

## روش های تشخیص مایکوباکتریوم های پاتوژن انسانی با نگرش مولکولی

### چکیده

**زمینه:** جنس مایکوباکتریوم شامل بیش از ۱۶۰ گونه است، که برخی از آنها برای انسان بیماریزا هستند. انواع بیماری ها، از جمله بیماری های ریوی، عفونت های پوست و بافت نرم، لنفادنیت و بیماری های منتشره، توسط مایکوباکتریوم ها ایجاد می شوند. تشخیص دقیق گونه ها در درمان صحیح بیماری های ناشی از مایکوباکتریوم ها از اهمیت بالایی برخوردار است. متداول ترین روش های مورد استفاده برای تشخیص مایکوباکتریوم ها شامل علائم بالینی و آزمایش نمونه ها، روش های میکروسکوپی، سرولوژی، رادیولوژی، آزمون های بیوشیمیایی، کشت، تکنیک های برپایه تقویت اسیدهای نوکلئیک (NAATs) از جمله PCR، تکثیر و توالی یابی ژن ها و غیره می باشد. در این مقاله مروری، پیشرفت های اخیر در آزمایش های مولکولی برای تشخیص سل و سایر بیماری های مایکوباکتریایی را با در نظر گرفتن حساسیت و ویژگی آنها مورد بررسی قرار می دهیم.

**واژگان کلیدی:** تشخیص، مایکوباکتریوم، روش های مولکولی

مهدی رشدی ملکی<sup>۱\*</sup>، مریم ضیائی نافچی<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ملکان، ملکان، ایران

<sup>۲</sup> استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

\* نشانی نویسنده مسئول:

استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ملکان، ملکان، ایران

نشانی الکترونیک:

me.roshdi@iau.ac.ir

## مقدمه

جنس مایکوباکتریوم شامل بیش از ۱۶۰ گونه است، که برخی از آنها برای انسان و حیوان بیماریزا یا بالقوه بیماریزا و برخی از آنها ساپروفیت هستند. این جنس به ۳ گروه اصلی شامل اعضای مجموعه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (Mycobacterium: MTBC tuberculosis complex)، مایکوباکتریوم لپره (Mycobacterium Leprae) و مایکوباکتریوم های غیرتوبرکلوزی (-nontuber: NTM) تقسیم می‌شوند. مهم‌ترین پاتوژن این جنس مجموعه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس عامل بیماری سل است (۱). برآوردهای جهانی کنونی نشان می‌دهد که حدود یک سوم جمعیت جهان به MTB آلوده هستند و سالانه ۸/۸ میلیون نفر به این بیماری مبتلا می‌شوند. انواع بیماری‌ها، از جمله بیماری‌های ریوی، عفونت‌های پوست و بافت نرم، لنفادنیت و بیماری‌های منتشره توسط مایکوباکتریوم‌ها ایجاد می‌شوند. علاوه بر این، گزارش‌های فزاینده‌ای از عفونت‌های مایکوباکتریوم‌های غیر توبرکلوزی نه تنها در افراد دارای نقص سیستم ایمنی، بلکه در افراد دارای ایمنی سالم نیز وجود دارد. NTM ممکن است باعث عفونت بدون علامت و بیماری علامت دار در انسان‌ها شود. آنها بسیاری از نقاط بدن را آلوده می‌کنند اما در درجه اول باعث بیماری ریوی، لنفادنوپاتی گردنی و ضایعات موضعی پوست و بافت نرم می‌شوند (۲،۳).

## طبقه بندی، مورفولوژی و اپیدمیولوژی

اعتقاد بر این است که مایکوباکتری‌ها از قدیمی‌ترین باکتری‌ها بر روی زمین هستند و در همه جا حضور دارند. مایکوباکتریوم‌ها، باکتری‌های میله‌ای شکل و باریکی هستند که گاهی اشکال رشته‌ای مانند میسیلیوم‌های قارچی از خود نشان می‌دهند. از اینرو نام «مایکوباکتیریا» به معنی قارچ مانند (پیشوند لاتین «myco» هم به معنای قارچ و هم به معنای موم است. استفاده از آن در اینجا مربوط می‌شود به ترکیبات «مومی» در دیواره سلولی) باشد. همه اعضای این جنس هوازی بدون اسپور، غیر متحرک، فاقد کپسول و باکتری‌های تک سلولی هستند. شکل سلول از کوباسیل گرفته تا باسیل‌های دراز، تقریباً ۰/۸ - ۰/۲ میکرون عرض و ۱۰-۱ میکرون طول متفاوت است. مایکوباکتریوم‌ها به عنوان باکتری‌های گرم مثبت طبقه بندی می‌شوند اما اکثر آنها با رنگ آمیزی گرم به خوبی رنگ نمی‌گیرند. ویژگی منحصر به فرد مایکوباکتریوم‌ها اسید - فست بودن آنهاست. پایداری اسیدی اساساً به دلیل دیواره سلولی منحصر به فرد ضخیمی است که از لایه‌ای از لیپیدها، پپتیدوگلیکان‌ها و آرابینومانان‌ها تشکیل شده است (۴،۵). بسیاری از گونه‌های مایکوباکتریوم به راحتی با رشد روی سوبستراهای ساده سازگار می‌شوند و از آمونیاک یا اسیدهای آمینه به عنوان منبع ازت و گلیسرول به عنوان منبع کربن در حضور نمک‌های معدنی استفاده می‌کنند. میزان مطلوب (Optimum) دمای رشد با توجه به نوع گونه بسیار

متفاوت بوده و از ۲۳ درجه سلسیوس تا بیش از ۵۰ درجه سلسیوس متغیر است. کشت برخی از گونه‌ها ممکن است دشوار باشد و از نظر نیازهای رشد سختگیر و مشکل‌پسند هستند. گاهی بیش از ۲ سال طول می‌کشد تا در محیط کشت رشد یابند. علاوه بر این، برخی از گونه‌ها چرخه‌های تولید مثل بسیار طولانی دارند. یک چرخه تقسیم برای M. leprae ممکن است بیش از ۲۰ روز طول بکشد (۶). در سال ۱۹۵۴ Timp و Runyon همه مایکوباکتری‌ها را بر اساس سرعت رشد، تولید یا عدم تولید رنگدانه، مورفولوژی کلنی و خصوصیات تست‌های بیوشیمیایی به چهار گروه طبقه بندی کردند. همچنین ارگانسیم‌هایی که در کمتر از ۷ روز در محیط‌های کشت جامد کلنی تشکیل می‌دهند به عنوان مایکوباکتریوم‌های با رشد سریع (RGM: rapidly growing mycobacteria) و آنهایی که در مدت زمان بیش از ۷ روز کلنی تشکیل می‌دهند به عنوان مایکوباکتریوم‌های با رشد آهسته (-SGM: slowly growing mycobacteria) نامیده شدند (۷).

M. tuberculosis یک پاتوژن اجباری برای انسان‌ها است و به ندرت در سایر پستانداران شناسایی شده است. این باکتری از فردی به فرد دیگر منتقل می‌شود و هیچ مخزن زیست محیطی قابل توجهی ندارد. تعدادی از NTM‌های مهم بالینی در خاک، آب، حیوانات اهلی و وحشی، شیر و سایر مواد غذایی یافت می‌شوند. آنها ممکن است نمونه‌های بالینی را از محیط آلوده کنند یا به طور موقت در سطوح و بخش‌های بدن رشد کنند. به نظر می‌رسد اغلب عفونت‌های NTM از طریق استنشاق یا تلقیح ارگانسیم‌ها از مخزن طبیعی به دست می‌آیند. هیچ مدرک محکمی دال بر انتقال بیماری NTM از انسان به انسان یا حیوان به انسان وجود ندارد (۱۰-۸).

## ۱-۲- ویژگی‌های بالینی و بیماری‌زایی

۵ نوع اصلی بیماری‌های ناشی از مایکوباکتریوم وجود دارد که عبارتند از:  
سل، عفونت‌های ریوی مشابه سل، عفونت‌های موضعی پوست و بافت نرم، درگیری موضعی غدد لنفاوی و بیماری منتشره.

## سل (TB: Tuberculosis)

تظاهرات بالینی و نتیجه نهایی سل به حدت (Virulence) پاتوژن و ماهیت پاسخ ایمنی میزبان بستگی دارد. هنگامی که فردی هوای حاوی قطرات را استنشاق می‌کند، بیشتر قطرات بزرگتر در دستگاه تنفسی فوقانی (به عنوان مثال، بینی و گلو) قرار می‌گیرند، جایی که احتمال ایجاد عفونت بعید است. با این حال، هسته‌های قطرات ممکن است به کیسه‌های هوایی کوچک ریه (آلوئول‌ها) که در آن عفونت شروع می‌شود، برسد. هنگامی که ارگانسیم‌ها به ریه‌ها می‌رسند، چهار پیامد بالقوه وجود دارد: (۱) پاسخ اولیه میزبان می‌تواند کاملاً مؤثر باشد و همه ارگانسیم‌ها را از بین ببرد. در این حالت بیمار

شایع ترین پاتوژن ایجاد کننده بیماری ریه است و پس از آن -M. avi-um complex (MAC), M.kansasii, M.abscessus, M. fortuitum, M.szulgai, M.simiae, M.xenopy, M.malmoense M.shimodii و M.celatum نیز عفونت ریوی مختلفی مانند بیماری مزمن انسدادی ریه (COPD)، فیبروز کیستیک ریه، برونشکتازی، آمفیزم ریه، سل ریوی از قبل درمان شده و سرطان ریه همراه است. سایر شرایط مستعدکننده عبارتند از: دیابت شیرین، لوسمی، لوپوس اریتماتوز سیستمیک (SLE)، الکلیسم مزمن، ایدز و بیماران پیوندی (۱۵، ۱۴). تفسیر NTM در خلط بیماران HIV مثبت مشکل خاصی را ارائه می دهد، زیرا این بیماران اغلب بدون شواهدی از بیماری ریوی با NTM آلوده می شوند (۱۶، ۱۵).

### عفونت های موضعی پوست و بافت نرم

عفونت های پوستی و بافت نرم در بیماران دارای سیستم ایمنی در نتیجه تماس مستقیم با منابع آب آلوده از طریق تلقیح پس از ضربه تصادفی، جراحی و تزریق است. ضایعات پوست ممکن است در اثر تلقیح مایکوباکتریوم های فرصت طلب به خراش های سطحی ایجاد شود. چنین عفونت هایی معمولاً توسط M.marinum ایجاد می شوند و در استفاده کنندگان از استخرها و نهبانان ماهی های استوایی رخ می دهند، از این رو به نام های «گرانولمای استخر» و «انگشت شیطان ماهی» نام گذاری شده اند. گونه های دیگری مانند M.kan- M.chelonae و sasii, M.abscessus باعث ایجاد ضایعات مشابه می شوند. عفونت های ناشی از M.ulcerans منجر به نکروز بافت زیر پوستی و زخم ثانویه پوست می شود. آبسه های مایکوباکتریایی پس از تزریق، معمولاً به دلیل گونه های تند رشد- M.ab- M.fortuitum, M.chelonae و scessus هستند (۱۹-۱۷).

این عفونت ها ممکن است به صورت تک گیر به عنوان مثال در افراد دیابتی، یا بصورت اپیدمی زمانی که چند نفر با یک دسته آلوده از یک واکسن یا دارو واکسینه یا درمان میشوند، رخ دهد (۲۱، ۲۰). عفونت های مشابه در نتیجه جراحات ناشی از اعمال جراحی توسط تند رشدها ایجاد می شود. شیوع جدی عفونت های استرنوم بدنبال جراحی قلب باز و همچنین موارد عفونت قریه توسط گونه های تند رشد گزارش شده است (۲۲). M.Haemophilium یک علت نادر ضایعات پوستی ندولر یا اولسراتیو و عفونت های گزارش شده در افراد دارای نقص سیستم ایمنی، به ویژه در دریافت کنندگان کلیوی بوده است (۲۴، ۱۷).

### درگیری موضعی غدد لنفاوی

لنفادنوپاتی ناشی از NTM معمولاً گردنی، یک طرفه و خود محدود شونده است و بیشتر موارد در کودکان زیر ۵ سال رخ می دهد. شایع ترین گونه های موجود در لنفادنیت در کودکان M.avium

بهبود یافته و هیچ شانس برای ابتلا به سل ندارد. (ii) ارگانسیم می تواند بلافاصله پس از عفونت رشد و تکثیر کرده و باعث ایجاد بیماری بنام سل اولیه شود. (iii) باسیل ها ممکن است به حالت غیر فعال مانده و بیماری ایجاد نکنند. این حالت به عنوان عفونت نهفته شناخته می شود که تنها با تست پوستی توبرکولین مثبت نشان داده می شود. (IV) ممکن است ارگانسیم های نهفته دوباره فعال شده و باعث بروز بیماری پس از عفونت اولیه شوند. برخی از باسیل ها ممکن است بلافاصله در اثر فرآیند فاگوسیتوز از بین بروند. اگر باسیل ها بتوانند از دفاع اولیه جان سالم به در ببرند، در ماکروفاژهای آلوئولی تکثیر می شوند، تعداد کمی از باسیل ها وارد جریان خون شده و منتشر می شوند (۱۱). تکثیر داخل سلولی باسیل تنها با ایجاد ایمنی سلولی خاص متوقف می شود، که حدود ۶ تا ۸ هفته پس از عفونت تنظیم می شود. هنگامی که پاسخ ایمنی به نام ازدیاد حساسیت وابسته به سلول (cell-mediated hypersensitivity) ایجاد شد، سلول های T معمولاً به تست پوستی توبرکولین (تست PPD) پاسخ داده و یک سفتی و ضایعه قرمز رنگ مشخصی در محل تزریق ایجاد می کنند. برخی از سیگنال های سلول T واکنش های التهابی ایجاد می کنند؛ سیگنال های دیگر سلول های تخصصی را برای کشتن باسیل ها و جداسازی ماکروفاژهای آلوده در کپسول های ریز و سخت به نام توبرکل ها (tubercles) جذب و فعالیت می کنند. یک توبرکل، از چند لنفوسیت کوچک و مجموعه فشرده ای از ماکروفاژهای فعال تشکیل شده است که گاهی به سلول های اپیتلوئید (epitheloid) یا سلول های غول پیکر چند هسته ای (gi- ant cells) تمایز می یابند. فعال شدن انبوه ماکروفاژها که در داخل توبرکل ها اتفاق می افتد اغلب منجر به آزادسازی متمرکز آنزیم های لیتیک می شود (۴). این آنزیم ها سلول های سالم مجاور را از بین می برند و در نتیجه ناحیه ای دایره ای از بافت نکروزه ایجاد می کنند که در نهایت ضایعاتی با قوام پنیری تشکیل می دهند. هنگامی که این ضایعات موردی بهبود می یابند، کلسیفیه می شوند و در اشعه ایکس قابل مشاهده هستند، جایی که به آنها کمپلکس Ghon می گویند. برای اکثر افراد با عملکرد طبیعی ایمنی، به نظر می رسد عفونت اولیه با M.tuberculosis پس از ایجاد ایمنی سلولی متوقف می شود، اگرچه تعداد کمی از باسیل های زنده در گرانولوما ممکن است باقی بمانند. اگر ایمنی سلولی قادر به کنترل آن نباشد، عفونت فرد به سمت یک بیماری فعال به نام سل اولیه پیشرونده پیشرفت می کند (۱۲). افراد آلوده به MTB حدود ۱۰ درصد خطر ابتلا به این بیماری در طول زندگی را دارند. ۹۰ درصد باقیمانده آلوده خواهند ماند، اما تا پایان عمر خود عاری از بیماری خواهند بود (۱۳).

### عفونت های ریوی شبیه سل

بیماری مزمن ریوی شایع ترین تظاهرات بالینی موضعی مایکوباکتریوم های غیرتوبرکلوزی (NTM) است. کمپلکس MTB

اگرچه برای تشخیص اولیه مفید هستند، اما ممکن است همیشه پیش بینی کامل بیماری را ارائه نکنند. آزمایشات سرولوژیکی برای تشخیص سل اغلب بی نتیجه هستند. روش تشخیص میکروسکوپی اگرچه سریع، آسان و خاص بود. با این حال، فاقد حساسیت بوده و برای مثبت شدن به بیش از ۱۰۰۰۰ باسیل در هر میلی لیتر خلط نیاز هست. علاوه بر این، میکروسکوپ نمی تواند بین سلول های زنده و غیر زنده، بین گونه های مختلف مایکوباکتریوم و کمپلکس *M. tuberculosis* حساس یا مقاوم به دارو تمایز قائل شود (۲۷). تشخیص دقیق و سریع میکروبیولوژیکی سل و سایر عفونت های مایکوباکتریایی با جمع آوری مناسب نمونه و انتقال سریع نمونه به آزمایشگاه شروع می شود، زیرا برخی از آزمایشات، مانند اسمیر AFB و روش های تقویت اسید نوکلئیک (-NAA: nucleic acid amplification) ظرف ۲۴ تا ۴۸ ساعت پس از دریافت نمونه می تواند قابل اعتماد باشد. در صورتی که پردازش نمونه ها به تأخیر بیفتد، نمونه ها بایستی به درستی در یخچال نگهداری شوند، زیرا NTM ها در طبیعت و در همه جا حاضر هستند و گاهی اوقات ممکن است به عنوان آلاینده های آزمایشگاهی جدا شوند (۱۴).

### کشت (Culture)

جداسازی مایکوباکتریوم ها با استفاده از کشت، حساس بوده و به عنوان "گلد استاندارد" در نظر گرفته می شود و تخمین زده شده که در هر میلی لیتر از نمونه، ۱۰-۱۰۰ باسیل زنده را شناسایی کند (۲۸). مزیت دیگر کشت، این است که امکان شناسایی و آزمایش گونه های خاص را برای شناسایی الگوهای حساسیت دارویی فراهم می کند. با ظهور سل مقاوم به دارو، آزمایش های دقیق، سریع و مقرون به صرفه برای تشخیص MDR-TB (Multiple Drug Resistant-TB)

*M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. malmoense*, *M. interjectum* و *M. kansasii*, *M. haemophilum* هستند. در بزرگسالان، عفونت ممکن است به عنوان بخشی از عفونت منتشره رخ دهد (۲۵).

### بیماری های منتشره

این شکل از بیماری خارج ریوی شبیه به بیماری ناشی از کمپلکس MTB است. بنابراین، ضایعات منفرد یا چندگانه ممکن است در استخوان، دستگاه ادراری، سیستم عصبی مرکزی، غدد لنفاوی و پوست رخ دهد. در سایر موارد، عفونت شبیه سل منتشر شده با درگیری چند اندام است. در چنین مواردی شواهد بافت شناسی کمی از پاسخ ایمنی وجود دارد یا اصلاً وجود ندارد. در واقع، مغز استخوان ممکن است مملو از باسیل های اسید فست باشد در حالی که وقتی با روش های معمول هماتولوژیک رنگ آمیزی می شود، طبیعی به نظر می رسد. چنین بیماری منتشره معمولاً همراه با نقص ایمنی مادرزادی یا اکتسابی که بر ایمنی سلولی تأثیر می گذارد، از جمله استفاده از (داروهای سرکوب کننده سیستم ایمنی به دنبال جراحی پیوند و ایدز رخ می دهد. بیشتر موارد بیماری منتشره به واسطه کمپلکس *M. avium* (MAC) یا *M. chelonae* است (۱۶، ۲۵، ۲۶).

### تشخیص

به طور کلی تشخیص احتمالی عفونت مایکوباکتریایی بر اساس شرح حال بیمار، تظاهرات بالینی، یافته های رادیولوژیکی و حضور باسیل های اسید فست باسیل (AFB) در نمونه بیمار است. متداول ترین روش های مورد استفاده برای تشخیص بیماری های مایکوباکتریایی در جدول ۱ فهرست شده اند. علائم بالینی و یافته های رادیولوژیک،

جدول ۱. متداول ترین روش های مورد استفاده برای تشخیص مایکوباکتریوم

روش	مزایا	معایب
علائم و نشانه های بالینی رادیولوژی (اشعه ایکس، MRI، CT) سرولوژی میکروسکوپی کشت مرسوم (بر پایه تخم مرغ/آگار) کشت مایع خودکار سنجش هیبریداسیون پروب PCR تعیین توالی (سکانسینگ)	سریع به راحتی در دسترس است سریع، مقرون به صرفه سریع، مقرون به صرفه مخصوص، مقرون به صرفه مخصوص سریع سریع سریع - گلد استاندارد	اختصاصی نیست، قطعی نیست، همیشه وجود ندارد غیر مشخص و غیر قطعی حساس و غیر اختصاصی نیست حساسیت و ویژگی محدود زمان بر (۴ تا ۱۰ هفته) نیاز به ۲ الی ۳ هفته زمان - گران گران قیمت، نیاز به تخصص فنی و برای همه گونه ها در دسترس نیست گران قیمت، تخصص فنی و کنترل کیفیت در هر مرحله گران

کنند. HPLC می تواند الگویی ایجاد کند که به طور قابل اعتمادی بیش از ۵۰ گونه مایکوباکتریوم را شناسایی و متمایز کند. می توان آن را در چند ساعت از کشت های خالص انجام داد. هزینه تجهیزات اولیه برای HPLC در دسترس بودن آن را محدود می کند. با توجه به محدودیت های مختلف روش های فنوتیپی و HPLC در سال های اخیر، تکنیک های مولکولی به طور فزاینده ای توسعه یافته و بسیار محبوب هستند. زیرا سریع، قابل اعتماد و بسیار حساس بوده و می توانند به طور مستقیم برای تعداد زیادی از نمونه های بالینی استفاده شوند (۳۳،۳۴).

### ۲-۳-۱- تکنیک های بیولوژیکی مولکولی

روش های مولکولی مزایای متعددی نسبت به تکنیک های مبتنی بر کشت دارند و شامل زمان چرخش کوتاه تر، عدم نیاز به کشت ارگانیسیم، امکان کاربرد مستقیم در نمونه های بالینی، خطرات زیستی کمتر و امکان سنجی بصورت خودکار است. تست های تقویت اسید نوکلئیک (NAA: nucleic acid amplification)، که به آن ها تست های تقویت مستقیم نیز گفته می شود، به عنوان کیت های تجاری در دسترس هستند و یا به طور گسترده در سنجش های داخلی استفاده می شوند.

### سیستم جامع تجزیه و تحلیل زیستی (COBAS<sup>1</sup>) (Amplicor)

تست Amplicor MTB بر واکنش های زنجیره ای پلیمرز استاندارد (PCR) تکیه دارد. یک قطعه ۵۸۴ جفت بازی از ژن 16S rRNA که شامل یک ناحیه خاصی از یک گونه است، با استفاده از پرایمرهای بیوتینیل شده (biotinylated primers) تکثیر می شود. سپس با استفاده از دانه های مغناطیسی پوشیده شده با پروب های خاص امکان حذف سایر DNA ها با شستشو فراهم می شود. تشخیص محصول خاص تقویتی با افزودن یک مزدوج آویدین - آنزیم در معرض یک ماده کروموزنیک انجام می شود. در این سیستم برای کنترل آلودگی از یوراسیل -N- گلیکوزیلاز (UNG) در مستر میکس استفاده می کند. آنزیم یوراسیل -N- گلیکوزیلاز که قبل از تکثیر به نمونه ها اضافه می شود، می تواند به طور خاص محصولاتی را که قبلاً از طریق فرآیند PCR انجام شده اند، تخریب کند بدون آنکه آسیبی به DNA هدف برسد. بررسی متون علمی نشان می دهد، ویژگی این تست تایید شده توسط USFDA نزدیک به ۱۰۰٪ است. حساسیت آن از ۹۰ تا ۱۰۰٪ در نمونه های اسمیر مثبت و از ۵۰ تا ۹۵/۹٪ در نمونه های اسمیر منفی می باشد (۳۵،۳۶).

و XDR-TB (Extensively Drug Resistant-TB) چالشی را برای فعالیت های کنترل سل ایجاد می کند. اکثر آزمایشگاه ها در منطقه بومی بیماری، برای کشت به محیط معمولی لونشتاین - جانسون (L.J Media) متکی هستند و از آزمون های بیوشیمیایی مختلف برای شناسایی مایکوباکتریوم ها استفاده می کنند. این روش ها پیچیده، پر زحمت و زمان بر هستند و در بسیاری از اوقات نمی توانند شناسایی دقیق را ارائه دهند. هدف تکنیک های فنوتیپی جدیدتر تشخیص سریع تر با استفاده از فعالیت های متابولیکی باکتری های در حال رشد است. تکنیک های پیشرفته خودکاری مبتنی بر کشت مایع (Bactec تغییرات وابسته به رشد مانند تولید گاز CO<sub>2</sub> و یا مصرف O<sub>2</sub> توسط سلول های زنده را اندازه گیری کرده به تشخیص سریع بیماری کمک کنند. در این سیستم ها از محیط کشت میدلبروک مایع 7H9 غنی شده استفاده می شود. سیستم های کشت مایع، هنگامی که با پروب های DNA یا سنجش سل (Capilia TB assay) ترکیب می شود، برای شناسایی سریع گونه، قادر است در ۲ هفته برای اکثریت قریب به اتفاق نمونه های اسمیر خلط مثبت و در عرض ۳ هفته برای نمونه های اسمیر منفی نتایج مثبت ایجاد کند. Capilia TB یک روش ایمنونوکروماتوگرافی ساده و سریع بر اساس تشخیص آنتی ژن MPB 64 است که به طور خاص توسط اعضای MTBC ترشح می شود (۱۱).

### مایکوباکتریوفاژها

در این فناوری از مایکوباکتریوفاژها برای آلوده کردن MTB زنده و شناسایی باسیل ها با استفاده از روش تقویت فاژ (FASTPlaque) یا تشخیص نور (تکنیک فاژ گزارشگر لوسیفراز) استفاده می شود. برای این منظور ژن لوسیفراز کرم شب تاب را وارد ژنوم مایکوباکتریوفاژ می کنند. در صورتیکه فاژ MTB را آلوده کند، باسیل زنده آنزیم لوسیفراز تولید می کند. محصول این آنزیم یک فوتون است که توسط لومینومتر یا فیلم مشخص می گردد. سنجش های مبتنی بر تقویت به صورت تجاری در دسترس هستند و دارای ویژگی ۹۹٪ - ۹۸/۷٪ و حساسیت ۷۰ الی ۷۵٪ در مقایسه با روش LJ معمولی هستند. به طور کلی، آزمایش های فاژی، ۲ تا ۳ روز زمان می برند و به زیرساخت آزمایشگاهی مشابه با زیرساخت مورد نیاز برای انجام کشت مایکوباکتریوم نیاز دارند (۲۹-۳۱).

### کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)

HPLC بر اساس مشاهداتی است که هر گونه مایکوباکتریوم مجموعه ای منحصر به فرد از اسیدهای مایکولیک، اسیدهای چرب  $\alpha$  و  $\beta$  - هیدروکسی را که از اجزای دیواره سلولی هستند، سنتز می

## سیستم BD ProbeTec ET

سیستم BD ProbeTec ET از DNA پلیمرز و تقویت جابجایی رشته هم‌دما (SDA: strand displacement amplification) برای تولید کردن کپی‌های فراوانی از IS6110 به عنوان یک توالی الحاقی در MTB استفاده می‌کند. زمان چرخه از ۳/۵ تا ۴ ساعت است. مقالات، میزان حساسیت این سیستم را از ۹۸/۵٪ تا ۱۰۰٪ برای نمونه‌های اسمیر مثبت و برای نمونه‌های اسمیر منفی متغیر (۳۳٪ - ۱۰۰٪) گزارش کرده‌اند (۳۷، ۳۸). سنجش‌های PCR داخلی عمدتاً در کشورهای در حال توسعه مورد استفاده قرار می‌گیرند، جایی که NAA تجاری گران است و در توالی‌های ژن هدف، پروتکل‌ها و روش‌های آزمایشگاهی متفاوت هستند. دقت تست PCR داخلی نسبت به کیت‌های تجاری ناهمگن‌تر می‌باشد (۳۹). تست‌های داخلی آزمایشگاهی PCR بسیار حساس (۹۶٪) و اختصاصیت آن (۹۷٪ تا ۱۰۰٪) است، با این حال، ارتباط آن با بیماری بالینی باید مورد بررسی قرار گیرد (۴۰، ۴۱). شناسایی مولکولی مایکوباکتریوم‌هایی که ژن‌های مختلفی مانند IS6110، 16S rRNA، ژن پروتئین شوک حرارتی ۶۵ کیلو دالتون (hsp 65)، ژن‌های پروتئین ۳۲ کیلو دالتونی، ژن کد کننده ۱۲۶ کیلو دالتونی پروتئین فیوژن، ژن RD و  $\text{rpo}\beta$  را مورد هدف قرار می‌دهند، گزارش شده است (۴۲-۴۸). متداول‌ترین توالی‌های DNA مایکوباکتریایی مورد استفاده برای PCR عبارتند از IS6110 (IS986)، 16S rRNA و ژن کد کننده ۶۵ کیلو دالتونی. یک توالی الحاقی (IS) که IS6110 نامگذاری شده است برای کمپلکس MTB اختصاصی است و عموماً در ۱ تا ۲۰ کپی در هر سلول رخ می‌دهد و آن را به یک هدف ایده آل برای تقویت در پروتکل‌های PCR داخلی تبدیل می‌کند. تشخیص عنصر الحاقی IS6110 با روش PCR در سل ریوی و خارج ریوی، در مقایسه با کشت، دارای حساسیت ۸۳/۵٪، ویژگی ۹۹٪ و پیش‌بینی مثبت ۹۴/۲ درصدی است (۴۶).

## روش PCR Restriction Enzyme Analysis (PCR RE)

روش PCR RE بر اساس تکثیر یک قطعه ژن هدف توسط PCR و سپس هضم محصول تکثیر شده با آنزیم‌های محدود الاثر (RE) مختلف است. سپس محصولات حاصل از واکنش هضم در الک روفورز ژل آگارز از هم جدا شده و قابل مشاهده می‌شود. در چندین مطالعه اخیر، PCR RE در مقایسه با روش‌های مرسوم عملکرد خوبی داشته است (۴۷-۵۱). این روش ساده و مقرون به صرفه برای چندین ژن مانند  $\text{hsp}65$ ،  $\text{rpo}\beta$ ، 16S rRNA و dnaJ برای تمایز سریع ایزوله‌های بالینی نزدیک مانند *M. avium* زیرگونه avi-um و *M. avium* زیرگونه paratuberculosis و زیرگونه *M. kan-*

sasii استفاده شده است (۴۷-۵۱). در سال ۲۰۰۰، Lee و همکاران قطعه ۳۶۰ جفت باز از ژن  $\text{rpo}\beta$  را تکثیر کردند و با آنزیم‌های محدود الاثر Sau 3 AI، Hae III، MSP I و Hinc II هضم کردند تا اکثر مایکوباکتریوم‌ها را به سطح گونه‌ها و زیرگونه‌ها تمایز دهند (۴۹). علاوه بر تمایز گونه‌های *M. chelonae*، *M. abscessus* و *M. fortuitum* از هم، تمایز *M. avium* از *M. paratuberculosis* و *M. intracellulare* و همچنین تمایز *M. marinum* از *M. ulcerans* و تمایز تیپ‌های ۱ و ۲ *M. celatum*، روش  $\text{rpoB-PCR-RE}$  اجازه تمایز ۶ زیرگونه از *M. kansasii* را هم داد.

## توالی یابی بر پایه PCR

توالی یابی بر پایه PCR به عنوان استاندارد طلایی برای شناسایی گونه‌های مایکوباکتریایی مناسب می‌باشد. این روش شامل تکثیر DNA مایکوباکتریایی با پرایمرهای اختصاصی جنس و توالی یابی آمپلیکون‌ها می‌باشد. ارگانسیم از طریق مطابقت توالی نوکلئوتیدی با توالی مرجع شناسایی می‌گردد. معمولاً، تنها یک واکنش توالی یابی جهت شناسایی قطعی مورد نیاز است. این روش امکان ردیابی مستقیم گونه‌های مایکوباکتریایی که قابل رشد در محیط‌های کشت آزمایشگاهی مرسوم نمی‌باشند را فراهم می‌کند و چند گونه ناشناخته با این روش شناسایی شده‌اند (۳۷، ۵۲، ۵۳). بیشترین هدفی که به صورت رایج به کار برده شده است، ژن کد کننده 16S rRNA می‌باشد. این ژن در تمام گونه‌های باکتریایی وجود دارد و شامل نواحی حفاظت شده و نواحی متغیر می‌باشد و به همین دلیل به هدفی ایده آل برای اهداف تاکسونومی تبدیل شده است. توالی یابی دو ناحیه بسیار متغیر ژن 16S rRNA امکان شناسایی اکثر گونه‌های مایکوباکتریایی را فراهم می‌کند. به هر حال، اعضای کمپلکس MTB قابل تمایز نمی‌باشند. به عنوان مثال، *M. kansasii* یک توالی همسان با گونه‌های غیر بیماریزا *M. gastris* دارد. چند ژن هدف دیگر از جمله پروتئین ۳۲ کیلو دالتونی (۴۵)، پروتئین ۶۵ کیلو دالتونی شوک حرارتی (۵۴) و فاصله گذار رونویسی کننده داخلی (۴۳) (internal transcribed spacer)، برای گونه‌های شناسایی شده از طریق توالی یابی به خوبی مشخص شده‌اند. در سال ۱۹۹۹، کیم و همکاران گزارش دادند که آنالیز توالی‌های مقایسه‌ای (انطباقی) ژن RNA پلیمرز دربرگیرنده ناحیه مرتبط با مقاومت به RIF در MTB، برای شناسایی گونه‌های مایکوباکتریایی قابل استفاده می‌باشد (۵۲).

## Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP)

تکثیر ایزوترمال (هم دما) متصل به حلقه

نتایج حساسیت و اختصاصیت مطلوبی را در زمان ۲ ساعته نشان دادند. به طور کلی، کاوشگرهای DNA بیش از ۹۹ درصد اختصاصیت و حساسیت برای کمپلکس MTB جداسازی شده و تقریباً ۹۵ درصد حساسیت و بیش از ۹۹ درصد اختصاصیت برای نمونه های MAC جداسازی شده نشان می دهند (۶۱-۵۶). در موارد نادر در برخی از نمونه ها واکنش متقاطع بین کاوشگر کمپلکس MTB و ایزوله های *M.terrae* و *M.celatum* و کاوشگر کمپلکس *M.avium* به همراه گونه های اخیراً توصیف شده *M. parascrofulace*، *M. Palustre* و *M. saskatchewanense* گزارش شده است.

### آزمون های کاوشگر خطی Line Probe Assays

آزمون کاوشگر خطی از تکنولوژی هیبریداسیون بلات خط معکوس به همراه کاوشگرهای مختلف اختصاصی DNA استفاده می کند که به صورت خطوط موازی بر روی یک نوار کاغذی یا غشای نایلونی تثبیت شده اند. DNA هدف، یک DNA تکثیر شده با PCR می باشد که از پرایمرهای بیوتینیل شده (biotinylated) و در نهایت انکوبه شده با یک نوار یا غشای پوشیده با کاوشگرهای اختصاصی گونه استفاده می کند. در نهایت هیبریدها از طریق رنگ سنجی (کالریمتری) یا واکنش کمی لومینسنت تقویت شده (ECL) ردیابی می شوند (۶۴، ۳۶، ۳۷).

در حال حاضر، ۳ کیت رایج برای شناسایی گونه ها در بازار موجود می باشد. از جمله تست هایی که برای شناسایی مایکوباکتری ها و تست های مقاومت دارویی به کار می روند می توان به INNO-Li-PA، MYCOBACTERIA (Innogenetics NV، Gent، Belgium) و Geno Type MTBC (Hain، Germany) اشاره کرد (۶۶، ۶۵، ۳۷، ۳۶). مطالعات زیادی در مورد کاربرد آزمون LiPA بر روی ایزوله های MTB به منظور ردیابی مقاومت RIF انجام گرفت که بیشتر از ۹۵ درصد حساسیت و ۱۰۰ درصد اختصاصیت را نشان داد. در مطالعات بسیار کمی که از آزمون LiPA به طور مستقیم برای نمونه های بالینی استفاده شد، حساسیت بین ۱۰۰-۸۰ به دست آمد. از سوی دیگر، Geno Type MTBC مقاومت به INH و RIF را بر اساس بیشترین جهش های رایج به ترتیب در ژن های *katG* و *rpoB* در نمونه های کشت تشخیص می دهد.

### آرایه های DNA (DNA Arrays)

اخیراً ریز آرایه های DNA یا آرایه های اولیگونوکلئوتیدی با چگالی بالا (DNA Chip) برای شناسایی گونه های مایکوباکتری ها به کار برده شده اند. DNA chip به طور کلی شامل یک سطح شیشه ای می باشد که کاوشگرهای DNA متعددی همراه با هویت شناخته

LAMP یک پلتفرم NA نوین، سریع و ساده می باشد که توسط کمپانی ژاپنی (Tokyo, Japan) Eiken Chemical Co., Ltd. ایجاد شده است (۵۵). مهم ترین مزیت آن، سرعت، سادگی و عدم نیاز به چرخه دمایی (ترمال سایکلر) می باشد که نتیجه کار را تسهیل می کند. در این تکنولوژی از چهار پرایمر مختلف که به طور اختصاصی برای شناسایی شش ناحیه مجزا بر روی ژن هدف طراحی شده اند، استفاده می شود و فرآیند واکنش در یک دمای ثابت (ایزوترمال) با استفاده از واکنش جایگزینی رشته انجام می گیرد. تکثیر و ردیابی محصولات ژنی می تواند در یک مرحله از طریق انکوباسیون مخلوطی از نمونه ها، پرایمرها، DNA پلیمرز با فعالیت جایگزینی رشته و سوبستراها در یک دمای ثابت کامل شود. در حال حاضر، شواهد محدودی در مورد دقت LAMP برای شناسایی TB وجود دارد. مطالعاتی در حال انجام می باشند تا کارایی تست را بررسی و عملکرد آن را با تست های مرسوم مقایسه کنند.

### Real-Time PCR (PCR در زمان واقعی)

این روش به صورت موفقیت آمیزی به طور مستقیم برای ردیابی سریع مایکوباکتری ها و تست مقاومت دارویی در نمونه های بالینی به کار برده شده است. کاوشگرهای مختلفی مورد استفاده قرار گرفته اند از جمله: کاوشگر TaqMan، کاوشگرهای انتقال انرژی رزونانس فلورسنس (FRET)، بیکن مولکولی (beacons) و بیوپروبها (کاوشگرهای زیستی). مهم ترین مزیت تکنیک Real-Time PCR سرعت بالا و خطر آلودگی کمتر می باشد و مهم ترین ایراد آن، نیازمند بودن به تجهیزات گران و معرف ها و پرسنل فنی ماهر می باشد. در این روش نتایج به طور متوسط ۱/۵ الی ۲ ساعت پس از استخراج DNA به دست می آیند. این تکنیک سرانجام توانست در آزمایشگاه های مرجع انجام شود و در موقعیت هایی می تواند در مدیریت بیماران TB کمک کند.

### DNA Probe Hybridization (هیبریداسیون کاوشگر DNA)

تکنولوژی کاوشگر DNA برای شناسایی ارگانسیم های فستیدیوس هنوز یکی از موفقیت آمیزترین روش های تشخیص مولکولی در سراسر جهان به شمار می رود. Accuprobe (Gen-Probe، San Diego، CA)، یک روش تجاری بر پایه کاوشگرهای DNA اختصاصی گونه می باشد که با tRNA هیبرید می شود. به منظور شناسایی تعداد محدودی از مایکوباکتری ها از جمله کمپلکس *M.avium*، *M.terrae*، *M. intracellular*، *M. kansasii* و *M. gordonae* کاوشگرها به صورت گسترده ای در زمینه بالینی مورد ارزیابی قرار گرفته اند و

سیستم اساساً برای متخصصان بالینی طراحی شده است. بنابراین، با استفاده از آن درمان مناسب می تواند به سرعت آغاز شود.

## روش ها

### ۱-۲- آماده سازی نمونه

استخراج DNA. توانایی روش مولکولی برای تشخیص میکوباکتری ها در نمونه های بالینی به دو عامل توالی هدف انتخاب شده و کارایی روش استخراج DNA بستگی دارد. بیشترین روش های استفاده شده برای استخراج DNA، شامل Tris- EDTA (TE) استخراج با جوشاندن، استخراج از طریق لیز کردن (Inflecto Diag- nostics, Inc., Valencia CA)، استخراج با سدیم دودسیل سولفات- تریتون X و سدیم دودسیل سولفات- تریتون X همراه با سونیک (صوت) می باشند.

### ۲-۲- روش های ردیابی PCR استاندارد

**قاعده کلی:** در DNA PCR با استفاده از دو پرایمر و یک آنزیم (شکل ۱) توسعه می یابد. چرخه تکرار دمایی PCR با دنا توره شدن آمپلیکون DNA دو رشته ای آغاز می گردد. در ادامه از طریق آنیلینگ پرایمر با DNA هدف و محصولات PCR از طریق Taq پلیمرز در حضور داکسی نوکلئوزیدتری فسفات های (DNTPs) اضافی توسعه می یابند. به صورت تئوری در هر چرخه تعداد مولکول های اسیدنوکلئیک هدف دو برابر می شوند، بنابراین، پس از ۲۰ چرخه، میلیون برابر و پس از ۳۰ چرخه، بیلیون برابر آمپلیفیکاسیون حاصل می شود (۷۱).

**روش:** راه اندازی یک PCR پایه نیازمند چند ترکیب و معرف از جمله DNA الگو، دو پرایمر مکمل برای هر انتهای ۳ و رشته آنتی سنس DNA الگو، آنزیم Taq پلیمرز، داکسی نوکلئوزید تری فسفات ها، محلول بافر، کاتیون های دوظرفیتی، یون های منیزیم و یون های پتاسیم یک ظرفیتی می باشد. واکنش PCR به طور معمول در حجم ۱۰۰-۱۰ میکرولیتر درون تیوب های کوچک (حجم ۰/۲- ۰/۵ میلی لیتر) در دستگاه ترمال سایکلر انجام می گیرد. PCR معمولاً شامل ۴۰-۲۰ چرخه می باشد. محصولات تکثیر شده در PCR از طریق ژل الکتروفورز قابل ردیابی می باشند. اندازه محصولات PCR از طریق مقایسه با DNA Ladder (نشانگر وزن مولکولی) تعیین می شود. این نشانگر حاوی قطعات DNA با اندازه های مشخص می باشد که در کنار قطعات PCR بر روی ژل حرکت می کنند. البته استفاده از کنترل منفی، کنترل مثبت و کنترل داخلی برای هر بچ PCR ضروری می باشد.

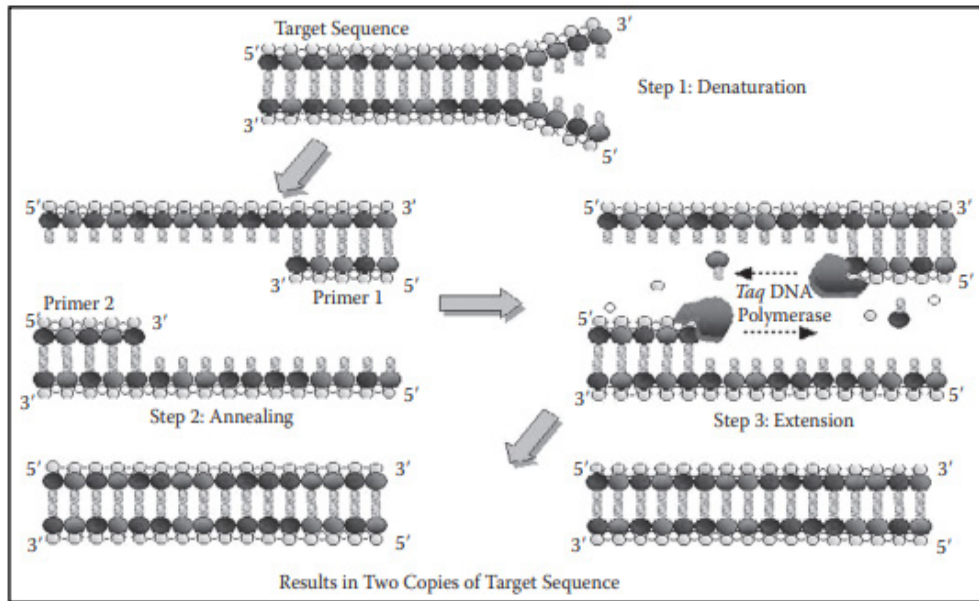
شده بر روی آن تثبیت شده اند، به منظور هیبریداسیون مولکولی با محصولات اختصاصی تکثیر شده با PCR، که امکان آزمایش بیان ژن موازی یا ژنوتایپینگ را فراهم می کند (۶۷). این روش امکان آنالیزهای همزمان هزاران ژن را در زمان کوتاه آزمون فراهم می کند. این روش همچنین، برای آنالیزهای فیلوژنیک و تشخیص گونه ها مفید می باشد. برای شناسایی باکتری ها، این روش احتمالاً شامل برجسب گذاری RNA رونویسی شده از یک ژن هدف باکتری در شرایط آزمایشگاهی (in vitro)، در نمونه های آزمایشگاهی می باشد. سپس هیبریداسیون RNA برجسب گذاری شده رونویسی شده در شرایط آزمایشگاهی با کاوشگرهای الیگونوکلئوتیدی اختصاصی گونه بر روی یک ریزآرایه انجام می گیرد و معمولاً برای ردیابی برجسب از فلورسنس استفاده می شود.

Affymetrix Genechip که از مجموعه فراوانی از الیگونوکلئوتیدهای سنتزی به جای لکه گذاری بر روی یک لایه شیشه ای استفاده می کند، به طور موفقیت آمیزی با استفاده از ژن های 16S rRNA به عنوان هدف برای شناسایی گونه های میکوباکتریوم جداسازی شده، به کار برده شد (۶۸، ۶۹).

Combichip، DNAchip، مقاومت دارویی میکوباکتریایی اخیراً شرح داده شده یک میکروچیپ الیگونوکلئوتیدی جفت شده با PCR برای ردیابی مقاومت INH و RIF می باشد. این روش با توالی یابی و تست حساسیت دارویی در ۶۹ مورد مقاومت به INH و یا RIF و ۲۷ ایزوله MTB حساس به دارو بررسی گردید (۷۰). این روش امکان شناسایی ۸۴ درصد ایزوله های مقاوم به INH را بر اساس جهش های کدون ۳۱۵ ژن katG و inhA-15 و ۱۰۰ درصد ایزوله های مقاوم به RIF براساس ۷ کدون روی ژن rpoB یعنی ۵۱۱، ۵۱۳، ۵۲۲، ۵۱۶، ۵۲۶، ۵۳۱، ۵۳۳ را فراهم کرد. در مجموع اختصاصیت کلی برای ردیابی مقاومت نسبت به INH و RIF به ترتیب ۱۰۰ درصد و ۹۵/۳ درصد بود. به دلیل بالا بودن هزینه مربوطه، استفاده از ریزآرایه ها برای تشخیص مقاومت دارویی در TB هنوز خارج از دسترس بسیاری از آزمایشگاه های میکوباکتریولوژی بالینی است.

## GeneXpert

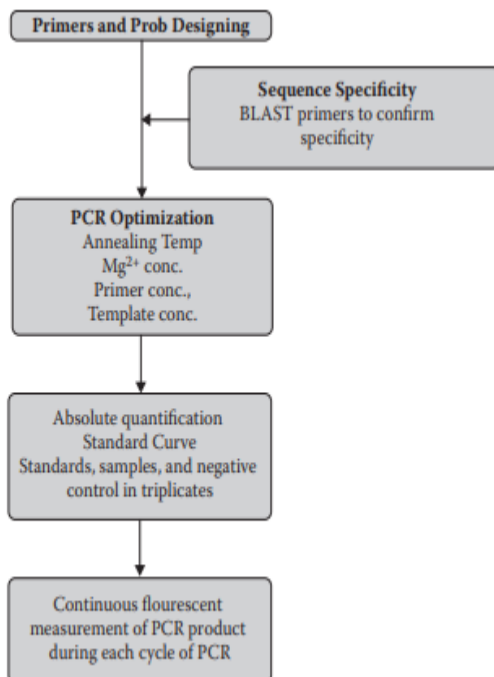
Xpert (R) MTB/RIF، تستی است که می تواند به طور همزمان MTB و مقاومت به ریفامپیسین (RIF) را تشخیص دهد. این تست از طریق شراکت بین Cepheid و موسسه خلاقانه تشخیص های نوین (FIND) دانشگاه پزشکی و دندانپزشکی نیوجرسی توسعه یافت. این سیستم بر اساس اصول کلی Real-time PCR و ردیابی آمپلیکون ها با استفاده از بیکن های مولکولی عمل می کند و قادر است یک تشخیص دقیق از بیماری را در کمتر از ۲ ساعت ارائه دهد. این



شکل ۱. تکثیر DNA با PCR.

تجربی و با استفاده از نرم افزارهای طراحی پرایمر، طراحی شود. دستور العمل های مربوط به کمیت های کلی Real-time PCR در شکل ۲ خلاصه شده است.

نکته: چندین ژن Housekeeping بایستی در هر آزمایش به منظور طبیعی سازی و تلفیق استاندارد خارجی (RNA بیگانه) موجود باشند، همچنین ضروری است که مهارکننده های احتمالی PCR بین درمان ها و ران ها تشخیص داده شوند.



شکل ۲. دستور العمل های مربوط به Real-time PCR.

## Real-Time PCR

**قاعده کلی:** در روش های Real-time PCR رنگ های فلورسنت یا کاوشگرهای DNA حاوی فلوروفور به منظور اندازه گیری مقدار محصول تکثیر شده به کار برده می شوند. کاوشگر TaqMan از دو نوع فلوروفور تشکیل شده است که جزئی از فلورسنت پروتئین های گزارشگر می باشند. کاوشگر می تواند به DNA الگو وابسته یا غیر وابسته باشد و قبل از شروع فعالیت پلیماز، فلوروفور خاموش کننده (معمولاً یک رنگ با طول موج بلند مانند رنگ قرمز) فلورسنس را از فلوروفور گزارشگر احیا می کند (معمولاً یک رنگ با طول موج کوتاه مانند رنگ سبز). این کار را با استفاده از انتقال انرژی رزونانس فلورسنس انجام می دهد که نوعی مهار یک رنگ توسط رنگ دیگر بدون خارج کردن پروتون می باشد. رنگ گزارشگر در انتهای ۵' و خاموش کننده، در انتهای ۳' کاوشگر یافت شده اند. دو نوع دیگر از روش Real-time PCR وجود دارد: روش بیکن مولکولی و روش SYBR سبز. در روش بیکن مولکولی از کاوشگر گزارشگر استفاده می شود که به دور یک سنجاق سر پیچیده شده است. همچنین، یک رنگ خاموش کننده دارد که بایستی در تماس نزدیک با گزارشگر باشد تا بتواند کار خود را انجام دهد. یک تفاوت مهم روش بیکن مولکولی در مقایسه با روش TaqMan این است که کاوشگر در محصول PCR به صورت دست نخورده باقی می ماند و در هر چرخه مجدداً با هدف باند می شود.

**روش:** Real-time PCR یک ابزار تحقیقاتی قدرتمند استثنایی می باشد. همراه با کیت معرف صحیح و طراحی آزمایشی قادر است تولید سریع داده های معنادار با کیفیت بالا را در اختیار ما قرار دهد. یک جفت پرایمر و کاوشگر مناسب می تواند بر اساس راهنماهای طراحی

## ژنوتایپینگ Genotyping

**قاعده کلی:** ژنوتایپینگ به فرآیند تعیین کردن ژنوتیپ ژنوم یک کمپلکس MTB با استفاده از آزمون‌های بیولوژیکی اشاره دارد. روش‌های کنونی شامل PCR توالی‌یابی DNA، کاوشگرهای اولیگونوکلوئید اختصاصی آل (ASO) و هیبریداسیون به ریزآرایه‌های DNA می‌باشند. استفاده از تکنیک ژنوتایپینگ میکوباکتریال از این جهت می‌باشد که DNA حاصل از منابع مختلف را مقایسه کند و یا اینکه یک ژنوم را از طریق مقایسه با یک استاندارد شناخته شده، شناسایی کند.

**روش:** آزمایشگاه‌های ژنوتایپینگ می‌توانند از سه روش ژنوتایپینگ استفاده کنند: اسپولیگوتایپینگ (Spoligotyping)، آنالیزهای واحدهای تکرارشونده پراکنده میکوباکتریوم (MIRU) و آنالیزهای پلی مورفیک طول قطعه محدود مستقر IS6110 (RFLP) که تحت عنوان انگشت نگاری (fingerprinting) شناخته می‌شود. آنالیزهای اسپولیگوتایپینگ و MIRU بر پایه PCR می‌باشند. این دو روش با یکدیگر به عنوان تست‌های ژنوتایپینگ PCR شناخته می‌شوند.

**RFLP:** آنالیزهای RFLP با روش استاندارد بین‌المللی انجام می‌شود (۷۲). به طور خلاصه، DNA ژنومی MTB استخراج گردید و با استفاده از PvuII هضم شد. قطعات DNA حاصل از انگشت نگاری با استفاده از ژل الکتروفورز از یکدیگر جدا شدند. سپس به یک غشای نایلونی با استفاده از روش ساترن بلاتینگ انتقال و با کاوشگر DNA حاوی توالی ۲۴۵ جفت باز IS6110 نشاندار شده با پراکسید از ترب کوهی کاوش شدند. هیبریداسیون کاوشگر به یک قطعه از ماهواره کوچک DNA منجر به ایجاد یک باند تیره بر روی کاغذ نیتروسولوزی اتورادیوگرافی گردید. الگوهای حاصل برای هر یک منحصر به فرد است.

**اسپولیگوتایپینگ:** اسپولیگوتایپینگ به طور کلی با یک کیت تجاری (Isogen Bioscience) انجام می‌شود. به طور خلاصه، این روش شامل تکثیر نواحی تکرار مستقیم (DR) ژنوم میکوباکتریوم توبرکلوزیس به روش PCR با استفاده از پرایمرهای بیوتینیل شده اختصاصی می‌باشد (۷۴، ۷۲).

**MIRU-VNTR:** تایپینگ توالی‌های تکراری پشت سر هم با تعداد متنوع میکوباکتریال (MIRU) یک نام اختصاصی کمپلکس MTB از آنالیزهای لوکوس‌های متعدد متفاوت در تعداد قطعات

پشت سر هم (VNTR) می‌باشد. این روش بر پایه تکثیر به روش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای نواحی کناری VNTRها و تعیین اندازه آمپلیکون‌ها که بیانگر تعداد کپی‌های VNTR تکثیر شده می‌باشد. استفاده از آن‌ها داده‌های تایپینگ را در قالب عددی قابل انتقال فراهم می‌کند که برای مطالعه اپیدمیولوژی مولکولی جهانی عوامل عفونی مناسب است (۷۶، ۷۵).

## بحث و چشم‌انداز آینده

درک این نکته که هیچ آزمونی وجود ندارد که بتواند به تنهایی میکوباکتری‌ها به ویژه میکوباکتریوم‌های آنتی‌بیوتیک (NTM) را شناسایی کند، مهم می‌باشد. بسیاری از گونه‌های جدید ممکن است حتی با تمامی آزمون‌ها هم قابل تشخیص نباشند. وجود انبوهی از گونه‌ها یک چالش اضافی برای آزمایشگاه‌های میکوباکتریولوژی بالینی ایجاد می‌کند تا امکان ارائه خدمات به موقع را فراهم کنند. علاوه بر این، بعضی از گونه‌ها (از جمله *M. haemophilum* و *M. genavense*) به شرایط رشدی خاصی نیاز دارند و نیازمند همکاری دقیق بین پزشک درخواست‌کننده آزمایش و متخصص آزمایشگاهی که آزمایش را انجام می‌دهد، می‌باشند. برای غلبه بر این کاستی‌های روش‌های مرسوم، در سال‌های اخیر، تکنیک‌های مولکولی به طور فزاینده‌ای مورد توجه قرار گرفته‌اند. زیرا آنها سریع، قابل اعتماد، بسیار حساس و اختصاصی هستند و برای تعداد زیادی از نمونه‌ها قابل انجام می‌باشند. نکته مهم این است که برخی از این آزمایش‌های مولکولی تایید شده توسط WHO می‌توانند جهش‌های ژن میکوباکتریایی مرتبط با مقاومت دارویی را شناسایی کنند و به پزشکان این امکان را می‌دهند تا درمان موثرتر را انجام دهند.

آزمون‌های (Gen-Probe, San Diego, Calif.) Accuprobe و PCR در مقایسه با تست‌های فنوتیپی به طور گسترده‌تری در کشورهای توسعه یافته برای شناسایی گونه‌های میکوباکتری‌ها مورد استفاده قرار گرفته و به طور قابل ملاحظه‌ای با گذر زمان پیشرفت و به طور رایج استفاده می‌شود. به هر حال، نتایج حاصل از این تست‌ها بایستی با گزارش بالینی مطابقت داشته باشد و در صورت عدم انطباق نتایج، پزشک باید به آزمایشگاه اطلاع بدهد. روش ریزآرایه DNA برای آینده نویدبخش می‌باشد، زیرا انجام دادن آن آسان است و می‌تواند به راحتی خودکار شود و امکان شناسایی تعداد زیادی از گونه‌های میکوباکتریایی را در یک واکنش فراهم می‌کند. به هر حال، به دلیل نیاز به تجهیزات اضافی و پرسنل آموزش دیده این روش‌ها پر هزینه می‌باشند و هنوز دسترسی آسانی به رویه‌های معمول در آزمایشگاه میکوباکتریولوژی بالینی به دست نیآورده‌اند، به ویژه در کشورهایی کم‌درآمدی که TB

امروزه، تکنیک ها و تجهیزات به طور فزاینده ای در حال پیچیده شدن و گران شدن می باشند و به روز رسانی آزمایشگاه های محلی به منظور انجام این آزمون ها دشوار است. نظر به اینکه با این روش ها، تحویل نمونه و یا ارتباطات نتایج را می توان به سرعت و راحتی انجام داد، به ندرت از آزمایشگاه های مرجع استفاده می شود و تست های مولکولی پیچیده رویکرد عملی تری خواهد بود.

بومی می باشد. در چین کشورهای با منابع محدود، تشخیص عفونت های مایکوباکتریایی به صورت تجربی بر اساس روش های بالینی-رادیولوژیکی و یا آزمایش باسیل اسید فست (AFB) با اسمیر خلط انجام می گیرد. به دلیل کمبود امکانات اکثر آزمایشگاه ها در کشورهای بومی بیماری مایکوباکتری ها را از طریق کشت تشخیص نمی دهند و عفونت های ناشی از مایکوباکتریوم های آتیبیک (NTM) کمتر تشخیص داده شده است.

## منابع

- Soini, H., and Musser, J.M., Molecular diagnosis of mycobacteria, *Clin. Chem.*, 47, 809, 2001.
- Rosenzweig, D.Y., Nontuberculous mycobacterial disease in the immunocompetent adult, *Semin. Respir. Infect.*, 11, 252, 1996.
- Saubolle, M.A. et al., *Mycobacterium haemophilium*: Microbiology and expanding clinical and geographical spectra of disease in humans, *Clin. Microbiol. Rev.*, 9, 435, 1996.
- Ananthanarayan, R., and Pannikar, C.K.J., *Mycobacterium tuberculosis*. In Ananthanarayan, R., and Pannikar, C.K.J. (Editors), *Textbook of Microbiology*, pp. 324–337, Orient Longman, Madras, 1996.
- Jenkins, P.A., The microbiology of tuberculosis. In Davis, P.D.O. (Editor), *Clinical Tuberculosis*, p. 33, Chapman & Hall, London, 1994.
- Dodge, O.G., *Mycobacterial skin ulcers in Uganda: Histopathological aspects*, *J. Pathol. Bacteriol.*, 88, 169, 1964.
- H, Tomioka. [Bacteriology of mycobacteria: taxonomic and morphological characteristics]. *Nihon Rinsho* 1998 Vol. 56 Issue 12 Pages 3001-7.
- O'Brian, R.J., Geiter, L.J., and Snider, D.E., The epidemiology of non tuberculous mycobacteria disease in the United States: Results from national survey, *Am. Rev. Respir. Dis.*, 135, 1007, 1987.
- Matoss, E.D. et al., Nontuberculous mycobacteria at a multiresistant tuberculosis reference centre in Bahia: Clinicoepidemiological aspects, *Braz. J. Infect. Dis.*, 8, 296, 2004.
- Choudhari, S. et al., Clinical significance of nontuberculous mycobacteria isolates in a Canadian tertiary care center, *Clin. Infect. Dis.*, 21, 128, 1995.
- Schluger, N.W., and Rom, W.N., The host immune response to tuberculosis, *Am. J. Resp. Crit. Care Med.*, 157, 679, 1998.
- Danneenberg, A.M.J., and Tomashifski, J.F., Jr., Pathogenesis of pulmonary tuberculosis. In Fishmann, A.P. (Editor), *Pulmonary Diseases and Disorders*, 3rd ed., p. 2447, McGraw Hill, New York, 1998.
- Bloom, B.R., and Murray, C.J.L., Tuberculosis: Commentary on a reemerging killer, *Science*, 257, 1055, 1992.
- Katoch, V.N., Infections due to non tuberculous mycobacteria (NTM), *Indian J. Med. Res.*, 120, 290, 2004.
- Graybill, J.R., et al., Disseminated mycobacteriosis due to *Mycobacterium abscessus* in two recipients of renal homograft, *Am. Rev. Respir. Dis.*, 109, 4, 1974.
- Iseman, M.D. et al., Disease due to *Mycobacterium avium-intracellulare*, *Chest*, 87, 139S, 1985.
- ATS guidelines 2007, David E. Griffith, Timothy Aksamit, Barbara A. Brown-Elliott. An Official ATS/IDSA statement: Diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 175, 367, 2007.
- Collins, C.H. et al., *Mycobacterium marinum* infectious in man, *J. Hyg. (Lond)*, 94, 135, 1985.
- Grange, J.M., Infections caused by opportunist mycobacteria: A review, *J. Royal Soc. Med.*, 79, 226, 1986.
- Jackson, P.G. et al., Injection abscesses due to *Mycobacterium chelonae* occurring in a diabetic patient, *Tubercle*, 62, 277, 1981.
- Borghans, J.G., and Standford, J.L., *Mycobacterium chelonae* in abscesses after injection of diphtheria-pertussis-tetanuspolio vaccine, *Am. Rev. Respir. Dis.*, 107, 1, 1973.
- Kuritaky, J.N. et al., Sternal wound infections and endocarditis due to organisms of the *Mycobacterium fortuitum* complex, *Ann. Intern. Med.*, 98, 938, 1983.
- Gangadharam, P.R.J., Lanier, J.D., and Jones, D.E., Keratitis due to *Mycobacterium kansasii*, *Tubercle*, 59, 55, 1978.
- Moulsdale, M.T. et al., Infection by *Mycobacterium haemophilum*, a metabolically fastidious acid-fast bacillus, *Tubercle*, 64, 29, 1983.
- Cohen, R.J. et al., Occult infections with *M. intracellulare* in bone-marrow biopsy specimens from patients with AIDS, *N. Engl. J. Med.*, 308, 1475, 1983.
- Graybill, J.R. et al., Disseminated mycobacteriosis due to *Mycobacterium abscessus* in two recipients of renal homograft, *Am. Rev. Respir. Dis.*, 109, 4, 1974.
- Gordin, F., and Slutlin, G., The validity of acid-fast smears in the diagnosis of tuberculosis, *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 114, 1025, 1990.
- Kent, and Kubica, G.P., *Public health mycobacteriology a guide for level III lab*. Atlanta, GA: U.S. Department of health and human services, Public health services. Center for disease control, 64, 1985.
- Mole, R.J., and WO'C Maskell, T., Review phage as a diagnostic the use of phage in TB diagnosis, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 76, 683, 2001.
- Shenai, S., Rodrigues, C., and Mehta, A.P., Evaluation of a new phage amplification technology for the rapid diagnosis of tuberculosis, *Int. J. Med. Microbiol.*, 20, 194, 2002.
- Kalantri, S. et al., Bacteriophage-based tests for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens: A systematic review and meta-analysis, *BMC Infect. Dis.*, 5, 59, 2005.
- Jacob, W.R. et al., Rapid assessment of drug susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* by means of luciferase reporter phages, *Science*, 260, 819, 1993.
- Butler, W.R., and Kilburn, J.O., Identification of major slowly growing pathogenic *Mycobacteria* and *Mycobacteria gordonae* by high performance liquid chromatography of their mycolic acids, *J. Clin. Microbiol.*, 26, 50, 1988.

34. Butler, W.R., and Guthertz, L.S., Mycolic acid analysis by high-performance liquid chromatography for identification of Mycobacterium species, Clin. Microbiol. Rev., 14, 704, 2001.
35. Eing, B.R., Becker, A., Sohns, A., and Ringelmann, R. Comparison of Roche Cobas Amplicor Mycobacterium tuberculosis assay with in-house PCR and culture for detection of M. tuberculosis, J. Clin. Microbiol., 36, 2023, 1998.
36. Pai, M., Kalantri, S., and Dheda, K., New tools and emerging technologies for the diagnosis of tuberculosis: Part II. Active tuberculosis and drug resistance, Expert Rev. Mol. Diagn., 6, 423, 2006.
37. Tortoli, E., and Palomino, J.C., New diagnostic methods. In Tuberculosis, Chapter 14, p. 441, 2007.
38. Bergmann, J.S., and Woods, G.L., Clinical evaluation of the BD-ProbeTec Strand Displacement Amplification Assay for rapid diagnosis of tuberculosis, J. Clin. Microbiol., 36, 2766, 1998.
39. Piersimoni, C., and Scarparo, C., Relevance of commercial amplification methods for direct detection of Mycobacterium tuberculosis complex in clinical samples, J. Clin. Microbiol., 41, 5355, 2003.
40. Chengtao, H., and Weishilbourn, R.M., The polymerase chain reaction (PCR) is the most widely used technique for the study of DNA. Applications of PCR have been extended significantly by the development of long PCR, Curr. Issues Mol. Biol., 1, 77, 1999.
41. Johansen, I.S., Rapid diagnosis of mycobacterial diseases and their implication on clinical management, Dan. Med. Bull., 53, 28, 2006.
42. M. R. Maleki, H. S. Kafil, N. Harzandi and S. R. Moaddab. Identification of nontuberculous mycobacteria isolated from hospital water by sequence analysis of the hsp65 and 16S rRNA genes. J Water Health 2017 Vol. 15 Issue 5 Pages 766-774.
43. Roth, A. et al., Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria based on 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences, J. Clin. Microbiol., 36, 139, 1998.
44. Verma, A., Rattan, A., and Tyagi, J.S., Development of 23S rRNA based PCR for the detection of mycobacteria, Indian J. Biochem. Biophys., 31, 288, 1994.
45. Soini, H., Bottger, E.C., and Viljanen, M.K., Identification of mycobacteria by PCR-based sequence determination of the 32-kilodalton protein gene, J. Clin. Microbiol., 32, 2944, 1994.
46. Cave, M.D. et al., Stability of DNA fingerprint pattern produced with IS6110 in strains of Mycobacterium tuberculosis, J. Clin. Microbiol., 32, 262, 1994.
47. Telenti, A. et al., Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis, J. Clin. Microbiol., 31, 175, 1993.
48. Vaneechoutte, M. et al., Identification of Mycobacterium species by using amplified ribosomal DNA restriction analysis, J. Clin. Microbiol., 31, 2061, 1993.
49. Lee, H. et al., Species identification of mycobacteria by PCR-restriction fragment length polymorphism of the rpoβ gene, J. Clin. Microbiol., 38, 2966, 2000.
50. Roth, A. et al., Novel diagnostic algorithm for identification of mycobacteria using genus-specific amplification of the 16S-23S rRNA gene spacer and restriction endonucleases, J. Clin. Microbiol., 38, 1094, 2000.
51. Magalhaes, V.D. et al., Reliability of hsp65-RFLP analysis for identification of species in cultured strains and clinical specimens, J. Microbiol. Methods, 49, 295, 2002.
52. Kim, B.J. et al., Identification of mycobacterial species by comparative sequence analysis of the RNA polymerase gene (rpoB), J. Clin. Microbiol., 37, 1714, 1999.
53. Kapur, V. et al., Rapid Mycobacterium species assignment and unambiguous identification of mutations associated with antimicrobial resistance in Mycobacterium tuberculosis by automated DNA sequencing, Arch. Pathol. Lab. Med., 119, 131, 1995.
54. McNabb, A. et al., Assessment of partial sequencing of the 65-kilodalton heat shock protein gene (hsp 65) for routine identification of mycobacterium species isolated from clinical sources, J. Clin. Microbiol., 42, 3000, 2004.
55. Zhu R.Y., et al. Use of visual loop-mediated isothermal amplification of rimM sequence for rapid detection of Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium bovis, J Microbiol. Methods., 78(3), 339, 2009.
56. Bull, T.J., and Shanson, D.C. Evaluation of a commercial chemiluminescent Gen Probe system "AccuProbe" for the rapid identification of mycobacteria including "MAIC X", isolated from blood and other sites, from patients with AIDS. J. Hosp. Infect., 21, 143, 1992.
57. Tortoli, E. et al. Evaluation of a commercial DNA probe assay for the identification of Mycobacterium kansasii, Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 13, 264, 1994.
58. Tortoli, E., Simonetti, M.T., and Lavinia, F., Evaluation of reformulated chemiluminescent DNA probe (Accuprobe) for culture identification of Mycobacterium kansasii, J. Clin. Microbiol., 34, 2838, 1996.
59. Saito, H. et al., Identification and partial characterization of Mycobacterium avium and Mycobacterium intracellulare by using DNA probes, J. Clin. Microbiol., 27, 994, 1989.
60. Gonzales, R., and Hanna, B.A., Evaluation of Gen-Probe DNA hydrozoatopn system for the identification of Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium avium-intracellulare, Diagn. Microbiol. Infect. Dis., 8, 69, 1987.
61. Shenai, S., Rodrigues, C., and Mehta, A., Rapid diagnosis of tuberculosis using transcription mediated amplification, Indian J. Med. Microbiol., October, 19, 184, 2001.
62. Torkko, P. et al., Mycobacterium palustre sp nov., a potentially pathogenic slow-growing mycobacterium isolated from veterinary and clinical specimens, and Finnish stream water, Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 52, 1519, 2002.
63. Turenne, C.Y. et al., Mycobacterium, parascrofulaceum sp, nov., a novel slowly growing, scotochromogenic clinical isolates related to Mycobacterium interjectum and Accuprobe positive for Mycobacterium avium complex, Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 54, 659, 2004.
64. Shenai, S., Rodrigues, C., and Mehta, A., Rapid speciation of 15 clinically relevant mycobacteria with simultaneous detection of resistance to rifampicin, isoniazid and streptomycin in M. tuberculosis complex, Int. J. Infect. Dis., 13, 46, 2009.
65. Tortoli, E., Mariottini, A., and Mazzarelli, G., Evaluation of INNO-LiPA MYCOBACTERIA V2: Improved reverse hybridization multiple DNA probe assay for mycobacterial identification, J. Clin. Microbiol., 41, 4418, 2003.
66. Martin, A., and Porteous, F., Drug resistance and drug resistance detection. In Tuberculosis, Chapter 19, p. 635, 2007.
67. Fukushima, M. et al., Development of DNA microarray method to detect and identify pathogenic bacteria, Jpn. J. Electroanalysis, 45, 235, 2004.
68. Troesch, A. et al., Mycobacterium species identification and rifampicin resistance testing with high-density DNA probe arrays, J. Clin. Microbiol., 37, 1079, 1999.
69. Fukushima, M. et al., Detection and identification of Mycobacterium species isolates by DNA microarray, J. Clin. Microbiol., 41, 2605, 2003.
70. Caoli, J.C. et al., Evaluation of the TB-Biochip oligonucleotide microarray system for rapid detection of rifampin resistance in Mycobacterium tuberculosis, J. Clin. Microbiol., 44, 2378, 2006.
71. Erlich, H.A., PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplifications, Stockton Press, New York, 1989.
72. van Embden, J.D. et al., Strain identification of Mycobacte-

- rium tuberculosis by DNA fingerprinting: Recommendations for a standardized methodology, *J. Clin. Microbiol.*, 31, 406, 1993.
73. Kamerbeek, J. et al., Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology, *J. Clin. Microbiol.*, 35, 907, 1997.
74. Groenen, P.M.A. et al., Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*: Application for strain differentiation by a novel typing method, *Mol. Microbiol.*, 10, 1057, 1995.
75. Supply, P. et al., Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units, *J. Clin. Microbiol.*, 39, 3563, 2001. doi: 10.1128/JCM.39.10.3563-3571.2001.
76. Klevytska, A. et al., Identification and characterization of variable-number tandem repeats in the *Yersinia pestis* genome, *J. Clin. Microbiol.*, 39, 3179, 2001.