

مقاله پژوهشی

شناسایی مایکوباکتریوم آویوم کمپلکس با استفاده از روش ترادف یابی چندجایگاهی

مسعود کیخا^{۱*}

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب شناسی، گروه میکروب شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

اطلاعات مقاله

دریافت: ۱۳۹۶/۰۴/۳۰

پذیرش: ۱۳۹۶/۰۶/۲۰

*مؤلف مسئول

مسعود کیخا

ایران، اصفهان، دانشگاه علوم پزشکی
اصفهان، دانشکده پزشکی، گروه
میکروب شناسی پزشکی.

تلفن: ۰۹۳۸۶۸۳۶۴۲۵

پست الکترونیک:

masoudkeikha@outlook.com

چکیده

مقدمه: مایکوباکتریوم آویوم کمپلکس به صورت گسترده در محیط وجود دارند و عامل ایجادکننده بیماری در حیوانات، پرندگان و بیماران نقص سیستم ایمنی و افراد سالم می باشد. هدف از این مطالعه به کارگیری روش ترادف یابی چند جایگاهی (MLSA) در شناسایی مایکوباکتریوم آویوم کمپلکس بود.

روش کار: در این مطالعه، ابتدا توالی ژن های *hsp65* و *rpoB*، 16S rRNA برای ۸ زیرگونه از کمپلکس مایکوباکتریوم آویوم از بانک ژنی جمع آوری شد. سپس این توالی ها به وسیله نرم افزار clustalW2 هم ردیف شدند و بر اساس این ژن ها درخت های فیلوژنتیکی رسم شد. در نهایت، توسط نرم افزار CLC Main benchwork توالی مربوط به هر زیرگونه با هم ترکیب شد و درخت فیلوژنتیک با روش neighbor-joining رسم شد.

یافته ها: نتایج مبنی بر روش MLSA بهتر از مطالعه جداگانه ژن های *hsp65* و *rpoB*، 16S rRNA بود.

نتیجه گیری: روش MLSA ابزاری مفید برای شناسایی و افتراق زیرگونه های مایکوباکتریوم آویوم کمپلکس است.

کلید واژه ها: مایکوباکتریوم آویوم، ترادف یابی چند جایگاهی، *hsp65*، *gyrB*، 16S rRNA

Identification of *Mycobacterium avium* complex using Multi Locus Sequence Analysis

Original Article

Masoud Keikha^{1*}

¹ MSc Student in Microbiology, Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Abstract

Introduction: *Mycobacterium avium* complex (MAC) are ubiquitous in the environment which are the cause of disease in animals, birds and patients with immunodeficiency and healthy individual. The purpose of this study was to apply the multi-location sequencing method (MLSA) to identify *mycobacterium avium* complex.

Methods: In this study, the sequences of 16S rRNA, *rpoB* and *hsp65* genes were collected from the GenBank for 8 subtypes of *Mycobacterium avium* complex. Then, these sequences were aligned using clustalW2 software, and based on these genes, phylogenetic trees were constructed. Finally, CLC Main Benchwork Software combined the sequence for each sub-species, and the phylogenetic tree was constructed with a neighbor-joining technique.

Results: The results of the MLSA method were better than the separate study of 16S rRNA, *rpoB*, and *hsp65* genes.

Conclusion: The MLSA method is a useful tool for identifying and differentiating *Mycobacterium avium* complex subtypes.

Keywords: *Mycobacterium avium*, Multi-locus Sequence Analysis, 16S rRNA, *rpoB*, *hsp65*

Article Info

Received: Jul. 21, 2017
Accepted: Sep. 11, 2017

*Corresponding Author:

Masoud Keikha

Department of Medical
Microbiology, Faculty of
Medicine, Isfahan University
of Medical Sciences, Isfahan,
Iran

Tel: 09386836425

Email:
masoudkeikha@outlook.com

Vancouver referencing:

Keikha M. Identification of *Mycobacterium avium* complex using Multi Locus Sequence Analysis. *Journal of Jiroft University of Medical Sciences* 2017; 3(2): 86-94.

مقدمه

اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم آویوم (*Mycobacterium avium complex*) یکی از مهم‌ترین گروه از باکتری‌های ساکن منابع محیطی هستند که به‌عنوان پاتوژن طیف وسیعی از پرندگان، حیوانات و انسان‌ها شناخته می‌شوند. مایکوباکتریوم آویوم کمپلکس پس از اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (*Mycobacterium tuberculosis complex*)، دومین گروه از مایکوباکتریوم-های بیماری‌زای شایع انسانی می‌باشند که عفونت‌های فرصت‌طلبانه‌ای را در بیماران نقص سیستم ایمنی و عفونت‌های تنفسی را در افراد سالم و بیماران نقص سیستم ایمنی به وجود می‌آورند (۱). تاکنون مطالعات متعددی در زمینه جداسازی اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم آویوم از منابع محیطی از قبیل آب، خاک، پرندگان، دام‌ها گزارش شده است. با توجه به اینکه گزارشی از انتقال فرد به فرد در عفونت‌های مایکوباکتریوم آویوم کمپلکس وجود ندارد و همچنین گزارش‌های متعددی که در زمینه جداسازی اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم آویوم از منابع محیطی بیمارستان‌ها وجود دارد؛ لذا طبق شواهد موجود، منابع محیطی بیمارستانی منشأ اصلی عفونت‌های بیمارستانی مایکوباکتریوم آویوم کمپلکس به حساب می‌آیند؛ بیماران نقص سیستم ایمنی در هنگام استنشاق آئروسول‌ها، حمام و شرب آب به این میکروارگانیسم‌ها آلوده شده و در نتیجه به عفونت‌های مایکوباکتریوم آویوم کمپلکس مبتلا می‌شوند (۲). اشکال بالینی عفونت‌های اعضای مایکوباکتریوم آویوم کمپلکس بسته به عملکرد سیستم ایمنی میزبان متفاوت است؛ به‌طوری‌که عفونت‌های مایکوباکتریوم آویوم در افراد سالم بیشتر به‌صورت عفونت‌های تنفسی و لنفادنیت‌های گردنی می‌باشد، درحالی‌که در میزبانان نقص سیستم ایمنی بیشتر به شکل سیستمیک یا منتشره است (۳).

گونه‌های مایکوباکتریوم طبق طبقه‌بندی Runyon در چهار گروه قرار می‌گیرند؛ گروه اول متعلق به گونه‌های کند رشد فوتوکروموژن^۲ (تولید رنگ‌دانه در حضور نور)، گروه دوم شامل گونه‌های کند رشد اسکوتوکروموژن^۳ (تولید پیگمان در غیاب نور)، گروه سوم که اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم آویوم نیز به همین گروه تعلق دارند گونه‌های کند رشد نان کروموژن^۴ (عدم تولید رنگ‌دانه) هستند، در نهایت گروه پنجم که متعلق به مایکوباکتریوم‌های تند رشد می‌باشند (۲). ابتدا فرض بر این بود که کمپلکس مایکوباکتریوم آویوم شامل دو گونه مایکوباکتریوم آویوم و انتراسلولا است، اما با توجه به پیشرفت‌های علم مولکولی در سال ۱۹۹۰ مشخص شد که مایکوباکتریوم آویوم شامل سه زیرگونه: مایکوباکتریوم آویوم زیرگونه آویوم (*M. avium*)، مایکوباکتریوم آویوم زیرگونه پاراتوبرکلوزیس (*M. avium subsp. paratuberculosis*) و مایکوباکتریوم آویوم زیرگونه سیلواتیوم (*M. avium subsp. silvaticum*) می‌باشد. در سال ۲۰۰۲ چهارمین زیرگونه مایکوباکتریوم آویوم تحت عنوان مایکوباکتریوم آویوم زیرگونه هومینی سوئیس (*M. avium subsp. hominissuis*) شناسایی شد (۱). در سال‌های اخیر دو زیرگونه *Mycobacterium chimaera* (MAC-A) و *Mycobacterium colombiense* (MAC-X) نیز به اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم اضافه شده‌اند (۴). برخلاف سایر گونه‌های مایکوباکتریومی تا به امروز هیچ روش فنوتیپیک یا مولکولی استاندارد برای افتراق و طبقه‌بندی اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم آویوم تعیین نشده است؛ اکثر مایکوباکتریوم‌ها توسط تکنیک توالی یابی ژن‌های 16S rRNA و (ITS) 16S-23S rRNA شناسایی و افتراق داده

³. Scoto-chromogen

⁴. Non-chromogen

¹. Aerosol

². Photo-chromogen

با توجه به اینکه مطالعات شناسایی اعضای مایکوباکتریوم آویوم کمپلکس (MAC) به ما کمک می‌کند تا شناخت کامل تری را نسبت به این گروه از باکتری‌ها به دست آوریم، لذا این مطالعه با هدف شناسایی اعضای مایکوباکتریوم آویوم کمپلکس با استفاده از تکنیک MLSA و بر اساس جستجوی بیوانفورماتیک ژن‌های 16S rRNA، *rpoB* و *hsp65* صورت گرفت.

روش کار

دریافت توالی ژن‌های 16S rRNA، *rpoB* و *hsp65* این مطالعه ابتدا ۸ توالی از ژن‌های 16S rRNA، *rpoB* و *hsp65* متعلق به اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم آویوم که شامل ۲ توالی از مایکوباکتریوم آویوم زیرگونه آویوم (MAA)، مایکوباکتریوم آویوم زیرگونه پاراتوبرکلوزیس (MAP)، مایکوباکتریوم آویوم زیرگونه سیلواتیکوم (MAS) و مایکوباکتریوم آویوم زیرگونه اینتراسلولار (MAI) از بانک ژنی به آدرس www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide دریافت شد. لازم به ذکر است که با توجه به اینکه توالی ژن‌های *recA1* و *gyrB* برای تمامی اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم آویوم در بانک ژنی (Gene Bank) وجود نداشت، لذا این ژن‌ها از مطالعه حذف شدند که این خود نشان‌دهنده ضرورت انجام این گونه مطالعات را نشان می‌دهد.

هر یک از این توالی‌ها ابتدا به صورت جداگانه توسط نرم‌افزار ClustalW2 هم‌ردیف شدند. سپس درخت فیلوژنتیک توالی‌های مورد اشاره شده با استفاده از روش Neighbor joining، مدل K2P و عدد Replication Bootstrap= 100 توسط نرم‌افزار MEGA 7.0.26 رسم شد (شکل ۱-۳). برای افتراق بهتر اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم آویوم از تکنیک MLSA استفاده شد؛ برای این کار ابتدا به کمک نرم‌افزار CLC Main Workbench 5 توالی‌های مربوطه از ژن‌های 16S rRNA، *rpoB* و *hsp65* را با هم تلفیق

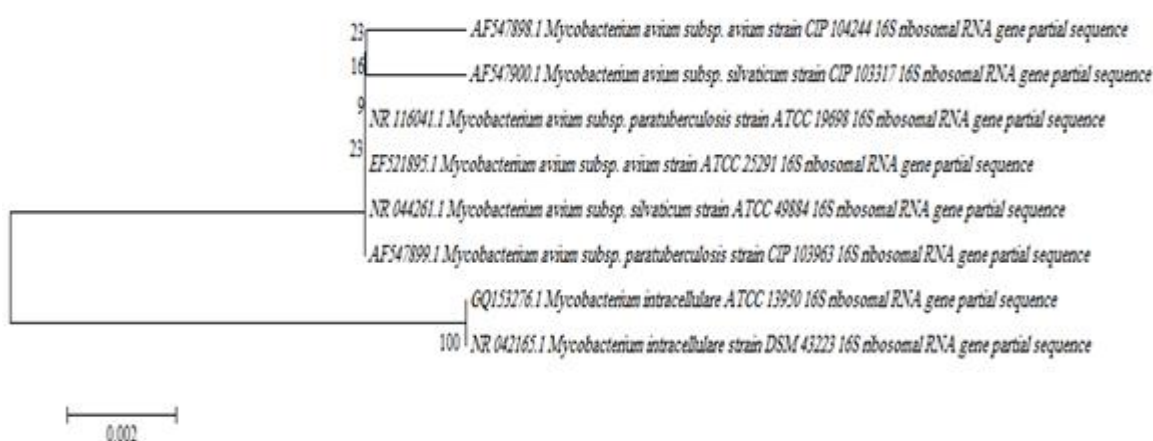
می‌شوند، درحالی‌که این ژن‌ها فقط توانایی افتراق کمپلکس مایکوباکتریوم آویوم از سایر مایکوباکتریوم‌ها را دارند (۵). بنا به مطالعاتی که در زمینه شناسایی و افتراق اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم آویوم صورت گرفته است، بررسی توالی ژن‌های *recA*، *gyrB*، *dnaJ*، *sodA* 32 KDa protein، *rpoB*، *hsp65*، gene ITS و حتی توانایی افتراق گونه‌های مایکوباکتریوم آویوم کمپلکس را دارند (۴،۱). دسته‌ای دیگر از مطالعات بر حضور و عدم حضور برخی توالی‌های الحاقی خاص (insertion sequences) تأکید دارند (۵). در میان این مطالعات نیز پراکندگی‌های زیادی وجود دارد، به عنوان مثال طبق برخی مطالعات IS900 تنها در اعضای مایکوباکتریوم آویوم زیرگونه پاراتوبرکلوزیس (MAP)، IS901 در اعضای مایکوباکتریوم آویوم زیرگونه آویوم (MAA) یا مایکوباکتریوم آویوم زیرگونه سیلواتیکوم (MAS) حضور دارد و در نهایت اعضای مایکوباکتریوم آویوم زیرگونه هومینی سوئیس (MAH) فاقد هریک از این ژن‌ها هستند (۵) و یا اینکه IS902 برای شناسایی مایکوباکتریوم آویوم زیرگونه سیلواتیکوم، IS1110 برای مایکوباکتریوم آویوم زیرگونه آویوم و IS1245 برای شناسایی و افتراق اعضای مایکوباکتریوم آویوم زیر گونه‌های آویوم و پاراتوبرکلوزیس کاربرد دارد؛ نتایج به دست آمده از این مطالعات نیز متفاوت است لذا مطالعه توالی الحاقی نیز نمی‌تواند به عنوان روش استاندارد طلایی شناسایی افتراق اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم آویوم شناخته شوند (۸-۶). با توجه به اینکه شناسایی هریک از اعضای مایکوباکتریوم آویوم کمپلکس بر اساس یک ژن امکان‌پذیر نیست و هر ژن گروه خاصی از اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم آویوم را شناسایی و افتراق می‌دهد، در نتیجه روش ترادف یابی چند جایگاهی (multi-locus sequence analysis) نتایج بهتری را ارائه می‌کند؛ در این تکنیک چند ژن به طور هم‌زمان بررسی می‌شوند (۵).

rpoB در مقایسه با سایر ژن‌ها دقیق‌تر و کامل‌تر بود؛ طبق این ژن اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم آویوم با عدد Bootstrap بالایی از هم تفکیک شده‌اند (شکل ۲)؛ اما با این حال هر ژن توانست فقط زیر گونه‌های خاصی از مایکوباکتریوم آویوم کمپلکس را تشخیص دهد. درخت فیلوژنتیک حاصل از ترکیب ژن‌های *rpoB*, 16S rRNA و *hsp65* توانست زیر گونه‌های مایکوباکتریوم آویوم، مایکوباکتریوم انتراسلولار و پاراتوبرکلوزیس را تشخیص دهد؛ طبق درخت فیلوژنتیک حاصل، مایکوباکتریوم آویوم و انتراسلولار در یک شاخه قرار دارند؛ همچنین زیر گونه‌های مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس و سیلوایکوم نیز یک گروه را تشکیل داده‌اند. به‌طور کلی درخت فیلوژنتیک حاصل از تلفیق ژن‌های *rpoB*, 16S rRNA و *hsp65* در مقایسه با روابط فیلوژنتیک جداگانه هر یک از این ژن‌ها عملکرد بهتری داشت و گونه‌های بیماری‌زای مهم انسانی چون مایکوباکتریوم آویوم، پاراتوبرکلوزیس و انتراسلولار را تشخیص داد، لذا می‌توان نتیجه‌گیری کرد که بررسی هم‌زمان چند ژن یا همان تکنیک MLSA ابزاری قدرتمند در تشخیص و افتراق باکتری‌ها می‌باشد.

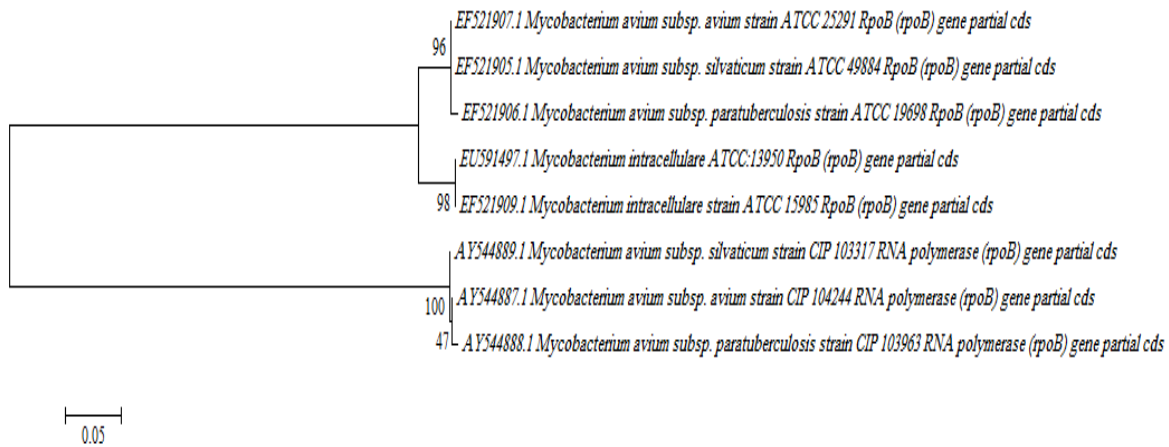
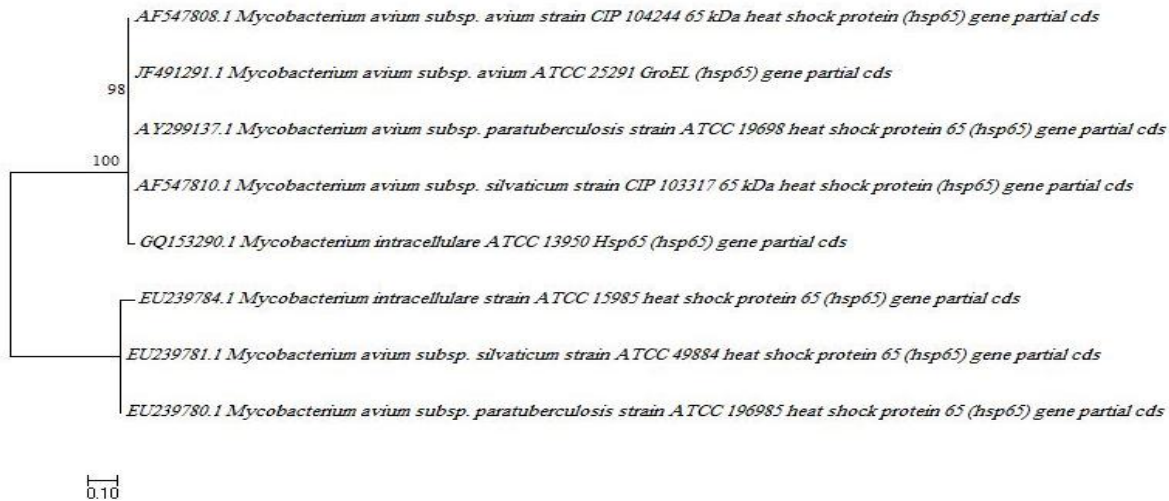
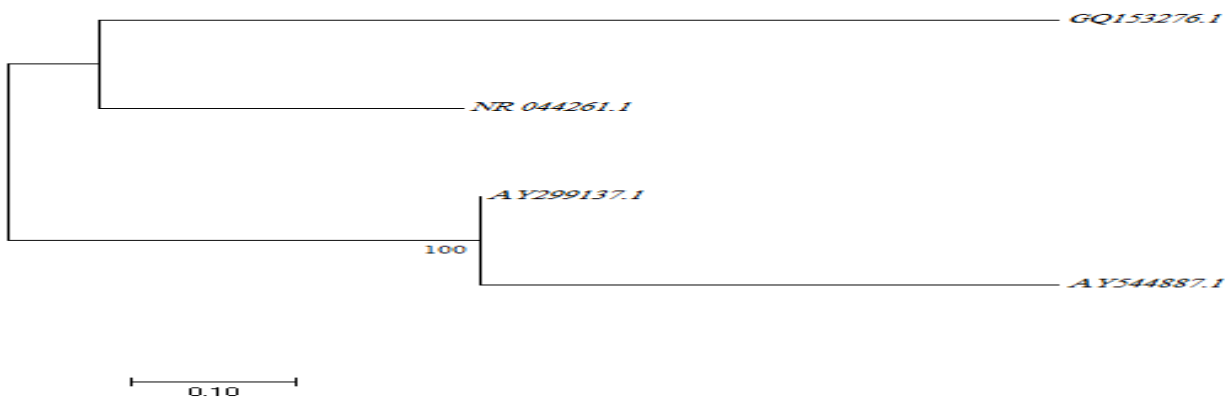
کرده و در نهایت قطعه‌ای به طول ۴۵۲۰-۵۷۲۵ به‌دست آمده سپس توالی به‌دست‌آمده به فرمت FASTA ذخیره شد و درخت فیلوژنتیکی بر اساس روش Neighbor joining توسط نرم‌افزار MEGA رسم شد (شکل ۴) (۹).

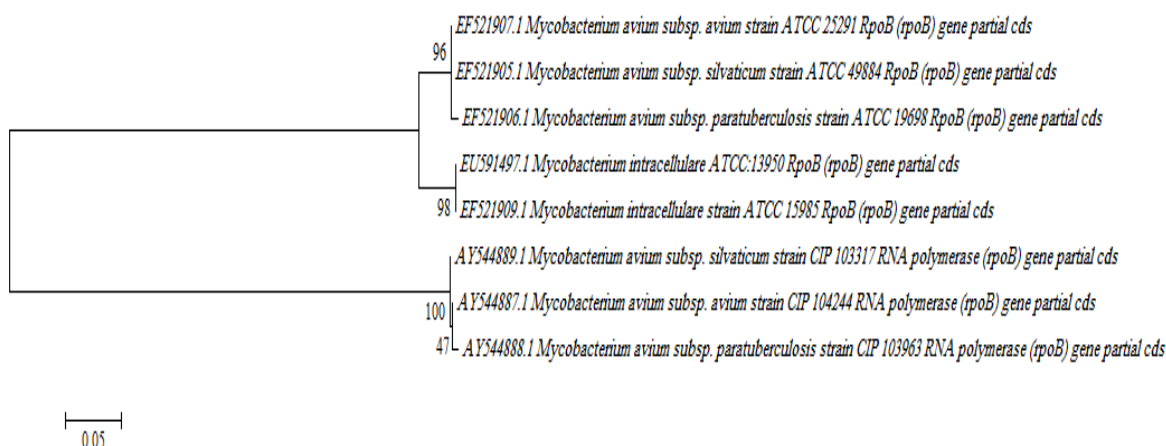
یافته‌ها

توالی ژن 16S RNA هر یک از این گونه‌ها به لحاظ وجود First signature مایکوباکتریوم‌ها در موقعیت‌های: ۷۰-۹۸ (A-T)، ۲۹۳-۳۰۴ (G-T)، ۳۰۷ (C)، ۳۲۸ (T)، ۶۱۴-۶۲۶ (A-T)، ۶۳۱ (G)، ۶۶۱-۷۴۴ (G-C)، ۸۲۴-۸۷۶ (T-A)، ۸۲۵-۸۷۵ (A-T)، ۸۴۳ (C) و ۱۱۲۲-۱۱۵۱ (A-T) بررسی و تأیید شدند (۱۰). درخت‌های فیلوژنتیک ترسیم شده بر اساس ژن‌های *rpoB*, 16S rRNA و *hsp65* هر کدام گونه‌های خاصی از کمپلکس مایکوباکتریوم آویوم را شناسایی و افتراق می‌دهند؛ در این میان ژن 16S rRNA گونه‌های مایکوباکتریوم آویوم و سیلوایکوم را تشخیص و افتراق داد، ژن *rpoB* تنها گونه مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس و ژن *hsp65* توانست گونه‌های مایکوباکتریوم انتراسلولار و پاراتوبرکلوزیس را تشخیص دهد (اشکال ۳-۱). روابط فیلوژنتیک بر اساس ژن



شکل ۱: درخت فیلوژنتیک بر اساس ژن 16S rRNA

شکل ۲: درخت فیلوژنتیک بر اساس ژن *rpoB*شکل ۳: درخت فیلوژنتیک بر اساس ژن *hsp65*



شکل ۴: درخت فیلوژنتیک بر اساس ترکیب ژنهای 16S rRNA، *rpoB* و *hsp65*

در این شکل GQ153276.1: مایکوباکتریوم انتراسلولا، NR044261.1: مایکوباکتریوم آویوم، AY299137.1: مایکوباکتریوم سیلواتیکوم و AY544887.1: مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس می باشد

خسارت های مالی زیادی به بار می آورد و یا مایکوباکتریوم آویوم (MAA) و مایکوباکتریوم سیلواتیکوم (MAS) که علاوه بر بیماری های انسانی، از مهم ترین عامل سل پرندگان محسوب می شوند (۱۲).

شناسایی این گروه از باکتری ها به جهت تجویز رژیم درمانی مناسب و همچنین انجام مطالعات اپیدمیولوژیک مهم است (۱۱-۱۲). امروزه روش های مولکولی متعددی در زمینه شناسایی مولکولی اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم آویوم معرفی شده است که می توان به روش هایی همچون: Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)، تکنیک های هیبریدیزاسیون، توالی یابی ژن های مختلف، MIRU-VNTR و Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) اشاره کرد (۱۳، ۸). ژن هایی که در این مطالعات استفاده می شوند، اغلب ژن های خانه دار (House keeping genes) و توالی الحاقی هستند (۴-۵). مطالعه حاضر بررسی بیوانفورماتیکی در زمینه شناسایی اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم آویوم بود. در این مطالعه مشخص شد که بررسی هم زمان ژن های *hsp65* و *rpoB*، 16S rRNA در مقایسه با مطالعه جدا گانه ژن ها نتایج بهتری را در بر می گیرد.

بحث

اعضای مایکوباکتریوم آویوم کمپلکس مشابه سایر مایکوباکتریوم ها به صورت ساپروفیت در منابع محیطی زندگی می کنند؛ این گروه از باکتری ها قادرند در سیستم های توزیع آب رسانی بیوفیلم تشکیل داده و در نتیجه در برابر مواد ضد میکروبی مقاوم شوند. با توجه به اینکه شواهد زیادی وجود دارد که نشان می دهد آب، خاک و سایر منابع محیطی بیمارستان ها حاوی اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم آویوم هستند، لذا می توان نتیجه گرفت که این منابع به عنوان منبع اصلی انتقال عفونت به بیماران به حساب می آیند. با توجه به اینکه اکثر مارکر های میکروبیولوژیک ارزشی کیفیت آب قادر به شناسایی مایکوباکتریوم ها نیستند لذا این پدیده مورد غفلت قرار می گیرد (۱۱-۱۲). هر کدام از اعضای مایکوباکتریوم آویوم کمپلکس قادرند عفونت هایی را در انسان و حیوانات پدید آورند، به عنوان مثال مایکوباکتریوم هومینی سوئیس (MAH) که عامل عفونت های تنفسی مزمن و لنفادنیت در انسان ها و خوک می باشد، مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس (MAP) که عامل اصلی بیماری جونز و اسهال مزمن گرانولوماتوز در حیوانات است و سالانه

مایکوباکتریوم آویوم می شود (۵، ۱۵). در مطالعه ما نیز مشخص شد که توالی تلفیق شده از ژن های 16S rRNA، *rpoB* و *hsp65* در مقایسه با توالی جداگانه هر یک از این ژن ها قدرت تشخیص و افتراق اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم آویوم را بهبود بخشید.

نتیجه گیری

بر اساس این مطالعه، هر چند شناسایی و افتراق اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم آویوم به دلیل شباهت ژنتیکی درون گونه ای بالا بسیار دشوار است و تا به امروز روش استاندارد طلایی برای افتراق اعضای این خانواده معرفی نشده است؛ اما با این وجود، تکنیک هایی از قبیل ترادف یابی چند جایگاهی (MLSA) شناسایی و افتراق این گونه ها را بهبود بخشیده و به عنوان یکی از مهم ترین روش های شناسایی و تفریق اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم آویوم شناخته می شود.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از زحمات همکاران دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تشکر و قدردانی به عمل می آید.

تعارض منافع

هیچ تعارض منافی توسط نویسندگان بیان نشده است.

References

1. Turenne CY, Semret M, Cousins DV, Collins DM, Behr MA. Sequencing of *hsp65* distinguishes among subsets of the *Mycobacterium avium* complex. *Journal of Clinical Microbiology*. 2006;44(2):433-40.
2. Field SK, Fisher D, Cowie RL. *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease in patients without HIV infection. *CHEST Journal*. 2004;126(2):566-81.
3. Parvandar-Asadollahi K, Mosavari N, Mayahi M. Genotyping of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* isolates from naturally infected lofts of domestic pigeons in Ahvaz by IS901 RFLP. *Iranian Journal of Microbiology*. 2015;7(5):260-4.
4. Salah IB, Adekambi T, Raoult D, Drancourt M. *rpoB* sequence-based identification of *Mycobacterium avium* complex species. *Microbiology*. 2008;154(12):3715-23.
5. Kolb J, Hillemann D, Möbius P, Reetz J, Lahiri A, Lewin A, et al. Genetic characterization of German *Mycobacterium avium* strains isolated from different hosts and specimens by multilocus sequence typing. *International Journal of Medical Microbiology*. 2014;304(8):941-8.
6. Englund S, Bölske G, Johansson K-E. An IS900-like sequence found in a *Mycobacterium* sp. other than *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *FEMS Microbiology Letters*. 2002;209(2):267-71.

Turenne و همکارانش طی مطالعات خود دریافتند که انتهای 3' ژن *hsp65* یکی از مفیدترین ابزار برای افتراق کمپلکس مایکوباکتریوم آویوم کمپلکس می باشد (۱). در مطالعه ما مشخص شد که ژن *rpoB* نسبت به ژن *hsp65* بهتر عمل می کند. همچنین طبق مطالعات Salah و همکارانش بر روی ایزوله های بالینی مایکوباکتریوم آویوم کمپلکس مشخص شد که ژن *rpoB* در مقایسه با ژن های 16S rRNA و *hsp65* بهتر عمل می کند (۴). طبق مطالعات Park و همکارانش در زمینه شناسایی مولکولی مایکوباکتریوم انتراسلولار می توان نتیجه گیری کرد که Internal Transcribe Spacer-1 (ITS1) در مقایسه با ژن های *hsp65* و 16S rRNA بهتر عمل می کند؛ طبق مطالعه ما قطعه ۴۴۱ جفت بازی از ژن *hsp65* قادر بود گونه های مایکوباکتریوم انتراسلولار را شناسایی کند (۱۴). با جستجو در پایگاه های اطلاعاتی موجود می توان نتیجه گرفت که تاکنون مطالعات محدودی در زمینه شناسایی زیر گونه های مایکوباکتریوم آویوم کمپلکس به روش MLSA انجام شده که این خود لزوم چنین مطالعاتی را بازگو می کند؛ اما طبق مطالعه Kolb و همکارانش در خصوص شناسایی اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم آویوم کمپلکس به روش MLST برخی توالی الحاقی و همچنین مطالعه Cayrou و همکارانش توسط تکنیک Multi-spacer sequence (MST) می توان دریافت که بررسی هم زمان چند ژن موجب افزایش قدرت تشخیص و تفریق اعضای کمپلکس

7. Johansen TB, Dønne B, Jensen MR, Olsen I. Distribution of IS1311 and IS1245 in *Mycobacterium avium* subspecies revisited. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005;43(5):2500-2.
8. Guerrero C, Bernasconi C, Burki D, Bodmer T, Telenti A. A novel insertion element from *Mycobacterium avium*, IS1245, is a specific target for analysis of strain relatedness. *Journal of Clinical Microbiology*. 1995;33(2):304-7.
9. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*. 2007;24(8):1596-9.
10. Azadi D, Shojaei H, Pourchangiz M, Dibaj R, Davarpanah M, Naser AD, et al. Species diversity and molecular characterization of nontuberculous mycobacteria in hospital water system of a developing country, Iran. *Microbial Pathogenesis*. 2016;100:62-9.
11. Wallace RJ, Iakhiaeva E, Williams MD, Brown-Elliott BA, Vasireddy S, Vasireddy R, et al. Absence of *Mycobacterium intracellulare* and presence of *Mycobacterium chimaera* in household water and biofilm samples of patients in the United States with *Mycobacterium avium* complex respiratory disease. *Journal of Clinical Microbiology*. 2013;51(6):1747-52.
12. Nishiuchi Y, Iwamoto T, Maruyama F. infection Sources of a Common Non-tuberculous Mycobacterial Pathogen, *Mycobacterium avium* Complex. *Frontiers in Medicine*. 2017;4:1-17.
13. Romano M, Amadio A, Bigi F, Klepp L, Etchehoury I, Llana MN, et al. Further analysis of VNTR and MIRU in the genome of *Mycobacterium avium* complex, and application to molecular epidemiology of isolates from South America. *Veterinary Microbiology*. 2005;110(3):221-37.
14. Park J-H, Shim T-S, Lee S-A, Lee H, Lee I-K, Kim K, et al. Molecular characterization of *Mycobacterium intracellulare*-related strains based on the sequence analysis of hsp65, internal transcribed spacer and 16S rRNA genes. *Journal of Medical Microbiology*. 2010;59(9):1037-43.
15. Cayrou C, Turenne C, Behr MA, Drancourt M. Genotyping of *Mycobacterium avium* complex organisms using multispacer sequence typing. *Microbiology*. 2010;156(3):687-94.