عنوان یکی از بهترین گزینه‌های تشخیص دقیق گونه‌های سریع‌الرشد مایکوباکتریومی محسوب شود. مطابق با پژوهش نصیری و همکاران، ژن *rpoB* در مقایسه با 16S rRNA دارای نواحی متغیرتری بوده و برای شناسایی مایکوباکتریوم‌های سریع‌الرشد بهتر

نمی‌باشد.

تشکر و قدردانی

به این وسیله از زحمات همکاران دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

تضاد منافع

در این مطالعه هیچ گونه تعارض منافی وجود ندارد.

References

- Adékambi T, Drancourt M. Dissection of phylogenetic relationships among 19 rapidly growing Mycobacterium species by 16S rRNA, hsp65, sodA, recA and rpoB gene sequencing. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2004; 54(Pt 6):2095-105.
- Panagiotou M, Papaioannou AI, Kostikas K, Paraskeua M, Velentza E, Kanellopoulou M, et al. The epidemiology of pulmonary nontuberculous mycobacteria: data from a general hospital in Athens, Greece, 2007-2013. *Pulm Med*. 2014; 2014:894979.
- Khaledi A, Bahador A, Esmaili D, Ghazvini K. Prevalence of nontuberculous mycobacteria (NTM) in Iranian clinical specimens: systematic review and meta-analysis. *J Med Bacteriol*. 2017; 5(3-4): 29-40.
- Azadi D, Shojaei H. The role of the laboratory in the diagnosis of tuberculosis. *Iran J Med Microbiol*. 2016; 10(2):1-15.
- 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):27-9.
- Brown TH. The rapidly growing mycobacteria--Mycobacterium fortuitum and Mycobacterium chelonae. *Infect Control*. 1985; 6(7):283-8.
- Silcox VA, Good RC, Floyd MM. Identification of clinically significant Mycobacterium fortuitum complex isolates. *J Clin Microbiol*. 1981; 14(6): 686-91.
- Nessar R, Cambau E, Reytrat JM, Murray A, Gicquel B. Mycobacterium abscessus: a new antibiotic nightmare. *J Antimicrob Chemother*. 2012; 67(4): 810-8.
- Williams K, Ling C, Jenkins C, Gillespie SH, McHugh TD. A paradigm for the molecular identification of Mycobacterium species in a routine diagnostic laboratory. *J Med Microbiol*. 2007; 56(5):598-602.
- Clarridge JE 3rd. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev*. 2004; 17(4):840-62.
- Roth A, Fischer M, Hamid ME, Michalke S, Ludwig W, Mauch H, et al. Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria based on 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences. *J Clin Microbiol*. 1998; 36(1):139-47.
- Martens M, Dawyndt P, Coopman R, Gillis M, De Vos P, Willems A, et al. Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies: a case study using 10 housekeeping genes in the genus Ensifer (including former Sinorhizobium). *Int J Syst Evol Microbiol*. 2008; 58(Pt 1):200-14.
- De Groote MA, Huitt G. Infections due to rapidly growing mycobacteria. *Clin Infect Dis*. 2006; 42(12):1756-63.
- Steingrube VA, Gibson JL, Brown BA, Zhang Y, Wilson RW, Rajagopalan M, et al. PCR amplification and restriction endonuclease analysis of a 65-kilodalton heat shock protein gene sequence for taxonomic separation of rapidly growing mycobacteria. *J Clin Microbiol*. 1995; 33(1):149-53.
- 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.
- Nasiri MJ, Shahraki AH, Fooladi AA, Dabiri H, Feizabadi MM. rpoB gene sequencing for identification of rapidly growing mycobacteria. *Arch Pediatr Infect Dis*. 2017; 5(2):e40001.
- Hashemi SA, Zaker BS. Identification of potentially pathogenic Nontuberculous mycobacteria isolated from drinking water systems in Tehran. *N Cell Mol Biotechnol J*. 2015; 5(20):113-8. [in Persian]
- Gevers D, Cohan FM, Lawrence JG, Spratt BG, Coenye T, Feil EJ, et al. Opinion: Re-evaluating prokaryotic species. *Nat Rev Microbiol*. 2005; 3(9):733-9.
- Paniz-Mondolfi A, Ladutko L, Brown-Elliott BA, Vasireddy R, Vasireddy S, Wallace RJ, et al. First report of Mycobacterium canariasense catheter-related bacteremia in the Americas. *J Clin Microbiol*. 2014; 52(6):2265-9.
- Salehipour M, Zaker BS, Rezaei S, Hashemi SA. Species spectrum of pathogenic Nocardia isolated from patients. *N Cell Mol Biotechnol J*. 2016;

- 6(21):75-84. [in Persian]
21. Macheras E, Konjek J, Roux AL, Thiberge JM, Bastian S, Leão SC, et al. Multilocus sequence typing scheme for the Mycobacterium abscessus complex. Res Microbiol. 2014; 165(2):82-90.

Original Article

Bioinformatics Study of Housekeeping Genes in the Differentiation of Rapidly Growing Mycobacteria

Masoud Keikha*

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

Received: 08 March 2017

Accepted: 15 May 2017

Abstract

Introduction: Rapidly growing mycobacteria (RGM) are capable of producing pulmonary, lymph node, skin, and soft tissue infections in humans. We can identify this group of bacteria based on housekeeping genes. We aimed to compare and evaluate three housekeeping genes in the identification and classification of some rapidly growing mycobacteria using phylogenetic tree.

Materials and Methods: First, sequences of 16S rRNA, *hsp65*, and *rpoB* genes of 10 species of rapidly growing mycobacteria were obtained from National Center for Biotechnology Information (NCBI), Remote Desktop Protocol (RDP), and European Molecular Biology Laboratory (EMBL). Then, these sequences were aligned by Clustal W, and a phylogenetic tree was drawn using MEGA5.0.

Results: Pattern recognition and differentiation of each gene was different. 16S rRNA gene was not able to differentiate between pathogenic rapidly growing mycobacteria such as *Mycobacterium abscessus* and *chelonae*. Generally, the *rpoB* gene outperformed other genes, while it was able to identify *Mycobacterium novocastrense*.

Conclusion: To access complete and correct identification of RGM, all the three genes of 16S rRNA, *rpoB*, and *hsp65* should be studied simultaneously.

Keywords: Nontuberculosis mycobacteria, Phylogenetic analysis, 16S rRNA, *rpoB*
