

## ارزیابی لوکوس‌های QUB26، QUB4156، QUB11b در مایکوباکتریوم

## سیمیه با روش VNTR

هدی دژخی<sup>۱</sup>، پریسا فرنیاز<sup>۲\*</sup>، اعظم حدادی<sup>۱</sup>، پوپک فرنیاز<sup>۳</sup>، علی اکبر ولایتی<sup>۲</sup>

- (۱) گروه میکروبیولوژی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران  
 (۲) مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی، پژوهشکده سل و بیماری‌های ریوی، مرکز آموزشی، پژوهشی و درمانی سل و بیماری‌های ریوی بیمارستان دکتر مسیح دانشوری، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی، تهران، ایران  
 (۳) گروه بیوتکنولوژی، دانشکده فن‌آوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

## چکیده:

مایکوباکتریوم سیمیه‌ایی به عنوان فراوانترین گونه مایکوباکتریومی کندرشد جداسازی شده از نمونه‌های بالینی ایران شناسایی گردیده است. یکی از روش‌های انگشت‌نگاری ژنتیکی که بدین منظور مورد استفاده قرار می‌گیرد، روش توالی‌های تکراری پشت سرهم (VNTR، Variable Number Tandem Repeat) نام دارد. در این مطالعه علاوه بر روش hsp65 PCR-RFLP الگوی ژنتیکی ایزوله‌های مایکوباکتریوم‌های سیمیه‌ای با استفاده از لوکوس‌های QUB11b، QUB4156، QUB26 و روش VNTR به منظور مطالعات اپیدمیولوژیکی بررسی گردید. در این بررسی از میان ۵۶ نمونه مایکوباکتریوم‌های آتیپیک ریوی و خارج ریوی ایزوله شده از بیماران با علائم سل ریوی، با استفاده از کشت بر روی محیط LJ و تست‌های افتراقی شامل احیای نیترات، آزمایش فعالیت کاتالاز، تست نیاسین، سرعت رشد و تولید پیگمان و روش hsp65 PCR-RFLP، ایزوله‌های مایکوباکتریوم سیمیه‌ای شناسایی شدند. سپس حساسیت دارویی به روش مولکولار انجام شد. همچنین با استفاده از لوکوس‌های QUB11b، QUB4156، QUB26 الگوی ژنتیکی VNTR بر روی ایزوله‌های مایکوباکتریوم سیمیه‌ای و مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس بررسی گردید. از مجموع ۵۶ مایکوباکتریوم غیرسلی ایزوله شده، ۴۱ نمونه (۷۳/۲٪) کندرشد و ۱۵ نمونه (۲۶/۷٪) سریع‌الرشد بودند. از میان کند رندها، ۳۰ نمونه (۷۳/۱٪) مایکوباکتریوم سیمیه و در میان سریع‌الرندها بیشترین تعداد مربوط به مایکوباکتریوم آبسوس، ۱۲ نمونه (۸۰٪) گزارش شد. از میان ۳۰ نمونه مایکوباکتریوم سیمیه مورد مطالعه، (۱۰٪) از نمونه‌ها به آمیکاسین و کانامایسین حساس و به سیپروفلوکسازین مقاوم و (۶/۶٪) به آمیکاسین و کانامایسین مقاوم و به سیپروفلوکسازین حساس بودند. لوکوس QUB11b بالاترین قدرت افتراق (HGI=0.7) را در بین سویه‌های مایکوباکتریوم سیمیه مورد آزمایش داشت و بسیار پلی مورف بود. لوکوس QUB11b در هر دو گروه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس و مایکوباکتریوم سیمیه دارای بالاترین قدرت تمایز به ترتیب ۰/۶ و ۰/۷ می‌باشد. این لوکوس نمی‌تواند برای تمایز دو گروه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس و مایکوباکتریوم سیمیه استفاده شود ولی برای تمایز ساب‌تایپ‌های مایکوباکتریوم سیمیه به دلیل قدرت افتراق بالا مناسب می‌باشد.

واژگان کلیدی: مایکوباکتریوم سیمیه، hsp65 PCR-RFLP، VNTR، لوکوس‌های QUB26، QUB4156، QUB11b

\* نویسنده مسئول:

دکتر پریسا فرنیاز، مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی، پژوهشکده سل و بیماری‌های ریوی، بیمارستان دکتر مسیح دانشوری، دارآباد، تهران، ایران، پست الکترونیک: [pfarnia@hotmail.com](mailto:pfarnia@hotmail.com)

**مقدمه:**

مایکوباکتریومها به سه دسته کلی تقسیم می شوند: مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس که عامل اصلی سل ریوی در انسان و حیوان به حساب می آید، مایکوباکتریوم لپرا عامل جذام و مایکوباکتریومهای آتیپیک<sup>۱</sup>، غیرسلی یا محیطی که اصطلاحاً به آنها<sup>۲</sup> NTM یا<sup>۳</sup> MOTT گفته می-شود. (۲۰۱)

مایکوباکتریومهای غیرسلی تا دهه ۱۹۵۰ میلادی به عنوان پاتوژنهای انسانی پذیرفته نشده بودند اما امروزه ویژگی بیماری‌زایی این باکتری‌ها به خوبی شناخته شده است. بر اساس مطالعات اخیر، گونه‌های مایکوباکتریایی غیرسلی (NTM) قادرند انواع مختلفی از بیماریهای انسانی را در ریه، پوست، کلیه و سایر نقاط بدن به ویژه در افراد با نقص سیستم ایمنی ایجاد کنند. (۵،۴،۳)

تاکنون، بیش از ۱۷۵ گونه NTM شناسایی شده است که ساپروفیت‌های آزادی یا محیطی هستند که در طبیعت پراکنده می‌باشند و می‌توان آنها را در آب، خاک، حیوانات و حتی غذای روزانه یافت. (۷،۶)

اگر چه تاکنون انتقال فرد به فرد بیماری گزارش نشده است، اما مقاوم بودن این دسته به اکثر داروهای ضدسلی مانند (ایزونیازید، ریفامپین، استریتوماسین، اتامبوتول و پیرازینامید)، توجه بسیاری از محققین را به خود جلب کرده است. (۸)

مایکوباکتریوم سیمیه، یکی از NTM هایی است که از نمونه‌های بالینی انسانی جدا می‌شود و در ایران، ایتالیا، ایالات متحده، فلسطین، کوبا، ژاپن و ترکیه توصیف شده است. (۱۰،۹)

مایکوباکتریوم سیمیه می‌تواند از طریق منابع محیطی مانند خاک و آب، مانند آب لوله‌کشی به بیماران منتقل شود با این حال هیچ شواهد قوی مبنی بر انتقال انسان به انسان وجود ندارد. (۱۱)

در گذشته هنگام مواجهه با عفونت‌های ریوی و لنفادنیت تشخیص اصلی با<sup>۴</sup> M. tuberculosis بود. طبق

مطالعات انجام شده توسط بقایی و همکاران در سال ۲۰۱۲ و باغی‌زاده و همکاران در سال ۲۰۱۷، نشان داده شده است که مایکوباکتریوم سیمیه ممکن است با تظاهرات بالینی و رادیولوژیکی مشابه با سل ظاهر شود. (۱۳،۱۲)

طبق شواهد گزارش شده، بیشتر عفونت‌های مایکوباکتریوم سیمیه در بیماران مبتلا به نقص ایمنی سندرم نقص ایمنی اکتسابی (AIDS<sup>۵</sup>) و یا بیماران مبتلا به اختلالات ریوی مانند (COPD<sup>۶</sup>) رخ داده است. (۱۵،۱۴)

در سالهای اخیر روشهای مولکولی متعددی برای بررسی اپیدمیولوژیکی مایکوباکتریومها به کار برده شده است از جمله: JS6110-RFLP، PCR-RFLP<sup>۷</sup>، اسپولیگوتایپینگ، PFGE<sup>۸</sup>، rep-PCR<sup>۹</sup> (۱۸،۱۷،۱۶)

اگرچه این تکنیکها قادر به تمایز مایکوباکتریومهای آتیپیک از مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس می‌باشند، اما پرهزینه و وقت‌گیر هستند و در مایکوباکتریومهای آتیپیک از حساسیت کمتری برخوردار هستند.

روش VNTR ابزار دقیقی برای مطالعه الگوی ژنتیکی مایکوباکتریومهای آتیپیک است زیرا آنالیز در آن براساس لوکوسهای اختصاصی و اندک صورت می‌گیرد که در مقایسه با روشهای استاندارد مولکولی دیگر مانند اسپولیگوتایپینگ از حساسیت بالاتری برخوردار است. (۲۰،۱۹)

شیوه تشخیصی VNTR در ابتدا توسط مازارس (Mazars) و همکارانش بر اساس تعداد متغیر تکرارهای پشت سر هم واحدهای تکرار شونده پراکنده شده مایکوباکتریومی (MIRU-VNTR) ابداع شد. (۲۱،۱۶)

هر جدایه بر اساس تعداد کپی‌های واحدهای تکرار شونده در ۱۲ لوکوس مستقل در سراسر ژنوم تیپ‌بندی می‌شود. واحدهای تکرار شونده ۵۲ الی ۷۲ نوکلئوتید در طول را شامل می‌شوند و تعداد واحدهای تکرار شونده می‌تواند از طریق سبزه قطعه تولید شده حاصل از تکثیر لوکوس مشخص شود. (۲۲،۲۳)

<sup>۵</sup> Acquired immunodeficiency syndrome

<sup>۶</sup> Chronic obstructive pulmonary disease

<sup>۷</sup> PCR-restriction fragment length polymorphism

<sup>۸</sup> Pulsed-field gel electrophoresis

<sup>۹</sup> Repetitive element sequence-based

<sup>۱</sup> Atypical mycobacteria

<sup>۲</sup> Nontuberculous mycobacteria

<sup>۳</sup> Mycobacteria other than tuberculosis

<sup>۴</sup> Mycobacterium tuberculosis

جدول ۱ - توالی پرایمرهای مورد استفاده در تعیین هویت مایکوباکتریوم

Detection target	Sequences
IS6110	TB1(5'-ATC CTG CGA GCG TAG GCG TCG G-3') TB2(5'-CAG GAC CAC GAT CGC TGA TCC GG-3')
hsp65	TB11(5'-ACC AAC GAT GGT GTG TCC AT-3') TB12(5'-CTT GTC GAA CCG CAT ACC CT-3')

بین بردن فلور نرمال و بقایای مواد آلی و سپس کشت بر روی محیط لون اشتاین جانسون (LJ<sup>۲</sup>) انجام شد. بر روی نمونه‌های آلودگی‌زدایی شده رنگ آمیزی زیل نلسون، مشاهده میکروسکوپی و تست‌های بیوشیمیایی از قبیل تست‌های نیاسین، فعالیت کاتالاز، احیاء نیترات، سرعت رشد و تولید پیگمان صورت گرفت. (۲۶، ۲۷)

استخراج DNA مایکوباکتریوم در نمونه‌های بالینی با استفاده از کیت کیاژن و مطابق با پروتکل استاندارد ارائه شده در کیت و تشخیص گونه‌های کمپلکس مایکوباکتریوم توپرکلوزیس با استفاده از روش-PCR IS6110 انجام شد و تمامی این نمونه‌ها پس از محرز شدن حضور گونه‌های کمپلکس مایکوباکتریوم توپرکلوزیس از روند آزمایش کنار گذاشته شدند. (۲۸)

سپس بر روی نمونه‌های حاوی مایکوباکتریوم‌های آتیپیک تعیین هویت با روش PCR-RFLP بر روی ژن

hsp65<sup>۳</sup> برای تکثیر قطعه ۴۳۹ جفت بازی با استفاده از از پرایمرهای ذکر شده در جدول ۱ انجام شد. سیکل‌های PCR به صورت زیر انجام گرفت: ۵ دقیقه در دمای ۹۵°C، ۹۵، ۳۰ سیکل شامل: ۹۴°C به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۶°C به مدت ۱ دقیقه، ۷۲°C به مدت ۴۰ ثانیه و در پایان ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه.

در ادامه، محصول PCR با استفاده از آنزیم‌های محدودکننده BstEII و HaeIII برای تمایز جدایه‌های مایکوباکتریوم سیمیه و سایر مایکوباکتریوم‌های آتیپیک برش داده شد. تجزیه و تحلیل باندهای حاصل جهت تعیین نوع مایکوباکتریوم آتیپیک به کمک سایت تحلیلی PRA Patterns صورت گرفت. (۲۹، ۳۰، ۳۱)

همچنین Supply و همکاران نشان دادند که تکرارهای پشت سر هم با تعداد متغیر مایکوباکتریایی (MIRU-<sup>۱</sup> VNTR)، می‌تواند به عنوان یک روش استاندارد برای تمایز اپیدمیولوژیکی جدایه‌های *M. tuberculosis* استفاده شود (۲۴).

اگرچه لوکوسهای ژنی به طور عمده در مطالعات اپیدمیولوژی و تمایز سویه‌های مایکوباکتریوم توپرکلوزیس کمپلکس به کار می‌رود اما این تکنیک در مایکوباکتریوم‌های آتیپیک از قدمت کمتری برخوردار بوده و مطالعات در این زمینه ادامه دارد. مطالعات انجام شده در سالهای اخیر نشان می‌دهد که لوکوسهای QUB از دقت و حساسیت بالایی برای افتراق و تمایز گونه‌های مختلف مایکوباکتریوم برخوردار هستند. (۲۵)

در ایران، اپیدمیولوژی مولکولی و تأثیر بالینی مایکوباکتریوم سیمیه به خوبی مشخص نشده است. از این رو، در مطالعه حاضر علاوه بر روش hsp65 PCR-RFLP، سه لوکوس ژنی QUB4156، QUB11b، QUB26 با استفاده از روش VNTR به منظور یافتن لوکوسهای پلی‌مورفیک و مطالعات اپیدمیولوژیک در مایکوباکتریوم سیمیه و تمایز از مایکوباکتریوم توپرکلوزیس کمپلکس جداسازی شده از بیماران مبتلا به سل ریوی مورد بررسی قرار گرفت.

### مواد و روش‌ها:

با مراجعه به آرشیو مرکز تحقیقات مایکوباکتریوم، نمونه‌های بالینی (خلط) مراجعه‌کنندگان به بیمارستان مسیح دانشوری که مشکوک به مایکوباکتریوم توپرکلوزیس بودند، در طی سال ۱۳۹۸ تا ۱۳۹۹، تعداد ۱۲۵۰ نمونه جمع‌آوری شد. سپس با استفاده از روش پتروف هضم و آلودگی‌زدایی (Decontamination) نمونه‌ها جهت از

<sup>۲</sup> Lowenstein Jensen

<sup>۳</sup> Heat shock proteins

<sup>۱</sup> Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit Variable Number Tandem Repeat



جدول ۲ - توالی پرایمرهای مورد استفاده در تایپینگ VNTR

Locus target	Sequences (5'-3')	Annealing temperature (C°)	Product size (bp)
Qub4156	F: TGACCACGGATTGCTCTAGT R: GCCGCGTCCATGTT	54.5	680
Qub11b	F: CGTAAGGGGGATGCGGGAAATAGG R: CGAAGTGAATGGTGGCAT	61	412
Qub26	F: AACGCTCAGCTGTCGAT R: CGGCCGTGCCGCCAGTCTTCCCGAT	53.3	708

قدرت تمایز لوکوسهای مختلف MIRU-VNTR با استفاده از شاخص HGI<sup>۲</sup> محاسبه شد. بر این اساس، قدرت افتراق به عنوان ضعیف ( $HGDI \leq 0.3$ )، متوسط ( $0.3 < HGDI < 0.6$ ) و قوی ( $HGDI \geq 0.6$ ) طبقه بندی شدند (۳۵).

#### یافته‌ها:

از میان ۱۲۵۰ نمونه ارسالی به آزمایشگاه که مورد مطالعه قرار گرفتند، ۶۳۲ نفر دارای تست مثبت بودند. پس از تعیین هویت مایکوباکتریومها، ۵۷۶ نمونه در گروه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس قرار گرفتند که ۴۳۳ نفر مرد (۶۸.۵ درصد) و ۱۴۳ نفر زن (۲۲.۶ درصد) بودند و ۵۶ نمونه دیگر در گروه مایکوباکتریومهای آتیپیک طبقه بندی شدند که ۳۵ نفر مرد (۵.۵ درصد) و ۲۱ نفر زن (۳.۳ درصد) بودند (جدول شماره ۳).

نتایج حاصل از تست‌های افتراقی با نتایج روش hsp65 PCR-RFLP مطابقت داشته و از میان ۵۶ مایکوباکتریوم غیرسلی جداسازی شده، ۴۱ نمونه (۷۳.۲٪) کندرشد و ۱۵ نمونه (۲۶.۷٪) سریع‌الرشد بودند. از میان کندر شده‌ها، ۳۰ نمونه (۷۳.۱٪) مایکوباکتریوم سیمیه و در میان سریع‌الرشد‌ها بیشترین تعداد مربوط به مایکوباکتریوم آبسوس، ۱۲ نمونه (۸۰٪) گزارش شد. (جدول شماره ۴).

از مجموع ۳۰ نمونه مایکوباکتریوم سیمیه مورد مطالعه، ۱۰۰٪ آنها ساب‌تایپ نوع I بودند و به داروهای خط اول مقاومت نشان دادند. از بین این تعداد، ۲۵ نمونه (۸۳.۳٪) به داروهای خط دوم ( آمیکاسین، کاناماسین، سیپروفلوکسازین) حساسیت نشان دادند. از ۵ نمونه

تعداد ۳۰ نمونه از نمونه‌های بالینی مایکوباکتریوم سیمیه جداسازی شده و پس از آن بررسی مولکولی حساسیت دارویی به داروهای خط اول شامل: ریفامپین، ایزونیاژید، اتامبوتول به ترتیب بر روی ژنهای rpoB، katG، inhA، embA و خط دوم شامل: سیپروفلوکسازین، آمیکاسین، کاناماسین به ترتیب بر روی ژنهای gyrA، rrs و rrs انجام شد و نمونه‌ها به سه گروه حساس، MDR<sup>۱</sup> و غیر MDR تقسیم شدند. (۳۲، ۳۳)

در انتها، لوکوسهای QUB4156، QUB11b، QUB26 با استفاده از روش VNTR بر روی ۱۵ نمونه مایکوباکتریوم سیمیه و ۱۵ مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس مورد بررسی قرار گرفت. هر لوکوس به طور جداگانه و با استفاده از پرایمرهای ذکر شده در جدول ۲، PCR شد. (۳۴)

در این مطالعه از سوش استاندارد M. tuberculosis H37Rv به عنوان کنترل مثبت و آب مقطر به عنوان کنترل منفی در هر واکنش استفاده شد.

سیکل‌های PCR به صورت زیر انجام شد: ۵ دقیقه در دمای ۹۵°C، سپس ۳۵ سیکل شامل: ۹۴°C به مدت ۴۵ ثانیه، ۶۱-۵۳°C به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲°C به مدت ۴۵ ثانیه و در پایان ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه.

محصولات PCR روی ژل ۲ درصد الکتروفورز گردید. تعداد توالیهای تکرارشونده پشت سرهم به وسیله‌ی اندازه محصول PCR بر روی ژل تعیین شد و بعد از توالی‌یابی، تجزیه و تحلیل داده‌ها به منظور تایپینگ و انگشت‌نگاری توسط سایت MIRU-VNTRplus صورت گرفت.

<sup>2</sup> Hunter Gaston Index

<sup>1</sup> Multiple Drug Resistance

جدول ۳ - نتایج مثبت و منفی حاصل از نمونه های ارسالی به آزمایشگاه

تعداد کل	مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس		مایکوباکتریومهای آتیپیک		منفی
	مرد	زن	مرد	زن	
۱۲۵۰	۴۳۳	۱۴۳	۳۵	۲۱	۶۱۸
	۵۷۶		۵۶		۶۱۸
					۶۳۲

جدول ۴ - نتایج حاصل از تعیین هویت مایکوباکتریومهای آتیپیک با استفاده از روش hsp65 PCR-RFLP

مرد	زن	گونه	
۱۷	۱۳	مایکوباکتریوم سیمیه	کند رشد
۳	۰	مایکوباکتریوم کانزاسی	
۶	۲	مایکوباکتریوم اینتراسلولار	سریع رشد
۲	۰	مایکوباکتریوم فورچوئیتوم	
۷	۵	مایکوباکتریوم آبسوسوس	
۱	۰	مایکوباکتریوم چلونی	
۳۶	۲۰	تعداد کل	

بین سویه‌های مایکوباکتریوم سیمیه مورد آزمایش داشت و بسیار پلی مورف بود.

درحالی‌ه لوکوسهای QUB26 و QUB4156 به ترتیب (HGI=0.3) و (HGI=0) دارای قدرت افتراق ضعیف هستند که مناسب برای افتراق سویه‌های مایکوباکتریوم سیمیه نیستند. (جدول شماره ۵).

قدرت تمایز لوکوس QUB11b در هر دو گروه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس و مایکوباکتریوم سیمیه به ترتیب ۰.۶ و ۰.۷ است که قدرت تفکیک بالایی می‌باشد. این لوکوس نمی‌تواند برای افتراق دو گروه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس و مایکوباکتریوم سیمیه استفاده شود ولی برای تمایز سویه‌های مایکوباکتریوم سیمیه به دلیل قدرت افتراق بالا مناسب می‌باشد.

با توجه به اینکه قدرت تمایز لوکوس QUB4156 در سویه‌های مایکوباکتریوم سیمیه برابر ۰ بود اما این لوکوس نیز می‌تواند قابل تمایز بین دو گروه

باقیمانده، ۳ نمونه (۱۰٪) به آمیکاسین و کاناماسین حساس و به سیپروفلوکسازین مقاوم و ۲ نمونه (۶.۶٪) به آمیکاسین و کاناماسین مقاوم و به سیپروفلوکسازین حساس بودند.

تمایز سویه‌های مایکوباکتریوم سیمیه جدا شده از بیماران با استفاده از روش VNTR:

اندازه محصول PCR در لوکوسهای QUB11b، QUB4156، QUB26 به ترتیب ۴۱۲bp، ۶۸۰bp، ۷۰۸bp و تعداد کپی‌های واحدهای تکرارشونده در این لوکوسها ۵، ۲، ۵ برای سویه‌ی استاندارد H37RV می‌باشد.

برخلاف سویه‌ی استاندارد H37RV، محصول PCR در بعضی از نمونه‌های مایکوباکتریوم سیمیه جدا شده از بیماران مشاهده نشد. آنالیزها بر اساس حضور باند در سایر نمونه‌ها صورت گرفت.

در این مطالعه بر اساس شاخص HGI، لوکوس QUB11b بالاترین قدرت افتراق (HGI=0.7) را در

جدول ۵ - نتایج مربوط به پروفایل عددی لوکوسهای مربوطه در نمونه‌های کلینیکی مورد بررسی

QUB4156	QUB26	QUB11b	<i>M. tuberculosis</i> complex	QUB4156	QUB26	QUB11b	<i>M. simiae</i>
2	7	6	sample 1	-	1	1	sample 1
2	9	6	sample 2	-	1	3	sample 2
2	-	6	sample 3	-	1	7	sample 3
2	8	6	sample 4	-	-	2	sample 4
-	8	6	sample 5	-	1	2	sample 5
2	-	6	sample 6	-	1	1	sample 6
2	8	3	sample 7	1	3	2	sample 7
2	-	2	sample 8	1	1	2	sample 8
2	-	2	sample 9	-	1	1	sample 9
2	5	2	sample 10	-	1	-	sample 10
2	7	2	sample 11	-	1	5	sample 11
4	6	2	sample 12	-	1	-	sample 12
3	8	2	sample 13	-	1	2	sample 13
3	8	2	sample 14	0	3	1	sample 14
4	3	2	sample 15	-	2	1	sample 15
0.4	0.8	0.6	HGI	0	0.3	0.7	HGI

لوکوس در سویه‌های مایکوباکتریوم سیمیه ۱،۳ و ۲ می باشد در حالیکه پروفایل عددی این لوکوس در سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از ۳ تا ۹ متغیر می‌باشد. از اینرو این لوکوس نیز با توجه به تفاوت در سایز باندهای حاصل از PCR می‌تواند به عنوان افتراق‌دهنده استفاده شود.

### بحث و نتیجه‌گیری:

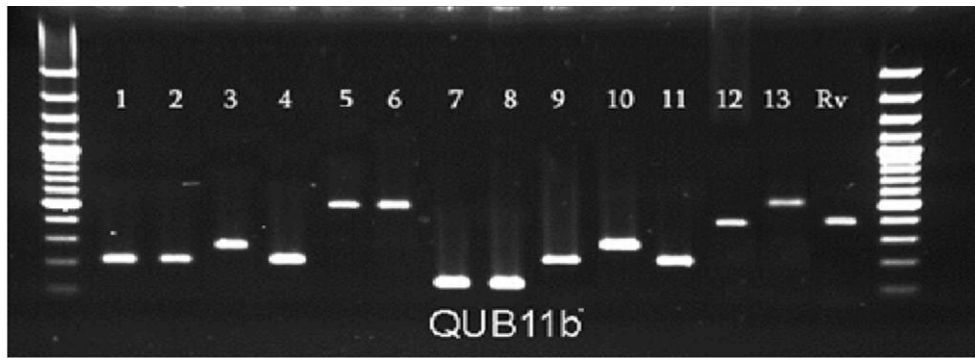
مایکوباکتریوم سیمیه کمپلکس در زمره مهمترین مایکوباکتریوم‌های آتیبیک جای می‌گیرد و شایع‌ترین گونه‌ی بیماری‌زای این کمپلکس است که برای نخستین بار در سال ۱۹۶۵ میلادی از میمون رزوس ماکاک جداسازی گردید و ویژگی بیماری‌زایی آن در انسان چندین سال بعد مشخص گردید. (۳، ۳۶)

مایکوباکتریوم سیمیه به عنوان یکی از عوامل مهم پدید آورنده بیماری‌های ریوی در بیماران مبتلا به سندرم نقص اکتسابی سیستم ایمنی و حتی در افراد سالم به شمار می‌آید. علاوه بر این، بیماران مبتلا به دیابت شیرین، بیماری‌های قلبی-عروقی و انواع تومورهای

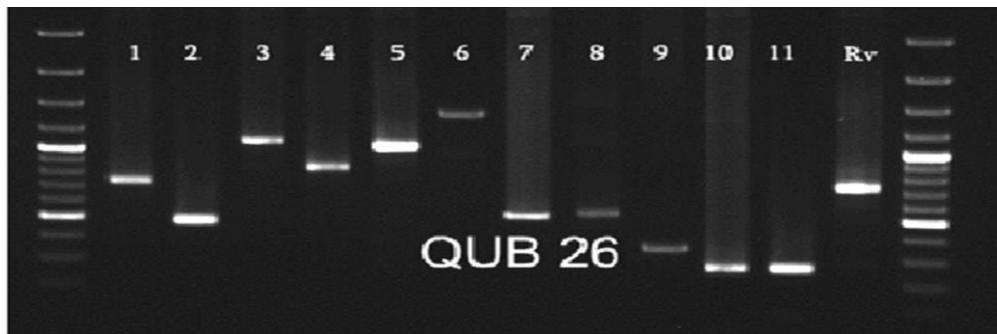
مایکوباکتریوم سیمیه و مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس باشد. قدرت افتراق این لوکوس در سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس برابر  $HGDI=0.4$  است که متوسط است. الگوی عددی آن ۲، ۳ و ۴ است. اما اطلاعات و باندهای حاصل از این لوکوس در نمونه‌های مایکوباکتریوم سیمیه با جدول استاندارد در سایت MIRU-VNTR PLUS مطابقت نداشت و اندازه باندها بین ۳۰۰-۴۰۰ bp بود و این خود می‌تواند روشی برای افتراق دو گروه باشد. فقط در سه نمونه، باند PCR به دست آمد که الگوی عددی تکرار کپی آن ۱ و ۰ بود که باز هم مشابه الگوی عددی گروه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس نیست و از این اعداد هم می‌توان برای تمایز استفاده کرد.

لوکوس QUB26 در سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بالاترین قدرت افتراق را نشان داد  $HGDI=0.8$ . در حالیکه در نمونه‌های مایکوباکتریوم سیمیه دارای قدرت افتراق ضعیف بود  $HGDI=0.3$ .

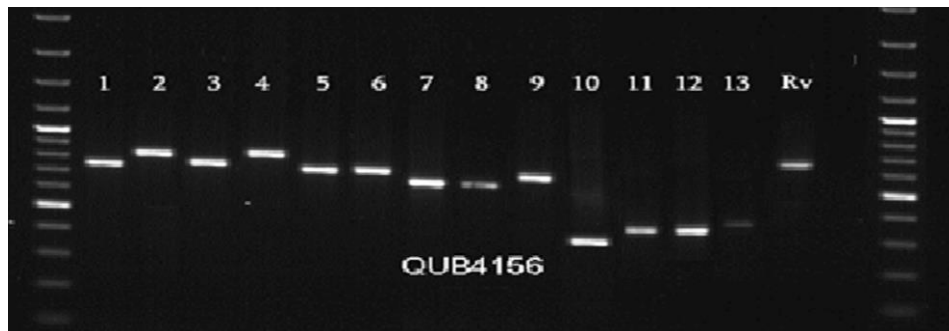
اما صرف‌نظر از شاخص  $HGDI$ ، از این لوکوس به خوبی می‌توان برای افتراق استفاده کرد. زیرا الگوی عددی این



شکل ۱ - محصولات PCR لوکوس QUB11b (لاین ۱-۶ سایز باندهای حاصل در سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و لاین ۷-۱۳ مربوط به سویه‌های مایکوباکتریوم سیمیه است). ردیف اول و آخر مارکر 100bp plus، آخرین نمونه سویه H37RV است.



شکل ۲ - محصولات PCR لوکوس QUB26 (لاین ۱-۶ سایز باندهای حاصل در سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و لاین ۷-۱۳ مربوط به سویه‌های مایکوباکتریوم سیمیه است). ردیف اول و آخر مارکر 100bp plus، آخرین نمونه سویه H37RV است.



شکل ۳ - محصولات PCR لوکوس QUB4156 (لاین ۱-۶ سایز باندهای حاصل در سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و لاین ۷-۱۳ مربوط به سویه‌های مایکوباکتریوم سیمیه است). ردیف اول و آخر مارکر 100bp plus، آخرین نمونه سویه H37RV است.

توبرکلوزیس نیاسین مثبت می باشد؛ به همین دلیل در اکثر موارد با باسیل کخ اشتباه گرفته می شود (۳۷). بنابراین، تشخیص صحیح و تفکیک آن از باسیل کخ به خصوص در عفونت‌های ریوی بسیار حائز اهمیت می‌باشد.

سرطانی، مستعد ابتلا به مایکوباکتریوم سیمیه می‌باشند (۳۸).

این گونه از نظر تولید رنگدانه فتوکروموژن می‌باشد و تنها مایکوباکتریومی است که همچون مایکوباکتریوم

همچنین، مقاوم بودن مایکوباکتریوم سیمیه به اکثر داروهای ضدسلی و انتشار وسیع آن‌ها در طبیعت، اهمیت مطالعه بر روی این پاتوژن انسانی به عنوان یک گونه کلینیکی حائز اهمیت را برجسته‌تر ساخته است.

مقاله مروری منتشر شده توسط ولایتی و همکارانش، مایکوباکتریوم‌های آتیپیک در منطقه خاورمیانه را مورد بررسی قرار داده است، مایکوباکتریوم سیمیه را به عنوان دومین مایکوباکتریوم کندرشد شایع در نمونه‌های بالینی خاورمیانه معرفی نمود. (۷)

در مطالعه حاضر، از مجموع ۱۲۵۰ نمونه آزمایش شده در طول یک سال مطالعه، ۵۷۶ نمونه حاوی جدایه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس بودند و از ۵۶ نمونه حاوی جدایه‌های مایکوباکتریوم آتیپیک نیز ۳۰ نمونه (۵۳.۵٪) به عنوان مایکوباکتریوم سیمیه ساب‌تایپ نوع I شناسایی شدند.

حیدریه و همکارانش در مطالعه‌ای گزارش کردند، از مجموع ۸۸ جدایه بالینی کندرشد، مایکوباکتریوم سیمیه بیش از نیمی از نمونه‌ها (۴۸ جدایه) را به خود اختصاص داده است. (۳۹)

علاوه بر این، بقای و همکارانش در زمینه بیماری‌های ریوی ایجاد شده توسط مایکوباکتریوم سیمیه، در طی سال‌های ۲۰۰۲ تا ۲۰۰۹ گزارش کردند از میان ۱۸۵۰ بیمار مراجعه کننده به آزمایشگاه فرانس سل، ۲۶ مورد ابتلا مربوط به مایکوباکتریوم سیمیه بود. تمامی این یافته‌ها بر ضرورت مطالعه مایکوباکتریوم سیمیه به عنوان شایع‌ترین نمونه بالینی جداسازی شده در ایران دلالت می‌نماید. (۱۳)

نتایج حساسیت دارویی در این مطالعه نشان داد که از میان ۳۰ ایزوله مایکوباکتریوم سیمیه، ۲۵ ایزوله (۸۳.۳٪) به داروهای خط دوم (آمیکاسین، کانامایسین، سیپروفلوکسازین) حساسیت نشان دادند. از ۵ نمونه باقیمانده، ۳ ایزوله (۱۰٪) به آمیکاسین و کانامایسین حساس و به سیپروفلوکسازین مقاوم و ۲ ایزوله (۶.۶٪) به آمیکاسین و کانامایسین مقاوم و به سیپروفلوکسازین حساس بودند. Hamieh و همکاران در لبنان گزارش کردند که تمام ایزوله‌های بالینی مایکوباکتریوم سیمیه به سیپروفلوکسازین مقاوم هستند و تنها ۱۲٪ به

آمیکاسین مقاومت نشان دادند که با گزارش مطالعه حاضر مغایرت داشت. (۴۰)

در مطالعه دیگری، Van Ingen و همکاران، میزان حساسیت به سیپروفلوکسازین را ۳۳-۶۲٪ و به آمیکاسین را ۱۴-۴۰٪ گزارش کردند. نتایج ما نشان می‌دهد که در مناطق جغرافیایی مختلف ممکن است الگوی مقاومت دارویی متفاوت باشد. بنابراین انجام تست‌های حساسیت دارویی قبل از درمان بیماران امری مهم است. (۴۱)

در مطالعه پیشین Legrand و همکاران در فرانسه گزارش کردند، مایکوباکتریوم سیمیه تایپ یک به عنوان رایج‌ترین ساب‌تایپ گزارش شده از بیماران مبتلا به ایدز بود. نتایج حال از این مطالعه نیز نشان داد که احتمالاً مایکوباکتریوم سیمیه تایپ یک، شایع‌ترین تایپ در ایران است. (۴۲)

با توجه به انتشار وسیع و مقاومت دارویی مایکوباکتریوم‌های آتیپیک، تشخیص سریع آنها از اهمیت بسیاری برخوردار می‌باشد. بنابراین امروزه از روش‌های مبتنی بر PCR مانند اسپولیگوتایپینگ و MIRU-VNTR برای تمایز گونه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس استفاده می‌شود. (۴۳)

یکی از روش‌های انگشت‌نگاری ژنتیکی که بر اساس PCR می‌باشد VNTR نام دارد. این روش سریع، آسان و آنالیز آن چشمی و روشی پایدار است. (۱۹)

به طور کلی، روش تایپینگ MIRU-VNTR ابزار قدرتمندی برای مطالعات اپیدمیولوژیک است، که در مطالعه سوبه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و برخی از مایکوباکتریوم‌های آتیپیک مانند: ماسکوباکتریوم آویوم-اینتراسلولار و مایکوباکتریوم اولسرانسکاربرد داشته است. (۲۲، ۴۴، ۴۵)

فضه حیدری و همکاران مطالعه‌ای را بر روی لوکوس QUB3232 در مایکوباکتریوم‌های آتیپیک و مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس انجام دادند. آنها گزارش کردند این لوکوس دارای قدرت افتراق بسیار بالایی می‌باشد. حضور این لوکوس در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس و عدم حضور آن در مایکوباکتریوم‌های آتیپیک، این لوکوس را ابزار قدرتمندی برای تمایز این دو گروه با حساسیتی بالای ۸۰٪ قرار می‌-



سویه‌های میکوباکتریوم سیمیه و میکوباکتریوم توبرکلوزیس می‌توان برای تمایز دو گروه استفاده کرد.

### منابع:

- Hartmans S, de Bont JA, Stackebrandt E. The Genus *Mycobacterium*--Nonmedical. In *The prokaryotes 2006* (pp. 889-918). Springer, New York, NY.
- Velayati AA, Farnia P, editors. *Nontuberculous Mycobacteria (NTM): Microbiological, Clinical and Geographical Distribution*. Academic Press; 2019 Jan 10.
- Mirsaeidi M, Machado RF, Garcia JG, Schraufnagel DE. Nontuberculous mycobacterial disease mortality in the United States, 1999–2010: a population-based comparative study. *PloS one*. 2014 Mar 14;9(3):e91879.
- Lee ES, Lee MY, Han SH, Ka JO. Occurrence and molecular differentiation of environmental mycobacteria in surface waters. *Journal of microbiology and biotechnology*. 2008;18(7):1207-15.
- Velayati AA, Farnia P, Mozafari M, Malekshahian D, Seif S, Rahideh S, Mirsaeidi M. Molecular epidemiology of nontuberculous mycobacteria isolates from clinical and environmental sources of a metropolitan city. *PloS one*. 2014 Dec 8;9(12):e114428.
- Falkinham III JO. Ecology of nontuberculous mycobacteria—where do human infections come from?. In *Seminars in respiratory and critical care medicine 2013 Feb* (Vol. 34, No. 01, pp. 095-102). Thieme Medical Publishers.
- Velayati AA, Rahideh S, Nezhad ZD, Farnia P, Mirsaeidi M. Nontuberculous mycobacteria in Middle East: current situation and future challenges. *International journal of mycobacteriology*. 2015 Mar 1;4(1):7-17.
- Al-Mahruqi SH, Van Ingen J, Al-Busaidy S, Boeree MJ, Al-Zadjali S, Patel A, Dekhuijzen PR, van Soolingen D. Clinical relevance of nontuberculous mycobacteria, Oman. *Emerging infectious diseases*. 2009 Feb;15(2):292.
- Hashemi-Shahraki A, Darban-Sarokhalil D, Heidarieh P, Feizabadi MM, Deshmir-Salameh S, Khazaei S, Alavi SM. *Mycobacterium simiae*: a possible emerging pathogen in Iran. *Japanese journal of infectious diseases*. 2013;66(6):475-9.
- Da Costa AR, Fedrizzi T, Lopes ML, Pecorari M, Da Costa WL, Giacobazzi E, da Costa Bahia JR, De Sanctis V, Lima KV, Bertorelli R, Grottola A. Characterization of 17 strains belonging to the *Mycobacterium simiae* complex and description of *Mycobacterium paraense* sp. nov. *International journal of*

دهد و می‌توان به جای PCR-RFLP از این لوکوس برای افتراق دو گروه استفاده کرد. اما در مطالعه حاضر، سه لوکوس دیگر QUB26, QUB11b, QUB4156 در ایزوله‌های میکوباکتریوم سیمیه حضور داشتند و لوکوس QUB11b دارای قدرت تمایز بالا  $HGI=0.7$  در بین سویه‌های میکوباکتریوم سیمیه بود. (۲۱)

Kam و همکاران در سال ۲۰۰۶ گزارش کردند که لوکوسهای QUB3232, QUB11a, QUB11b افتراق دهنده‌ترین لوکوسها بین سویه‌های بیجینگ و غیربیجینگ هستند. (۴۶)

در مطالعه دیگری که توسط Kremer و همکارانش در سال ۲۰۰۵ انجام شد، لوکوس QUB11b را افتراق دهنده‌ترین لوکوس در بین سویه‌های بیجینگ معرفی کردند. در مطالعه حاضر نیز از میان سه لوکوس QUB26, QUB11b, QUB4156 بررسی شده، لوکوس QUB11b افتراق دهنده‌ترین لوکوس گزارش شد. (۴۷)

Ablordy و همکارانش در سال ۲۰۰۵ از روش VNTR برای ژنوتایپینگ میکوباکتریوم اولسرانس استفاده کردند. در این مطالعه از ۱۹ لوکوس مورد بررسی، ۹ لوکوس دارای پلی‌مورفیسم شناسایی شد که در مطالعات اپیدمیولوژیکی میکوباکتریوم اولسرانس حائز اهمیت می‌باشد. (۴۸)

در مطالعه دیگری Wada و همکاران، ۲۴۳ جدایه میکوباکتریوم توبرکلوزیس را با روش VNTR مورد بررسی قرار دادند. نتایج این بررسی نشان داد که استفاده از لوکوسهای ( QUB18, QUB3232, QUB11b ) QUB تنوع آلی گونه‌ها را تا  $HGI=0.9$  افزایش داده، و طبقه‌بندی دقیق‌تری برای این گونه‌ها فراهم آورده است. (۲۵)

اگرچه در این مطالعه لوکوس QUB11b دارای قدرت افتراق بالایی در بین ایزوله‌های میکوباکتریوم سیمیه و میکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس بود، اما برای تمایز بین این دو گروه نمی‌تواند مورد استفاده قرار گیرد ولی برای تایپینگ مولکولی در میان ایزوله‌های میکوباکتریوم سیمیه می‌تواند کاربرد داشته باشد.

از دو لوکوس QUB26, QUB4156 صرفنظر از شاخص HGI، با توجه به الگوهای عددی متفاوت در

- numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology*. 1998 May 1;144(5):1189-96.
- 20) Hilty M, Käser M, Zinsstag J, Stinear T, Pluschke G. Analysis of the *Mycobacterium ulcerans* genome sequence reveals new loci for variable number tandem repeats (VNTR) typing. *Microbiology*. 2007 May 1;153(5):1483-7.
- 21) Hidarei F, Farnia P, Nowroozi J, Majd A, Tajeddin E, Masjedi MR, Velayati AA. The Rapid Identification Atypical *Mycobacterium Pulmonary* in Tuberculosis Patients: Avaluation of QUB3232 Locus Using the VNTR Method. *J Zanzan University*. 2009;17(67):29-40.
- 22) Mazars E, Lesjean S, Banuls AL, Gilbert M, Vincent V, Gicquel B, Tibayrenc M, Locht C, Supply P. High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. *Proceedings of the national academy of Sciences*. 2001 Feb 13;98(4):1901-6.
- 23) Supply P, Mazars E, Lesjean S, Vincent V, Gicquel B, Locht C. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Molecular microbiology*. 2000 May 1;36(3):762-71.
- 24) Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rüsche-Gerdes S, Willery E, Savine E, De Haas P, Van Deutekom H, Roring S, Bifani P. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of clinical microbiology*. 2006 Dec 1;44(12):4498-510.
- 25) Wada T, Maeda S, Hase A, Kobayashi K. Evaluation of variable numbers of tandem repeat as molecular epidemiological markers of *Mycobacterium tuberculosis* in Japan. *Journal of medical microbiology*. 2007 Aug 1;56(8):1052-7.
- 26) Kent P, Kubica G. *JPhmagftIIUDoH, Human Services PHS, Centers for Disease Control. Control CfD*. 1985.
- 27) Ramazanzadeh R, Amirmozafari N, Farnia P, Ghazi F. Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from TB patients with spoligotyping. *Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences*. 2006 Jun 10;11(1):50-9.
- 28) Eisenach KD, Donald Cave M, Bates JH, Crawford JT. Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Infectious Diseases*. 1990 May 1;161(5):977-81.
- systematic and evolutionary microbiology. 2015 Feb 1;65(2):656-62.
- 11) Griffith DE, Aksomit T, Brown-Elliott BA, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, Holland SM, Horsburgh R, Huitt G, Iademarco MF, Iseman M. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2007 Feb 15;175(4):367-416.
- 12) Baghizadeh A, Mehrian P, Farnia P. Computed tomography findings of pulmonary *Mycobacterium simiae* infection. *Canadian respiratory journal*. 2017 Jan 1;2017.
- 13) Baghaei P, Tabarsi P, Farnia P, Marjani M, Sheikholeslami FM, Chitsaz M, Bayani PG, Shamaei M, Mansouri D, Masjedi MR, Velayati AA. Pulmonary disease caused by *Mycobacterium simiae* in Iran's national referral center for tuberculosis. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 2012;6(01):23-8.
- 14) Braun-Saro B, Esteban J, Jiménez S, Castrillo JM, Fernández-Guerrero ML. *Mycobacterium simiae* infection in an immunocompromised patient without acquired immunodeficiency syndrome. *Clinical Infectious Diseases*. 2002 Mar 1;34(5):e26-7.
- 15) Shitrit D, Peled N, Bishara J, Priess R, Pitlik S, Samra Z, Kramer MR. Clinical and radiological features of *Mycobacterium kansasii* infection and *Mycobacterium simiae* infection. *Respiratory medicine*. 2008 Nov 1;102(11):1598-603.
- 16) Cangelosi GA, Freeman RJ, Lewis KN, Livingston-Rosanoff D, Shah KS, Milan SJ, Goldberg SV. Evaluation of a high-throughput repetitive-sequence-based PCR system for DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* complex strains. *Journal of clinical microbiology*. 2004 Jun 1;42(6):2685-93.
- 17) Falkinham III JO. Nontuberculous mycobacteria from household plumbing of patients with nontuberculous mycobacteria disease. *Emerging infectious diseases*. 2011 Mar;17(3):419.
- 18) Masjedi MR, Varahram M, Mirsaiedi M, Ahmadi M, Khazampour M, Tabarsi P, Baghei P, Marjane M, Bahadori M, Zarifi AZ, Velayati AA. The recent-transmission of *Mycobacterium tuberculosis* strains among Iranian and Afghan relapse cases: a DNA-fingerprinting using RFLP and spoligotyping. *BMC infectious diseases*. 2008 Dec;8(1):1-7.
- 19) Frothingham R, Meeker-O'Connell WA. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable

- 39) Heidarieh P, Mirsaiedi M, Hashemzadeh M, Feizabadi MM, Bostanabad SZ, Nobar MG, Hashemi Shahraki A. In vitro antimicrobial susceptibility of nontuberculous mycobacteria in Iran. *Microbial Drug Resistance*. 2016 Mar 1;22(2):172-8.
- 40) Hamieh A, Tayyar R, Tabaja H, EL Zein S, Bou Khalil P, Kara N, Kanafani ZA, Kanj N, Bou Akl I, Araj G, Berjaoui G. Emergence of *Mycobacterium simiae*: A retrospective study from a tertiary care center in Lebanon. *PLoS one*. 2018 Apr 4;13(4):e0195390.
- 41) van Ingen J, Totten SE, Heifets LB, Boeree MJ, Daley CL. Drug susceptibility testing and pharmacokinetics question current treatment regimens in *Mycobacterium simiae* complex disease. *International journal of antimicrobial agents*. 2012 Feb 1;39(2):173-6.
- 42) Legrand E, Goh KS, Sola C, Rastogi N. Description of a novel *Mycobacterium simiae* allelic variant isolated from Caribbean AIDS patients by PCR-restriction enzyme analysis and sequencing of hsp 65 gene. *Molecular and cellular probes*. 2000 Nov 1;14(6):355-63.
- 43) Han H, Wang F, Xiao Y, Ren Y, Chao Y, Guo A, Ye L. Utility of mycobacterial interspersed repetitive unit typing for differentiating *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Wuhan, China. *Journal of medical microbiology*. 2007 Sep 1;56(9):1219-23.
- 44) Dauchy FA, Dégrange S, Charron A, Dupon M, Xin Y, Bébéar C, Maugein J. Variable-number tandem-repeat markers for typing *Mycobacterium intracellulare* strains isolated in humans. *BMC microbiology*. 2010 Dec;10(1):1-7.
- 45) Thibault V, Grayon M, Boschiroli M, Hubbans C, Overduin P, Stevenson K, Gutierrez M, Supply P, Biet F. New variable Number Tandem Repeat markers for typing *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* strains: comparison with IS900 RFLP. In *VENoMYC'Veterinary Network of Laboratories Researching into Improved Diagnosis and Epidemiology of Mycobacterial Diseases' 2007* (p. Inconnu).
- 46) Kam KM, Yip CW, Tse LW, Leung KL, Wong KL, Ko WM, Wong WS. Optimization of variable number tandem repeat typing set for differentiating *Mycobacterium tuberculosis* strains in the Beijing family. *FEMS microbiology letters*. 2006 Mar 1;256(2):258-65.
- 47) Kremer K, Au BK, Yip PC, Skuce R, Supply P, Kam KM, van Soolingen D. Use of variable-number tandem-repeat typing to differentiate *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family isolates from Hong Kong and comparison with IS6110 restriction fragment
- 29) Chimara E, Ferrazoli L, Ueky SY, Martins MC, Durham AM, Arbeit RD, Leão SC. Reliable identification of mycobacterial species by PCR-restriction enzyme analysis (PRA)-hsp65 in a reference laboratory and elaboration of a sequence-based extended algorithm of PRA-hsp65 patterns. *BMC microbiology*. 2008 Dec;8(1):1-2.
- 30) Fezzeh, Heidari, Farnia Parissa, Nowroozi Jamileh, Majd Ahmad, Masjedi Mohammad Reza, and Velayati Ali Akbar. "Evaluating the sensitivity of three primers using PCR-restriction fragment length polymorphism analysis for rapid identification of *Mycobacterium simiae* isolated from pulmonary tuberculosis patients." (2010): 30-35.
- 31) Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Böttger EC, Bodmer T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *Journal of clinical microbiology*. 1993 Feb 1;31(2):175-8.
- 32) Mokrousov I, Narvskaya O, Limeschenko E, Otten T, Vyshnevskiy B. Detection of ethambutol-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains by multiplex allele-specific PCR assay targeting embB306 mutations. *Journal of clinical microbiology*. 2002 May 1;40(5):1617-20.
- 33) Yang Z, Durmaz R, Yang D, Gunal S, Zhang L, Foxman B, Sanic A, Marrs CF. Simultaneous detection of isoniazid, rifampin, and ethambutol resistance of *Mycobacterium tuberculosis* by a single multiplex allele-specific polymerase chain reaction (PCR) assay. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2005 Nov 1;53(3):201-8.
- 34) Supply P. Multilocus variable number tandem repeat genotyping of *Mycobacterium tuberculosis*. Technical guide. 2005 May;6:1-74.
- 35) Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *Journal of clinical microbiology*. 1988 Nov 1;26(11):2465-6.
- 36) Legrand E, Devallois A, Horgen L, Rastogi N. A Molecular Epidemiological Study of *Mycobacterium simiae* Isolated from AIDS Patients in Guadeloupe. *Journal of clinical microbiology*. 2000 Aug 1;38(8):3080-4.
- 37) Cruz AT, Goytia VK, Starke JR. *Mycobacterium simiae* complex infection in an immunocompetent child. *Journal of clinical microbiology*. 2007 Aug 1;45(8):2745-6.
- 38) Katoch VM. Infections due to non-tuberculous mycobacteria (NTM). *Indian Journal of Medical Research*. 2004 Oct 1;120:290-304.

- length polymorphism typing and spoligotyping. *Journal of clinical microbiology*. 2005 Jan 1;43(1):314-20.
- 48) Ablordey A, Swings J, Hubans C, Chemlal K, Loch C, Portaels F, Supply P. Multilocus variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium ulcerans*. *Journal of clinical microbiology*. 2005 Apr 1;43(4):1546-51.



نفس

سال ۷، شماره ۲، تابستان ۹۹، صفحات ۹ تا ۲۱

## Investigation of QUB11b, QUB4156, QUB26 loci in Mycobacterium Simiae Using the VNTR Method

Hoda Dezhkhi<sup>1</sup>, Parissa Farnia<sup>2\*</sup>, Azam Haddadi<sup>1</sup>, Poopak Farnia<sup>2,3</sup>,  
Ali Akbar Velayati<sup>2</sup>

- 1) Department of Microbiology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran.
- 2) Mycobacteriology Research Center (MRC), National Research Institute of Tuberculosis and Lung Disease (NRITLD), Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
- 3) Department of Biotechnology, School of Advanced Technology in Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

### Abstract:

Mycobacterium simiae has been identified as the most abundant species of slow-growing mycobacterium isolated from clinical specimens in Iran. One of the genetic fingerprinting methods used for this purpose is called Variable number tandem repeat (VNTR). In this study, in addition to the hsp65 PCR-RFLP method, the genetic pattern of Mycobacterium simiae was investigated using QUB11b, QUB4156, QUB26 loci and VNTR method for epidemiological studies. In this study, among 56 samples of atypical pulmonary and extrapulmonary mycobacteria isolated from patients with pulmonary tuberculosis symptoms, using culture on Lowenstein Jensen medium and differential tests including nitrate reduction, catalase activity test, niacin test, growth rate and pigment production and hsp65 PCR-RFLP method, all isolated mycobacterium simiae were identified.

Out of 56 isolated non-tuberculous mycobacteria, 41 samples (73.2%) were slow-growing and 15 samples (26.7%) were fast-growing. Among the slow growths, 30 specimens (73.1%) were mycobacterium simiae and among the fast growths, the highest number was related to mycobacterium abscessus(80%). Among 30 mycobacterium simiae samples, (10%) of the samples were sensitive to amikacin and kanamycin and resistant to ciprofloxacin and (6.6%) were resistant to amikacin and kanamycin and sensitive to ciprofloxacin. The QUB11b locus had the highest differentiation power (HGI = 0.7) among the strains of mycobacterium simiae tested and was highly polymorphic.

Conclusion: QUB11b locus in both mycobacterium tuberculosis complex and mycobacterium simiae isolates has the highest discriminative power, 0.6 and 0.7, respectively. This locus can not be used to differentiate the two groups of mycobacterium tuberculosis complex and mycobacterium simiae, but this locus is suitable for differentiating mycobacterium simiae subtypes due to its high discriminative power.

**Keywords:** Mycobacterium simiae, hsp65 PCR-RFLP, VNTR, QUB26, QUB4156, QUB11b loci

---

### \* Corresponding Author:

Parissa Farnia, PhD. Mycobacteriology Centre, NRITLD/WHO, Shahid Beheshti University (Medical Campus), Tehran, Email: [pfarnia@hotmail.com](mailto:pfarnia@hotmail.com)