دوره ۲۰، شماره ۶۳، پاییز ۱۳۹۶، صفحات: ۲۷-۲۰

مقاله پژوهشی

بررسی بیوانفورماتیک ژن‌های خانه‌دار در افتراق مایکوباکتریوم‌های سریع‌الرشد

مسعود کیخا*

دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروب‌شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۲/۱۸ **تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۶/۰۲/۲۵

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 NCBI (National Center for Biotechnology Information)، RDP (Remote Desktop Protocol) و EMBL (European Molecular Biology Laboratory) دریافت شد. سپس این توالی‌ها توسط نرم‌افزار Custal W هم‌طراز 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*

* **نویسنده مسئول:** مسعود کیخا، گروه میکروب‌شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران. تلفن: ۰۹۳۸۶۸۳۶۴۲۵؛ ایمیل: masoudkeikha@outlook.com

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، مایکوباکتریوم ها 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، مایکوباکتریوم های غیر توبرکلوزیس یا محیطی براساس سرعت رشد و تولید رنگ‌دانه (پیگمان) طبقه بندی و شناسایی می‌گردند. براساس این طبقه بندی، گروه های یک تا سه متعلق به مایکوباکتریوم های 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 نان‌کروموژن (فاقد تولید رنگ‌دانه) می‌نامند. باید خاطرنشان ساخت که گروه چهارم حاوی مایکوباکتریوم های سریع‌الرشدی که کمتر از هفت روز رشد می‌کنند می‌باشد (۳-۱). امروزه شواهد مهمی مبنی بر وجود مایکوباکتریوم های محیطی در منابع آب، خاک و گرد و غبار بیمارستان ها وجود دارد. مایکوباکتریوم‌های محیطی موجود در منابع محیطی بیمارستان ها از طریق آلودگی ابزارآلات و تجهیزات پزشکی و انتشار از طریق ذرات گرد و غبار، عفونت های 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 آبسسوس (*Abscessus*) یکی دیگر از معضلات پزشکی ناشی از گونه های 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 Hybridization، PCR RFLP (Restriction Fragment 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*، 32 KDa Protein Gene، *gyrB*، *recA*، *rpoB* و 16S rRNA می‌باشند (۹). 16S rRNA یک ژن ۱۵۵۰ جفت بازی بوده که حاوی مناطق متغیر و حفاظت‌شده می‌باشد. بررسی نواحی متغیر برای تاکسونومی مقایسه ای 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 داده اند 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*)

یا مایکوباکتریوم سنگالنس (*Senegalense*) و فارسینوژز (*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 (۱،۱۰،۱۱). یکی دیگر از کاربردهای ژن های 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 مایکوباکتریوم های سریع‌الرشد (RGM) بود.

مواد و روش‌ها

ابتدا با جستجو در پایگاه‌های اطلاعاتی NCBI، RDP و EMBL توالی‌های ثبت شده از برخی مایکوباکتریوم های سریع‌الرشد برای ژن‌های 16S rRNA، *hsp65* و *rpoB* به صورت فرمت FASTA دریافت گردید. سپس هم ردیفی توالی‌ها برای هر ژن به‌صورت جداگانه توسط Clustal W انجام شد. در نهایت درخت فیلوژنی با استفاده از روش Neighbor Joining و عدد Bootstrap محاسبه‌شده با 1000 Replication توسط نرم‌افزار MEGA5 رسم گردید (۱).

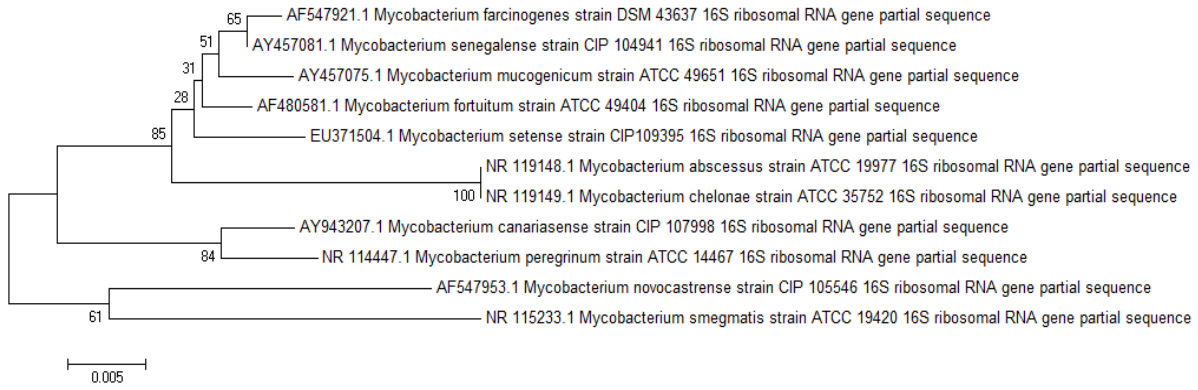
نتایج

درخت فیلوژنی براساس ژن 16S rRNA

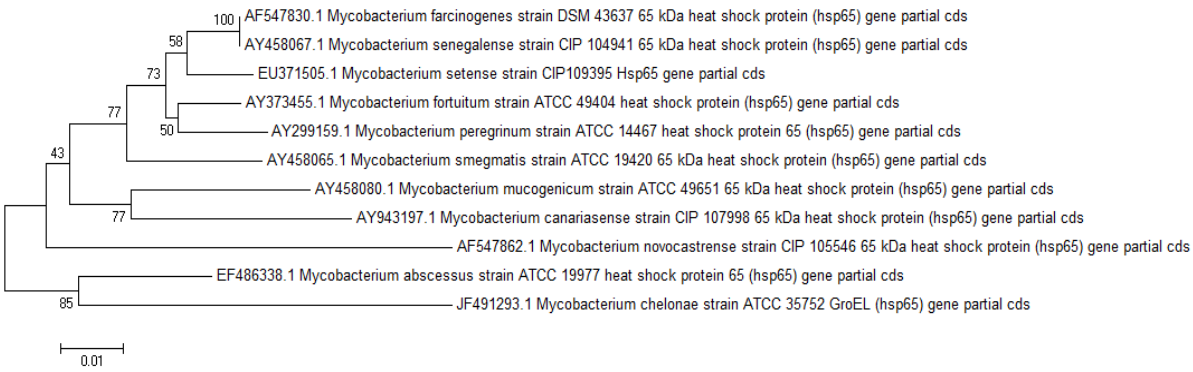
در درخت فیلوژنی حاصل چهار خوشه (کلاد) اصلی به چشم می‌خورد (شکل ۱). در کلاد اول گونه‌های مایکوباکتریومی با درصد Bootstrap پایین با یکدیگر یک کلاد را تشکیل داده‌اند. گونه‌های مایکوباکتریوم چلونه و آبسسوس نیز با ۱۰۰ درصد Bootstrap کلاد دوم را تشکیل داده اند. کلاد سوم نیز حاوی مایکوباکتریوم پرگرینوم (*Peregrinum*) و کانارینس (*Canariasense*) می‌باشد که با ۸۴ درصد Bootstrap کلاد سوم را تشکیل داده اند. در نهایت مایکوباکتریوم 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 مایکوباکتریوم‌های چلونه، آبسسوس و سنگالنس نمی‌باشد.

درخت فیلوژنی براساس ژن hsp65

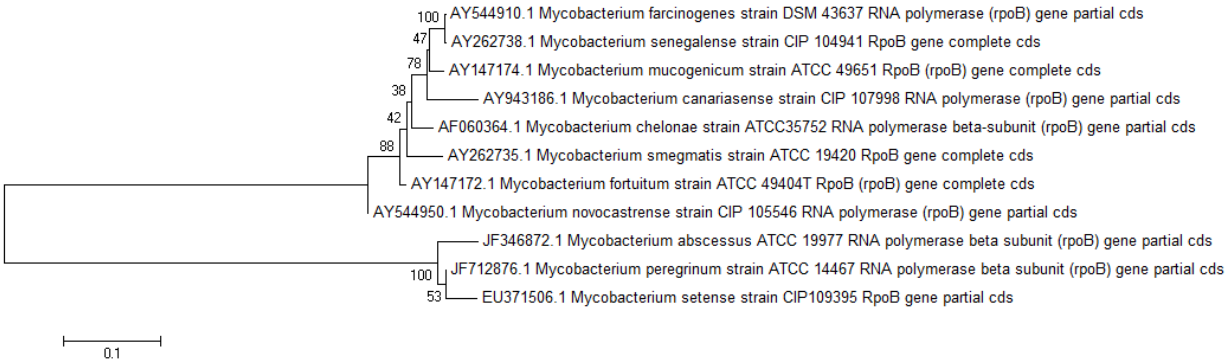
درخت فیلوژنی رسم‌شده حاصل از این ژن دارای چهار خوشه اصلی است (شکل ۲). بر مبنای شکل ۲، ژن *hsp65* قادر به شناسایی و افتراق گونه‌های مایکوباکتریوم



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*

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

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

بحث

امروزه شاهد افزایش گزارش عفونت‌های مایکوباکتریوم‌های محیطی هستیم که در این میان مایکوباکتریوم‌های سریع‌الرشدی مانند مایکوباکتریوم چلونه، فورچئیتوم و آبسسوس 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

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. علاوه‌براین، برخی از گونه‌های مایکوباکتریومی حاوی بیش از یک نسخه از اپرون rRNA هستند؛ از این رو در این گونه‌ها شناسایی براساس ژن‌های 16Sr RNA 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 بررس 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 عمل می‌کند (۱۶،۱۷). در پژوهش حاضر نیز مشاهده شد که ژن *rpoB* دارای عملکرد بهتری می‌باشد. علاوه‌براین، در پژوهش Ade´kambi و همکاران درخت فیلوژنیک مبنی بر ژن *rpoB* نسبت به ژن‌های 16S rRNA و *recA* دقیق‌تر بود (۱). با توجه به مطالعات صورت‌گرفته 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 به‌تنهایی نتایج قابل قبولی را به همراه ندارد و بهتر است چند ژن را به‌طور همزمان مطالعه کرد (۱۸). باید خاطرنشان 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 MLST (Multilocus Sequence 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 صورت‌گرفته ثابت شده است که شناسایی دقیق مایکوباکتریوم‌ها نیازمند بررسی همزمان ژن‌های 16S rRNA، rpoB، rpoBC، hsp65 و 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، *rpoB* و *hsp65* به طور همزمان مورد مطالعه قرار گیرند.

ملاحظات اخلاقی

مطالعه حاضر مشمول هیچ یک از بند های اخلاقی

نمی‌باشد.

تضاد منافع

در این مطالعه هیچ گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

تشکر و قدردانی

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

References

1. 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.
2. 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.
3. Khaledi A, Bahador A, Esmaeili 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.
4. Azadi D, Shojaei H. The role of the laboratory in the diagnosis of tuberculosis. Iran J Med Microbiol. 2016; 10(2):1-15.
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):27-9.
6. Brown TH. The rapidly growing mycobacteria--Mycobacterium fortuitum and Mycobacterium chelonei. Infect Control. 1985; 6(7):283-8.
7. Silcox VA, Good RC, Floyd MM. Identification of clinically significant Mycobacterium fortuitum complex isolates. J Clin Microbiol. 1981; 14(6): 686-91.
8. Nessar R, Cambau E, Reyrat JM, Murray A, Gicquel B. Mycobacterium abscessus: a new antibiotic nightmare. J Antimicrob Chemother. 2012; 67(4): 810-8.
9. 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.
10. 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.
11. Roth A, Fischer M, Hamid ME, Michalke S, Ludwig W, Mauch H, et al. Differentiation of phylogenetically related slowly growing myco-bacteria based on 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences. J Clin Microbiol. 1998; 36(1):139-47.
12. 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.
13. De Groote MA, Huitt G. Infections due to rapidly growing mycobacteria. Clin Infect Dis. 2006; 42(12):1756-63.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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]
18. 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.
19. 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.
20. 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.

Volume 20, Issue 63, Autumn 2017, Pages: 20-27

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 comapre and evaluate three housekeeping genes in the identification and classification of some rapidly growing mycobacteria using phylogenic 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 Custal W, and a phylogenic tree was draw 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, Phylogenic analysis, 16S rRNA, *rpoB*

**** Corresponding Author:*** Masoud Keikha, Department of Medical Microbiology, Isfahan Medical School, Isfahan, Iran. Tel : 09386836425; Email: masoudkeikha@outlook.com