

## Identification of Mycobacterium species isolated from patients using high-performance liquid chromatography in Tehran during 2014-2015

Mirzapour A<sup>1</sup>, Yousefi M<sup>2</sup>, Zaker-Bostanabadi S<sup>3</sup>, Hashemi-Shahraki A<sup>4</sup>, Nazari-Alam A<sup>5\*</sup>, Ebrahimi SA<sup>6</sup>

1- Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, I. R. Iran.

2- Infectious Diseases Research Center, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, I. R. Iran.

3- Department of Microbiology, Parand Branch, Islamic Azad University, Tehran, I. R. Iran.

4- Pasteur Institute, Department of Epidemiology, Tehran, I. R. Iran.

5- Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, I. R. Iran

6- Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, I. R. Iran.

Received May 25, 2017; Accepted December 13, 2017

### Abstract:

**Background:** Non-tuberculous mycobacteria (NTM) are defined as mycobacteria other than *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), which do not cause tuberculosis or leprosy. Early and precise diagnosis of NTM is particularly important for the correct epidemiological control and specific treatments. The aim of this study was to identify the mycobacterium species isolated from patients referred to hospitals in Tehran using the high-performance liquid chromatography (HPLC) method.

**Materials and Methods:** In this cross-sectional descriptive study, a collection of isolates (n=20) was obtained from clinical specimens submitted to the Masoud Laboratory in Tehran, Iran, during 2014-2015. The strains were isolated from sputum, urine, blood, and various sterile body fluid specimens. Chromatography was conducted at a flow rate with a curvilinear gradient of methanol and methylene chloride, beginning at 98% methanol containing 2% methylene chloride and ending at 35% methanol contained in 65% methylene chloride.

**Results:** From a total of 20 clinical isolates, 8 isolates (40%) were identified as *Mycobacterium abscessus*, 6 isolates (30%) *M. tuberculosis*, 3 isolates (15%) *M. intracellulare* and 3 isolates (15%) *M. fortuitum*.

**Conclusion:** For the proper treatment, rapid differentiation between MTB and NTM should be performed in persons who are diagnosed with or are suspected of having infectious TB disease. So, the HPLC method can be suggested as a cost-effective, specific and reliable method for rapid identification of MTB and differentiation of NTM strain from positive cultures isolated from clinical specimens.

**Keywords:** *Mycobacterium tuberculosis*, Chromatography high pressure liquid, Tuberculosis, Sputum, Identification

### \* Corresponding Author.

**Email:** nazarialam.ali@gmail.com

**Tel:** 0098 315 554 0021

**Fax:** 0098 31 555 41112

**Conflict of Interests:** No

*Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, February, 2018; Vol. 21, No 6, Pages 577-583*

**lease cite this article as:** Mirzapour A, Yousefi M, Zaker-Bostanabadi S, Hashemi-Shahraki A, Nazari-Alam A, Ebrahimi SA. Identification of Mycobacterium species isolated from patients using high-performance liquid chromatography in Tehran during 2014-2015. *Feyz* 2018; 21(6): 577-83.

# شناسایی گونه‌های مایکو باکتریوم جدا شده از بیماران شهر تهران طی سال‌های ۱۳۹۳ تا ۱۳۹۴ با استفاده از روش HPLC

علی‌یار میرزاپور<sup>۱</sup>، مسعود یوسفی<sup>۲</sup>، سعید ذاکر بستان‌آبادی<sup>۳</sup>، عبدالرزاق هاشمی شهرکی<sup>۴</sup>، علی نظری عالم<sup>۵\*</sup>، سلطان احمد ابراهیمی<sup>۶</sup>

## خلاصه:

**سابقه و هدف:** مایکوباکتریوم‌ها به‌غیر از کمپلکس مایکوباکتریوم‌های *توبرکلوزیس* و عامل بیماری جذام، به‌عنوان مایکوباکتریوم غیر *توبرکلوزیس* (NTM) محسوب می‌گردند. تشخیص سریع و درست NTM برای درمان و کنترل بیماری‌های ناشی از این میکروارگانیسم‌ها دارای اهمیت ویژه می‌باشد. هدف از این مطالعه شناسایی گونه‌های مایکوباکتریوم جدا شده از بیماران شهر تهران با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** در این بررسی مقطعی ۲۰ ایزوله بالینی مایکوباکتریوم ارجاع شده به آزمایشگاه مسعود تهران طی سال‌های ۱۳۹۳-۱۳۹۴ مورد بررسی قرار گرفت. ایزوله‌ها از نمونه‌های مختلف شامل: خلط، ادرار، خون و مایعات استریل بدن جمع‌آوری شد. کروماتوگرافی با شیب گرادینت از متانول ۹۸ درصد و کلرید متیلن ۲ درصد شروع شد و با متانول ۳۵ درصد و کلرید متیلن ۶۵ درصد به انجام رسید. **نتایج:** از ۲۰ ایزوله‌های بالینی جدا شده، ۸ ایزوله (۴۰ درصد) مایکوباکتریوم *آبسه‌سوس*، ۶ ایزوله (۳۰ درصد) مایکوباکتریوم *توبرکلوزیس*، ۳ ایزوله (۱۵ درصد) مایکوباکتریوم *ایتراسلولار* و ۳ ایزوله (۱۵ درصد) مایکوباکتریوم *فورتیتوم* بودند. **نتیجه‌گیری:** جهت درمان مناسب در افرادی که مشکوک به عفونت سلی هستند، تشخیص مایکوباکتریوم *توبرکلوزیس* از NTM باید با سرعت انجام گیرد. در این خصوص استفاده از روش HPLC در کشت‌های مثبت جدا شده از نمونه‌های بالینی به‌عنوان روشی سریع، مقرون‌به‌صرفه، اختصاصی و قابل اعتماد مطرح می‌باشد.

**واژگان کلیدی:** مایکوباکتریوم *توبرکلوزیس*، کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا، بیماری سل، خلط، شناسایی

دو ماه‌نامه علمی- پژوهشی فیض، دوره بیست و یکم، شماره ۶، بهمن و اسفند ۱۳۹۶، صفحات ۵۸۳-۵۷۷

## مقدمه

بوده که بعد از مایکوباکتریوم *توبرکلوزیس*، به‌عنوان شناخته‌شده-ترین مایکوباکتریوم‌ها محسوب می‌گردند [۲]. عفونت‌های ناشی از مایکوباکتریوم‌های غیر سلی در اکثر کشورهای دنیا در حال افزایش می‌باشد [۳]. این مایکوباکتریوم‌ها جزء ارگانیسم‌های موجود در طبیعت هستند و به‌طور معمول در آب، غذا، خاک، و در بدن حیوانات حضور دارند. این ارگانیسم‌ها جزء پاتوژن‌های فرصت-طلب می‌باشند. باکتری از طریق منابع آلوده محیطی و از راه گوارشی منجر به آلوده شدن انسان می‌گردد. برخی گزارشات وجود دارد که NTM از حیوانات خانگی و اهلی و حتی از جایگاه‌های نگهداری این حیوانات می‌توانند به انسان انتقال پیدا کنند [۴]. NTM باعث ایجاد طیف وسیعی از بیماری‌ها مانند: بیماری‌های ریوی، پوستی، و عفونت بافت‌های نرم در بیماران با نقص سیستم ایمنی می‌شوند [۵، ۶]. براساس مطالعات مختلف میزان شیوع این باکتری در بیماران با نقص سیستم ایمنی در حال افزایش می‌باشد [۷، ۸]. در یک مطالعه‌ای که در ایران بین سال‌های ۲۰۰۲ تا ۲۰۰۶ صورت گرفت میزان شیوع NTM حدود ۱۲ درصد گزارش شد [۹]. در مطالعه‌ای دیگر که در اصفهان در سال ۲۰۱۱ انجام شده، شیوع آن ۶۲ درصد گزارش شده است [۱۰] و نیز طی یک بررسی که در استان خوزستان در سال ۲۰۱۶ انجام شد، میزان شیوع این باکتری حدود ۳۰ درصد گزارش گردید [۱۱]. در تمام بیمارانی که

یکی از قدیمی‌ترین بیماری‌ها در انسان، بیماری سل می‌باشد. این بیماری در جوامع بشری هنوز جزء عوامل عمده مرگ‌و-میر محسوب شده و مهم‌ترین عامل آن مایکوباکتریوم *توبرکلوزیس* می‌باشد [۱]. مایکوباکتریوم‌های غیر سلی (Non Tuberculosis Mycobacterium; NTM) جزء باکتری‌های اسید فست (AFB)

<sup>۱</sup> دانشجوی دکتری تخصصی انگل شناسی، گروه انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران  
<sup>۲</sup> استادیار، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران  
<sup>۳</sup> استادیار، گروه میکروب شناسی، واحد پرند، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران  
<sup>۴</sup> استادیار، گروه اپیدمیولوژی، انستیتو پاستور، تهران، ایران  
<sup>۵</sup> استادیار، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران  
<sup>۶</sup> دانشیار، گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

## \* نشانی نویسنده مسئول:

کاشان، بلوار قطب راوندی، خیابان پزشک، دانشکده پزشکی، گروه میکروب شناسی

دوره‌نویس: ۰۳۱ ۵۵۵۴۱۱۱۲

تلفن: ۰۳۱۵۵۵۴۰۰۲۱

پست الکترونیک: nazari.ami@gmail.com

تاریخ پذیرش نهایی: ۹۶/۹/۲۲

تاریخ دریافت: ۹۶/۳/۴

شناسایی گونه‌های مایکو باکتریوم‌های جدا شده از، ...

آلودگی‌زدایی با هیدروکسید سدیم و در ادامه خنثی‌سازی با بافر  $K_2PO_4$  صورت گرفت. سپس، نمونه‌ها در دور ۳۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ گردیدند. در نمونه‌هایی که از مناطق استریل بدن گرفته شد، فقط سانتریفوژ صورت گرفت. بعد از آماده‌سازی نمونه‌ها، از رسوب به دست آمده یک گسترش تهیه گردید و به-روش نیلسون رنگ‌آمیزی صورت گرفت. سپس، نمونه‌ها در محیط لوین اشتاین جانسون کشت داده شدند [۱۹]. جهت انجام HPLC (Knauer, Germany) مراحل بدین شرح انجام گردید: ۱- جمع‌آوری: دو میلی‌لیتر معرف صابون‌سازی به یک لوله اضافه شد. سپس، یک تا دو لوپ کلونی باکتری از روی محیط لوین اشتاین جانسون برداشته شد. کلونی به معرف صابون‌سازی اضافه گردید و به یک لوله درب‌پیچ‌دار منتقل شده و به مدت ۲۰ ثانیه به شدت مخلوط گردید. سپس، مراحل صابون‌سازی با کلروفرم، مشتق‌سازی با پی‌بروموفنول آسیدل استر و شفاف‌سازی به ترتیب انجام شد؛ ۲- تکمیل و ذخیره‌سازی: نمونه‌های حاوی کلروفرم با استفاده از گاز ازت تبخیر داده شد تا خشک شدند. نمونه‌های خشک شده، آماده جهت آنالیز، در دمای ۴ تا ۶ درجه سانتی‌گراد ذخیره گردید؛ ۳- کار با دستگاه HPLC: موبایل‌ها (محلول‌ها) قبل از شروع کار سونیکیت شدند. موبایل‌ها شامل موارد زیر بودند: مخزن شماره یک: دی‌کلرومتان و متانول به نسبت مساوی؛ مخزن شماره دو: دی‌کلرومتان؛ مخزن شماره سه: ۱۰ درصد آب و ۹۰ درصد متانول؛ و مخزن شماره چهار: آب مقطر دوبر تقطیر شده. ابتدا دکتور، پمپ و ثبت‌کننده (ریکاردر) را روشن کرده و در ادامه پمپ هواگیری شد. بعد از وارد کردن مشخصات، به نمونه خشک شده ۵۰ میکرولیتر از موبایل شماره یک اضافه شد. سپس، توسط سرنگ تزریق انجام شده و پس از یک ساعت پیک‌ها توسط ریکاردر رسم گردید. برای آنالیز اسید مایکولیک روش گرادینت مورد استفاده قرار گرفت و نوع ستون استفاده شده آکتا دسیل سیلان بود [۲۱،۲۰]. در این مطالعه از ۱۴ سویه مایکوباکتریوم به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. در روش HPLC معیار شناسایی گونه‌های مایکوباکتریوم انطباق کلی اسیدهای مایکولیک بود که به‌صورت قله (Peak) رویت می‌گردید. این قله‌ها بر اساس وزن مولکولی به‌صورت دسته‌هایی تکی، دوتایی، سه‌تایی و چهارتایی ظاهر می‌شدند؛ این دسته‌ها براساس تعداد قله‌ها، زمان بازداری (Retention times) و اوج ارتفاع نسبی (Relative peak heights) به‌دست می‌آیند [۲۱]. جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS و ویرایش ۱۸ و آزمون‌های ویلکاکسون و مجذور کای استفاده شد.

نمونه‌های مثبت AFB دارند، به‌ویژه در بیماران تنفسی، به‌طور کلی به‌عنوان عفونت سل شناسایی شده و اقداماتی نظیر تجویز آنتی-بیوتیک و همچنین ایزوله کردن بیماران صورت می‌گیرد. جداسازی و تشخیص درست و سریع NTM در این‌گونه بیماران باعث جلوگیری از انجام درمان‌های غیرضروری شده که در نهایت می-تواند منجر به تجویز آنتی‌بیوتیک‌های مناسب گردد [۱۲،۱۳]. شناسایی ایزوله‌های بالینی مایکوباکتریوم در حد گونه دارای اهمیت می‌باشد؛ چراکه گونه‌های NTM طیف وسیعی از بیماری‌های مختلف ایجاد می‌کنند و همچنین در ایجاد حساسیت نسبت به داروهای ضد میکروبی دارای تفاوت‌های عمده و اساسی هستند [۱۴]. از روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) در تشخیص عفونت‌های مایکوباکتریومی استفاده می‌شود؛ این یک روش سریع و ارزان جهت تشخیص NTM می‌باشد [۱۵]. شناسایی مایکوباکتریوم در نمونه‌های بالینی با استفاده از روش HPLC در مقایسه با روش‌های دیگر مثل الگوهای اثر انگشت (fingerprinting) می‌تواند به‌عنوان مرجع تلقی شود. در این روش آنالیز اسیدهای چرب مربوط به اسید میکولیک دیواره سلولی اختصاصی گروه و گونه مورد ارزیابی قرار می‌گیرد [۱۶،۱۷]. این تکنیک روشی آسان و راحت بوده که در اکثر آزمایشگاه‌های تشخیص میکروبی قابلیت انجام دارد. با توجه به مزایای ذکر شده، این روش یکی از مناسب‌ترین روش‌ها جهت شناسایی جنس و گونه‌های مایکوباکتریوم می‌باشد [۱۶،۱۸]. هدف از این مطالعه شناسایی گونه‌های مایکوباکتریوم جدا شده از بیماران شهر تهران با استفاده از روش HPLC می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

جهت بررسی وجود NTM و مایکوباکتریوم توبرکلوس-زیس در این مطالعه مقطعی، نمونه‌گیری از افراد مشکوک به سل مراجعه‌کننده به آزمایشگاه مسعود و برخی آزمایشگاه‌های دیگر در سطح شهر تهران طی سال‌های ۱۳۹۳ تا ۱۳۹۴ انجام گردید. طی مدت زمان ۶ ماه، ۲۰ ایزوله مایکوباکتریوم از افراد با AFB مثبت جمع‌آوری گردید. کلیه بیماران مشکوک به عفونت سل از لحاظ بالینی وارد مطالعه شده و بیمارانی که AFB منفی داشتند، از مطالعه خارج شدند. این باکتری‌ها از نمونه‌های مختلفی از جمله: خلط، ادرار، زخم‌های پوستی و نمونه‌های استریل بدن گرفته شد. پس از گرفتن و جمع‌آوری نمونه آماده‌سازی نمونه‌های غیراستریل به شرح زیر انجام گردید: ابتدا مایع کردن نمونه (Liquefaction) با استفاده از آن‌استیل‌السیستین و سپس

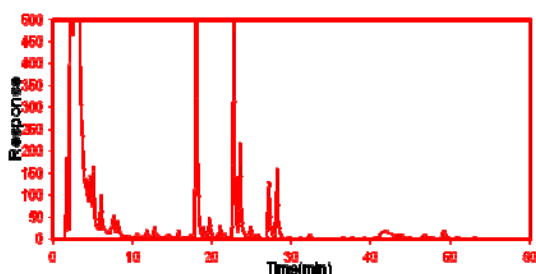
## نتایج

روش تشخیصی HPLC از ۲۰ نمونه، بیشترین فراوانی مربوط به مایکوباکتریوم آبه‌سوس بود که ۴۰ درصد ایزوله‌ها را شامل می‌شد. بین سن بیماران و همچنین نوع نمونه بالینی با نوع گونه باکتریایی جدا شده اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. توزیع فراوانی نوع گونه‌های مایکوباکتریوم و تعداد آنها در جدول شماره ۲ آورده شده است.

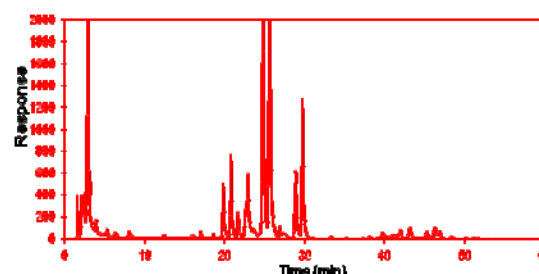
توزیع فراوانی نوع نمونه‌ها و جنسیت آنها در جدول شماره ۱ ذکر شده است. متوسط سن بیماران مورد مطالعه بین ۴۵ تا ۶۵ سال بود. در روش HPLC معیار شناسایی گونه‌های مایکو-باکتریوم انطباق کلی اسیدهای مایکولیک به صورت نمودارهای با قله نوک تیز تک، دوتایی و سه‌تایی و همچنین زمان بین این قله‌ها بوده که در شکل‌های شماره ۱ تا ۴ نشان داده شده است. بر اساس

جدول شماره ۱- توزیع فراوانی نوع نمونه‌ها و جنسیت بیماران مورد مطالعه

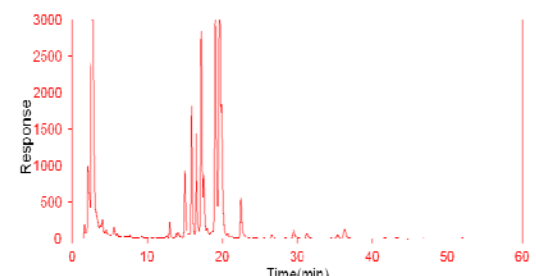
جنسیت		نوع نمونه			
زن	مرد	زخم‌های پوستی	نواحی استریل بدن	ادرا	تعداد (درصد)
تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	(تعداد ایزوله‌ها) (درصد)	(تعداد ایزوله‌ها) (درصد)	(تعداد ایزوله‌ها) (درصد)	(تعداد ایزوله‌ها) (درصد)
۱۱ (۵۵)	۹ (۴۵)	۳ (۱۵)	۲ (۱۰)	۱ (۵)	



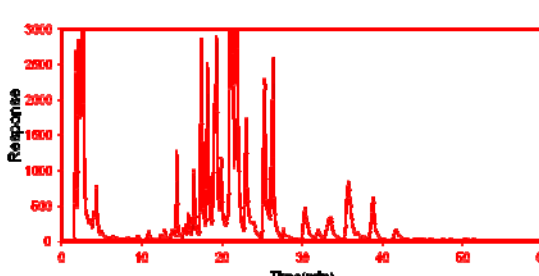
شکل شماره ۲- کروماتوگرافی اسید مایکولیک موجود در دیواره مایکوباکتریوم توبرکلوزیس



شکل شماره ۱- کروماتوگرافی اسید مایکولیک موجود در دیواره مایکوباکتریوم آبه‌سوس



شکل شماره ۴- کروماتوگرافی اسید مایکولیک موجود در دیواره مایکوباکتریوم فورتنیوم



شکل شماره ۳- کروماتوگرافی اسید مایکولیک موجود در دیواره مایکوباکتریوم اینتراسلولار

جدول شماره ۲- توزیع فراوانی نوع و تعداد گونه‌های مایکوباکتریوم جدا شده در این مطالعه

نوع ایزوله‌های بالینی			
مایکوباکتریوم آبه‌سوس	مایکوباکتریوم توبرکلوزیس	مایکوباکتریوم اینتراسلولار	مایکوباکتریوم فورتنیوم
تعداد ایزوله‌ها (درصد)	تعداد ایزوله‌ها (درصد)	تعداد ایزوله‌ها (درصد)	تعداد ایزوله‌ها (درصد)
۸ (۴۰)	۶ (۳۰)	۳ (۱۵)	۳ (۱۵)

پزشکی و در دسترس قرارگرفتن روش‌های مختلف، تشخیص و جداسازی مایکوباکتریوم‌های عامل سل سرعت و دقت بالایی به خود گرفته است. این نتایج منجر به شناسایی ایزوله‌های NTM

## بحث

در این مطالعه میزان فراوانی ایزوله‌های مایکوباکتریوم آبه‌سوس ۴۰ درصد بود. طی سالیان گذشته با پیشرفت علم

تست نمی‌باشد و این موضوع باعث افزایش دقت آن می‌گردد [۳۰]. در روش‌های دیگر نتایج حاصله با میزان مهارت فرد استفاده کننده از دستگاه ارتباط تنگاتنگی داشته؛ به‌صورتی که اگر افراد دارای مهارت بالایی نباشند، منجر به گزارش نتایج نادرست می‌گردد. همچنین، جهت تشخیص انواع گونه‌های مایکوباکتریوم روش HPLC در مقایسه با روش‌های دیگر از لحاظ اقتصادی مقرون به-صرفه تر می‌باشد [۳۱،۳۱]. با توجه به مطالب ذکر شده، می‌توان از روش HPLC به‌عنوان روشی مطمئن و با کارایی بالا جهت شناسایی انواع سویه‌های مایکوباکتریوم استفاده نمود.

#### نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج این مطالعه که از نمونه‌های جدا شده از افراد AFB مثبت گرفته شد، می‌توان گفت میزان بروز و شیوع NTM در ایران بالا است. پزشکان باید به این نکته واقف باشند که در افراد دارای علائم سل لزوماً مایکوباکتریوم توبرکلوزیس عامل بیماری آنها نبوده و ممکن است گونه‌های NTM عامل واقعی بیماری آنها باشد. شناسایی دقیق گونه‌های مایکوباکتریوم با روش HPLC در عفونت‌های ناشی از انواع NTM قبل از درمان لازم و ضروری می‌باشد؛ چراکه تشخیص نادرست باعث عدم موفقیت در درمان می‌گردد. در ایران نیاز است که مطالعات بیشتری جهت شناسایی عفونت‌های ناشی از این عوامل بیماری‌زای نادر صورت گیرد. از محدودیت‌های موجود در این مطالعه تعداد بیماران مورد بررسی بود. پیشنهاد می‌شود شیوع انواع NTM در سراسر کشور با روش‌های مختلف از جمله HPLC مورد بررسی قرار گرفته و نتایج مطالعات مورد نظر با همدیگر مقایسه شده و سپس مناسب-ترین و در دسترس‌ترین روش شناسایی انواع گونه‌های مایکوباکتریوم بومی ایران معرفی گردد.

#### تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از پایان نامه دانشجوی کارشناسی ارشد است. محققان و نویسندگان این مقاله بر خود لازم می‌دانند مراتب تقدیر و تشکر خود را از پرسنل آزمایشگاه مسعود و تمامی همکاران و محققانی که ما را در به ثمر رسیدن این پایان نامه یاری نمودند، اعلام نمایند.

#### References:

[1] Adigun R, Bhimji S. Tuberculosis. *StatPearls* 2017. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441916>.

مختلف در بیماران گردیده است [۲۲،۲۳]. طی سالیان اخیر سیر صعودی افزایش شناسایی و جداسازی NTM می‌تواند ناشی از افزایش دقت و بالارفتن آگاهی در شناخت اهمیت NTM به‌عنوان پاتوژن‌های انسانی باشد. همچنین، اصلاح و بهبود روش‌های تشخیصی و همچنین ازدیاد بیماران دچار نقص سیستم ایمنی، در افزایش شناسایی و شیوع NTM تاثیر به‌سزایی داشته است [۲۴،۲۵]. در مناطق جغرافیایی مختلف شیوع گونه‌های NTM دارای تفاوت‌های اساسی می‌باشد. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۷ در آمریکا انجام شد، نشان داده شد که بیشترین شیوع مربوط به مایکوباکتریوم آویوم و مایکوباکتریوم فوریتوم (به ترتیب ۶۴ و ۲۴ درصد) می‌باشد [۲۶]. در کشورهای آسیایی مانند هند، ژاپن، تایلند و سنگاپور بیشترین شیوع NTM، گونه‌های مایکوباکتریوم آویوم و مایکوباکتریوم کانزاسی می‌باشند [۲۷]. در کشورهای اروپایی به-ترتیب مایکوباکتریوم کانزاسی، مایکوباکتریوم گزنوی و مایکوباکتریوم مامونتس بیشترین فراوانی را در بین NTM دارند [۲۸]. طی مطالعه‌ای که در کاشان از سال ۲۰۱۵-۲۰۱۲ انجام شد، میزان شیوع NTM ۳/۸ درصد گزارش گردید [۲۹]. در مطالعه ما بیشترین ایزوله‌های مایکوباکتریوم جداسازی شده به ترتیب مایکوباکتریوم آبسه‌سوس، توبرکلوزیس و ایتراسولولار بود. همچنین، در این مطالعه بیشترین ایزوله‌های مایکوباکتریوم از بیماران دچار پنومونی عفونی و زخم‌های پوستی جداسازی گردید. در مقایسه با مطالعات دیگر از لحاظ بیماران مبتلا به مایکوباکتریوم‌ها، نتایج این مطالعه شبیه به مطالعه صورت گرفته در تایوان می‌باشد؛ ولی با این تفاوت که در تایوان بیشترین شیوع NTM مربوط به مایکوباکتریوم آویوم بود [۳] ولی در این مطالعه بیشترین شیوع مربوط به مایکوباکتریوم آبسه‌سوس بود. در این مطالعه جهت شناسایی گونه‌های مختلف مایکوباکتریوم از روش HPLC استفاده گردید. مزیت این روش نسبت به روش بیوشیمیایی این است که دارای حساسیت بالاتر، زمان کمتر و همچنین تشخیص راحت‌تر انواع سویه‌ها می‌باشد. در مقایسه با روش‌های مولکولی مانند PCR، سرعت انجام HPLC کمتر است، اما احتمال آلودگی جانبی نمونه‌ها پایین تر بوده و این باعث امر باعث افزایش دقت این روش می‌گردد. گاهی اوقات به دلیل آلودگی در روش‌های مولکولی نتایج مثبت کاذب گزارش می‌گردد و به همین منظور باید چندین مرتبه شناسایی سویه‌های مایکوباکتریوم تکرار شود، اما در روش HPLC نیاز به تکرار

[2] Ahmed I, Jabeen K, Hasan R. Identification of non-tuberculous mycobacteria isolated from clinical specimens at a tertiary care hospital: a cross-sectional study. *BMC Infect Dis* 2013; 13(1): 493.

- [3] Lai CC, Tan CK, Chou CH, Hsu HL, Liao CH, Huang YT, et al. Increasing Incidence of Nontuberculous Mycobacteria, Taiwan, 2000–2008. *Emerg Infect Dis* 2010; 16(2): 294-6.
- [4] Reznikov M, Robinson E. Serologically identical Battey mycobacteria from sputa of healthy piggery workers and lesions of pigs. *Aust Vet J* 1970; 46(12): 606-7.
- [5] Nasiri MJ, Dabiri H, Darban-Sarokhalil D, Hashemi Shahraki A. Prevalence of Non-Tuberculosis Mycobacterial Infections among Tuberculosis Suspects in Iran: Systematic Review and Meta-Analysis *PLoSone* 2015; 10(6): e0129073
- [6] Moore JE, Kruijshaar ME, Ormerod LP, Drobniewski F, Abubakar I. Increasing reports of non-tuberculous mycobacteria in England, Wales and Northern Ireland, 1995-2006. *BMC Infect Dis* 2010; 10: 612.
- [7] Henry MT, Inamdar L, O'Riordain D, Schweiger M, Watson JP. Nontuberculous mycobacteria in non-HIV patients: epidemiology, treatment and response. *Eur Respir J* 2004; 23(5): 741-6.
- [8] Piersimoni C, Scarparo C. Pulmonary infections associated with non-tuberculous mycobacteria in immunocompetent patients. *Lancet Infect Dis* 2008; 8(5): 323-34.
- [9] Tabarsi P, Baghaei P, Farnia P, Mansouri N, Chitsaz E, Sheikholeslam F, et al. Nontuberculous mycobacteria among patients who are suspected for multidrug-resistant tuberculosis—need for earlier identification of nontuberculosis mycobacteria. *Am J Med Sci* 2009; 337(3): 182-4.
- [10] Shojaei H, Heidarieh P, Hashemi A, Feizabadi MM, Naser AD. Species identification of neglected nontuberculous mycobacteria in a developing country. *Jpn J Infect Dis* 2011; 64(4): 265-71.
- [11] Khosravi Boroujeni AD, Hashemi Shahraki A, Hashemzadeh M, Sheini Mehrabzadeh R. Prevalence of nontuberculous mycobacteria in hospital waters of major cities of Khuzestan province, Iran. *Eur Respir J* 2016; 48(60).
- [12] Ding LW, Lai CC, Lee LN, Hsueh PR. Disease caused by non-tuberculous mycobacteria in a university hospital in Taiwan, 1997-2003. *Epidemiol Infect* 2006; 134(5): 1060-7.
- [13] Lai CC, Lee LN, Ding LW, Yu CJ, Hsueh PR, Yang PC. Emergence of disseminated infections due to nontuberculous mycobacteria in non-HIV-infected patients, including immunocompetent and immunocompromised patients in a university hospital in Taiwan. *J Infect* 2006; 53(2): 77-84.
- [14] Wagner D, van Ingen J, Adjemian J, Lange C, Prevots DR, Griffith D, et al. Annual prevalence and treatment estimates of nontuberculous mycobacterial pulmonary disease in Europe: A NTM-NET collaborative study. *Eur Respir J* 2014; 44(Suppl58): P1067.
- [15] Junior CAC, Torre CAL, Souza Figueiredo EE, Lilenbaum W, Paschoalin VMF. Application of High Performance Liquid Chromatography for Identification of Mycobacterium spp. *Tub Expand Know* 2015; 1: 152.
- [16] Furlanetto LV, Conte-Júnior CA, De Souza Figue EE, Duarte RS, Lilenbaum W, Silva JT, et al. HPLC Protocol for Identification of Mycobacterium spp. from Clinical Samples of Human and *Veterinary J Microbiol Res* 2014; 4(6): 193-200.
- [17] Mirzapour A, Alam AN, Bostanabadi SZ, Shahraki AH, Ebrahimi SA, Yousefi M. Identification of nontuberculous mycobacteria by high-performance liquid chromatography from patients in tehran. *Int J Mycobacteriol* 2016; 5 Suppl 1: S214.
- [18] Subedi S, Kong F, Jelfs P, Gray TJ, Xiao M, Sintchenko V, et al. 16S-23S Internal Transcribed Spacer Region PCR and Sequencer-Based Capillary Gel Electrophoresis has Potential as an Alternative to High Performance Liquid Chromatography for Identification of Slowly Growing Nontuberculous Mycobacteria. *PLoS one* 2016; 11(10): e0164138.
- [19] Murray SJ, Barrett A, Magee JG, Freeman R. Optimisation of acid fast smears for the direct detection of mycobacteria in clinical samples. *J Clin Pathol* 2003; 56(8): 613-5.
- [20] Butler WR, Jost KC Jr, Kilburn JO. Identification of mycobacteria by high-performance liquid chromatography. *J Clin Microbiol* 1991; 29(11): 2468-72.
- [21] Jeong J, Kim SR, Lee SH, Lim JH, Choi JI, Park JS, et al. The use of high performance liquid chromatography to speciate and characterize the epidemiology of mycobacteria. *Lab Med* 2011; 42(10): 612-7.
- [22] Lawn SD, Mwaba P, Bates M, Piatek A, Alexander H, Marais BJ, et al. Advances in tuberculosis diagnostics: the Xpert MTB/RIF assay and future prospects for a point-of-care test. *Lancet Infect Dis* 2013; 13(4): 349-61.
- [23] Jang MA, Koh WJ, Huh HJ, Kim SY, Jeon K, Ki CS, et al. Distribution of nontuberculous mycobacteria by multigene sequence-based typing and clinical significance of isolated strains. *J Clin Microbiol* 2014; 52(4): 1207-12.
- [24] Hsueh PR, Liu YC, So J, Liu CY, Yang PC, Luh KT. *Mycobacterium tuberculosis* in Taiwan. *J Infect* 2006; 52(2): 77-85.
- [25] Namkoong H, Kurashima A, Morimoto K, Hoshino Y, Hasegawa N, Ato M, et al. Epidemiology of pulmonary nontuberculous mycobacterial disease, Japan. *Emerg Infect Dis* 2016; 22(6): 1116-8.
- [26] Adjemian J, Frankland TB, Daida YG, Honda JR, Olivier KN, Zelazny A, et al. Epidemiology of Nontuberculous Mycobacterial Lung Disease and Tuberculosis, Hawaii, USA. *Emerg Infect Dis* 2017; 23(3): 439-47.
- [27] Kendall BA, Winthrop KL. Update on the Epidemiology of Pulmonary Nontuberculous Mycobacterial Infections. *Semin Respir Crit Care Med* 2013; 34(1): 87-94.

- [28] Prevots DR, Marras TK. Epidemiology of human pulmonary infection with nontuberculous mycobacteria: a review. *Clin Chest Med* 2015; 36(1): 13-34.
- [29] Zilae M, Firozeh F, Moniri R, Sehat M, Bidgoli Z. Prevalence of non-tuberculous mycobacteria isolated from patients referring to tuberculosis center of Kashan University of Medical Sciences. *SJKUMS* 2016; 21(5): 50-9.

- [30] Burman WJ, Reves RR. Review of false-positive cultures for Mycobacterium tuberculosis and recommendations for avoiding unnecessary treatment. *Clin Infect Dis* 2000; 31(6): 1390-95.
- [31] Jeong J, Kim SR, Chang CL, Lee SH. Distribution and Clinical Significance of Nontuberculous Mycobacteria Identified by High Performance Liquid Chromatography in Clinical Specimens. *Korean J Clin* 2008; 11(1): 34-42.