مجله سلامت و بهداشت

دوره چهارم، شماره چهارم، زمستان ۱۳۹۲، صفحات ۳۲۱ تا ۳۲۹

جداسازی و شناسایی مایکوباکتریوم‌های سریع‌الرشد از آب و خاک در رباط‌کریم با استفاده از روش PCR- RFLP

ساناز رهیده[1*]، پریسا فرنیا[2]، مجتبی داربوی[3]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات فارس، گروه میکروبیولوژی، فارس، ایران ۲. دانشیار میکروبیولوژی پزشکی، مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی، پژوهشکده سل و بیماری های ریوی، مرکز آموزشی، پژوهشی و درمانی سل و بیماری های ریوی بیمارستان مسیح دانشوری، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی، تهران، ایران ۳. دکترای ژنتیک مولکولی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم وتحقیقات فارس، گروه میکروبیولوژی، فارس، ایران

* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۹۱۲۲۵۰۶۴۸۵ فکس: ۰۲۱۲۶۱۰۹۵۰۵ ایمیل: sanaz.raha83@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: مایکوباکتریوم‌های غیرتوبرکلوزیس خصوصاً مایکوباکتریوم‌های سریع الرشد پاتوژن‌های محیطی فرصت طلبی هستند که نقش آنها در بیماری‌های انسان به‌طور فزاینده شناخته شده است و انسان‌ها می‌توانند از منابع مختلف محیطی خصوصاً آب و خاک دچار عفونت شوند. باتوجه به انتشار جهانی مایکوباکتریوم‌های سریع‌الرشد، تشخیص و شناسایی آنها هم از نظر کلینیکی و هم از نظر مطالعات اپیدمیولوژیک بسیار حائز اهمیت است. در این مطالعه فراوانی مایکوباکتریوم‌های سریع‌الرشد از منابع آب و خاک در مناطق مختلف شهر رباط کریم با استفاده از روش PCR-RFLP با مورد هدف قرار دادن ژن‌های hsp65 و 16S-23S Rrna مورد بررسی قرارگرفت.

روش کار: در مطالعه حاضر ٤٥٤ نمونه آب و خاک از مناطق مختلف شهر رباط کریم جمع‌آوری گردید. بعد از استخراج DNA، قطعه hsp65 با استفاده از روش PCR-RFLP تکثیر و سپس محصولات PCR با دو آنزیم محدودکننده BsteII و HaeIII هضم گردید و قطعه 16S-23SRNA نیز تکثیر و محصولات PCR با دو آنزیم محدودکننده HaeIII, CfoI هضم گردید و آنالیز بر اساس الکتروفورز بر روی ژل پلی آکریل آمید انجام شد.

یافته ها: بر اساس کشت و مشاهده میکروسکوپی، ٤٩ نمونه (۲۱/۵٪) از ۲۲۷ نمونه خاک و ١٤٤ نمونه (۶۳٪) از ۲۲۷ نمونه آب از نظر مایکوباکتریوم مثبت گردید و با استفاده از روش PCR-RFLP، ۷ نمونه خاک و ۲۹ نمونه آب دارای مایکوباکتریوم سریع‌الرشد بودند و نتایج حاصل از روش مولکولار با نتایج حاصل از کشت مطابقت کامل داشته و مایکوباکتریوم فورتیتوم با فراوانی ۲۷/۸ ٪، مایکوباکتریوم سریع الرشد عمده در مجموع نمونه‌های آب و خاک بود.

نتیجه گیری: مایکوباکتریوم فورتیتوم عمده‌ترین مایکوباکتریوم سریع الرشد جدا شده در مجموع نمونه‌های آب و خاک در منطقه رباط کریم می‌باشد.

واژه های کلیدی: مایکوباکتریوم سریع الرشد، PCR-RFLP، ژن hsp65، ژن 16S-23S rRNA

دریافت: ۹۲/۵/۲ **پذیرش: ۹۲/۸/۵**

مقدمه

مایکوباکتریوم‌های آتیپیک در سال ۱۹۵۹ توسط رانیون براساس سرعت رشد و تولید رنگدانه به ٤ گروه دسته‌بندی شدند. گروه چهارم، مایکوباکتریوم‌های سریع‌الرشد هستند که بر روی محیط کشت در کمتر از ۷ روز کلنی تشکیل می‌دهند (۱). مایکوباکتریوم‌های سریع‌الرشد در منابع محیطی مختلف از قبیل آب و خاک یافت می‌شوند. در

سیستم‌های آبی، مایکوباکتریوم‌های سریع‌الرشد می‌توانند با تشکیل بیوفیلم و تعامل با پروتوزوآها بقاء یابند. حضور و تنوع گونه‌ای مایکوباکتریوم‌های سریع‌الرشد درآب تحت تاثیر حرارت، pH، کیفیت شیمیایی آب و همچنین دسترسی به مواد مغذی قرار می‌گیرد. با وجود حضور فراگیر آنها در منابع محیطی، راه انتقال اصلی مایکوباکتریوم‌های سریع‌الرشد به انسان و به دنبال آن بیماری‌های کلینیکی به‌ندرت اثبات شده است. در حالی که شیوع آنها در نتیجه منابع محیطی آلوده گزارش شده است، اما حضور تصادفی آنها در نمونه‌های کلینیکی را نیز نمی‌توان نادیده گرفت (۲). از آنجا که مایکوباکتریوم‌های سریع‌الرشد به‌عنوان پاتوژن‌هایی برای انسان‌ها و حیوانات اهلی آشکار شده‌اند، شناسایی منابع محیطی، مخزن، میزان فراوانی و تداوم آنها در اکوسیستم‌ها بسیار با اهمیت است (۳). از بین بردن مایکوباکتریوم‌های سریع‌الرشد با روش‌های آلودگی زدایی معمول بسیار سخت است و در مقایسه با کلی فرم‌ها نسبتاً به مواد ضد عفونی استاندارد مقاوم‌ترند. در سیستم‌های آب گرم، مایکوباکتریوم‌های ترموفیلیک فراوانی ظهور و بقاء می‌یابند. در بعضی موارد دمای تا ۷۰ درجه سانتی‌گراد برای جلوگیری از این ارگانیسم‌ها نیاز است. در سیستم‌های آب سرد مایکوباکتریوم فورتیتوم، مایکوباکتریوم چلونی، مایکوباکتریوم آبسسوس و مایکوباکتریوم موکوژنیکوم یافت می‌شوند (٤). روش‌های مختلفی بر اساس تکثیر ژن‌های مختلف برای تشخیص سریع و شناسایی گونه‌های مایکوباکتریوم استفاده می‌شود. از میان آنها، تکثیر ژن و هضم با آنزیم‌های محدود کننده با مورد هدف قرار دادن ژن‌های hsp65 و 16S-23S rRNA internal transcribed spacer (ITS) ترجیح داده می‌شود (۵). تکثیر و آنالیز پترن محصولات حاصل از هضم بااندونوکلئازهای محدود کننده از ژن ۶۵ کیلو دالتونی hsp، برای شناسایی مایکوباکتریوم‌های فرصت طلب محیطی از هر دو نمونه بیمار و محیطی به صورت مفید، اثبات گردیده است و برای شناسایی هر دو مایکوباکتریوم‌های کند رشد و سریع‌الرشد استفاده می‌گردد (۶). بنابراین با توجه به اهمیت مایکوباکتریوم‌های سریع‌الرشد و ارتباط آنها با ایجاد بیماری در انسان، تحقیق حاضر به وجود مایکوباکتریوم‌های غیرتوبرکلوزیس در آب و خاک معطوف گردیده تا بتوان ضمن جداسازی آنها از آب و خاک به گونه آنها نیز پی برد.

روش کار

نوع مطالعه کاربردی- عملی بوده و برای این مطالعه ٤٥٤ نمونه آب و خاک شامل ۲۲۷ نمونه آب و ۲۲۷ نمونه خاک از مناطق مختلف رباط کریم تهیه شد. نمونه‌های خاک از عمق ۵ سانتی‌متری خاک، ترجیحاً از خاک مرطوب جمع‌آوری شد. نمونه‌های آب از آب‌های سطحی در مناطق مختلف جمع‌آوری گردید. پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه، آلودگی زدایی با روش پتروف ٤٪ صورت گرفت و ایزوله ها بر روی ۳ محیط کشت لوین اشتاین جانسن[1] کشت داده شد و در ۳ دمای مختلف یعنی دمای اتاق، ٤٠ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرارداده شد و همچنین پس از رنگ آمیزی زیل- نیلسن تهیه اسمیر برای مشاهده میکروسکوپی صورت گرفت. برای استخراج DNA، بعد از Heat kill شدن، تیمار با سوکروز صورت گرفت. روش PCR-RFLP در طی دو مرحله، مرحله اول و مرحله دوم[2] با استفاده از ژن hsp65 انجام می‌گیرد که در مرحله اول ناحیه اختصاصی با استفاده از دو پرایمر

TB15(5-CGT AYG ACG AAG AGG CCC GT-3)
TB17(5-WAS GGR TCC TCS AGG ACS GC-3)

[1] Lowenstein Jensen
[2] Nested PCR

تکثیر گردیده و در مخلوط ۵۰ میکرولیتر PCR ، ۱ میکرولیتر dntp، ۱/۵ میکرولیتر Mgcl2، ۰/۲۵ میکرولیتر Taq polymerase، ۲/۵ میکرولیتر (٪۱) DMSO، ۵ میکرولیتر PCR Buffer و ۰/۲ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای ٤ پیکومول TB15 و TB17 استفاده شد و ۵ میکرولیتر از DNA الگو به مخلوط اضافه شد و سیکل PCR به‌صورت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه و سپس ۳۰ سیکل شامل ۹۵ درجه به مدت ۲۰ ثانیه و ۵۶ درجه به مدت ۱ دقیقه و ۷۲ درجه به مدت ٤۰ ثانیه و در نهایت ۱ دور در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه بود و محصولات حاصل از PCR با استفاده از

TB11(5-ACC AAC GAT GGT GTG TCC AT-3)

TB12(5-CTT GTC GAA CCG CAT ACC CT-3)

مجدد تکثیر یافته و در صورت مشاهده قطعه ٤٤۱ جفت بازی با استفاده از پرایمر TB بر روی ژل آگارز ۲٪، هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم‌های محدود کننده BstEII و HaeIII انجام گرفت و محصولات PCR به‌دست آمده روی ژل آکریل آمید، الکتروفورز گردید و رنگ‌آمیزی توسط اتیدیوم بروماید انجام شد (۷). آنالیز قطعات حاصل از هضم با استفاده از سایت اینترنتی app.chuv.ch/parasite/index.html انجام گرفت (جدول ۱).

اکثر مایکوباکتریوم‌های غیرتوبرکلوزیس با استفاده از ژن hsp65 قابل شناسایی می‌باشد. در صورتی که قابل شناسایی نباشند ازدو پرایمر

sp1(5- ACC TCC TTT CTA AGG AGC ACC-3)

sp2(5-GATGCT CGC AAC CAC TAT CCA-3)

برای ژن 16S-23SrRNA استفاده گردیده و سپس محصولات حاصل از PCR که قطعه ۲۰۰ تا ۳۰۰ جفت بازی می‌باشد با دو آنزیم HaeIII,CfoI هضم گردیده و سپس بر روی ژل آکریل آمید الکتروفورز می‌گردد (۸) (جدول ۲).

جدول ۱. اندازه قطعات حاصل ازhsp65 PCR بعد از هضم با HaeIII و BsteII

مایکوباکتریوم سریع‌الرشد	HaeIII	BsteII
Mycobacterium senegalenseI	۱٤۰,۱۲۵,۶۰,۵۵	۲۳۰,۱۲۰,۸۵
Mycobacterium peregrinum	۱٤۵,۱٤۰,۱۰۰,۶۰	۲۳۰,۱۳۰,۸۵
Mycobacterium abscessus	۱٤۰,۷۰,۶۰,۵۰	۲۳۵,۲۱۰
Mycobacterium conceptionense	۱٤۰,۱۲۵,۶۰,۵۵	۲۳۰,۱۲۰,۸۵
Mycobacterium parafortuitum II	۱۷۰,۱٤۰	۳۲۰,۱۱۵
Mycobacterium obuense	۱٤۰,۹۰,۶۰	۲۳۵,۲۱۰
Mycobacterium poriferae	۱۶۰,۹۵,۵۰	۲۳۵,۲۱۰
Mycobacterium mucogenicum	۱٤۰,۶۵,۶۰	۳۲۰,۱۳۰
Mycobacterium aurum	۱۷۵,۸۰	۲۳۵,۱۳۰,۸۵

جدول ۲. اندازه قطعات حاصل ازPCR 16s-23srRNA بعد از هضم با HaeIII و CfoI

مایکوباکتریوم سریع‌الرشد	CfoI	HaeIII	محصولPCR
Mycobacterium abscessus	عدم هضم	عدم هضم	۲۵۷
Mycobacterium senegalense	۱۷٤,۷۲	۱٤۸,۱۰۹	۲۵۷
Mycobacterium fortuitum	عدم هضم	۱٤۸,۱۰۹	۲۵۷
Mycobacterium parafortuitum	عدم هضم	۱۱۵,۵۰,۳۰	۳۱۰

یافته ها

گروه مورد مطالعه از نظر کشت (زمان رشد کلنی، تعداد کلنی، رنگ کلنی، دمای رشد) و مشاهده میکروسکوپی بررسی شدند.

از ۲۲۷ نمونه خاک جمع‌آوری شده از مناطق مختلف شهر رباط کریم، بر اساس کشت و مشاهده میکروسکوپی ٤۹ نمونه از نظر مایکوباکتریوم مثبت گردید. ۷ نمونه خاک از نظر مایکوباکتریوم‌های

سریع‌الرشد مثبت گردید. از ۲۲۷ نمونه آب جمع‌آوری شده، ۱٤٤ نمونه از نظر مایکوباکتریوم بر اساس کشت و مشاهده میکروسکوپی مثبت گردید و از این تعداد ۲۹ نمونه مایکوباکتریوم سریع‌الرشد بودند.

تشخیص گونه‌های مختلف مایکوباکتریوم با استفاده از روش PCR-RFLP

گروه مورد مطالعه از نظر کشت (زمان رشد کلنی، تعداد کلنی، رنگ کلنی، دمای رشد) و مشاهده میکروسکوپی بررسی شدند.

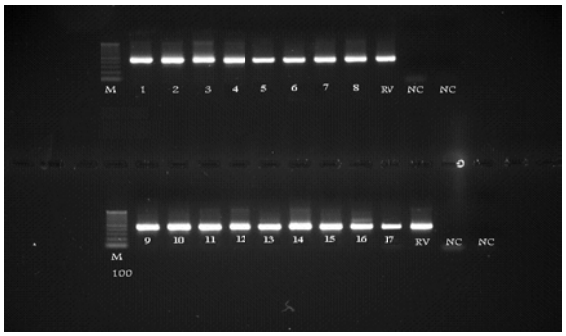
از ۲۲۷ نمونه خاک جمع‌آوری شده از مناطق مختلف شهر رباط کریم، بر اساس کشت و مشاهده میکروسکوپی ٤۹ نمونه از نظر مایکوباکتریوم مثبت گردید. ۷ نمونه خاک از نظر مایکوباکتریوم‌های سریع‌الرشد مثبت گردید. از ۲۲۷ نمونه آب جمع‌آوری شده، ۱٤٤ نمونه از نظر مایکوباکتریوم بر اساس کشت و مشاهده میکروسکوپی مثبت گردید و از این تعداد ۲۹ نمونه مایکوباکتریوم سریع‌الرشد بودند.

تشخیص گونه‌های مختلف مایکوباکتریوم با استفاده از روش PCR-RFLP:

از مجموع ٤۹ نمونه خاک مثبت از نظر مایکوباکتریوم، مایکوباکتریوم سریع‌الرشد (۱٤/۳٪) در ۷ نمونه یافت شد که شامل ۲ نمونه مایکوباکتریوم سنگالنس[1] (۲۸/۶٪)، ۱ نمونه مایکوباکتریوم فورتیتوم[2](۱٤/۳٪)، ۱ نمونه مایکوباکتریوم پرگرینوم[3] (۱٤/۳٪)، ۱ نمونه مایکوباکتریوم موکوژنیکوم[4] (۱٤.۳ ٪)، ۱ نمونه مایکوباکتریوم آئوروم[5] (۱٤/۳ ٪)، ۱ نمونه مایکوباکتریوم پارافورتیتوم[6] (۱٤/۳ ٪) و سایر نمونه‌ها (۸۵/۷٪) کند رشد بودند.

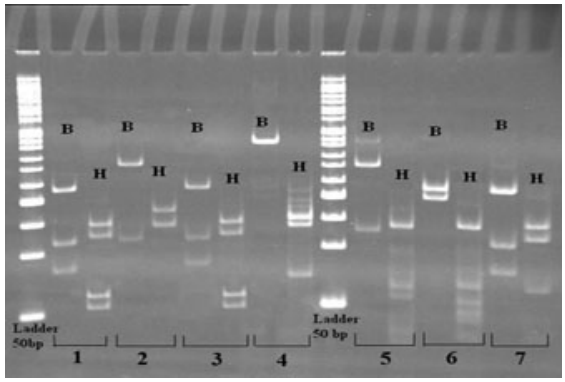
از مجموع ۱٤٤ نمونه آب مثبت از نظر مایکوباکتریوم، مایکوباکتریوم‌های سریع‌الرشد (۲۰/۲٪) در ۲۹ نمونه آب یافت شد که شامل ۹ مورد مایکوباکتریوم فورتیتوم (۳۱٪)، ۷ مورد مایکوباکتریوم سنگالنس (۲٤٪)، ٤ مورد مایکوباکتریوم پارافورتیتوم (۱۳/۷٪)، ۳ مورد مایکوباکتریوم کانسپتیوننس (۱۰/۳٪)، ۲ مورد مایکوباکتریوم پرگرینوم (۶/۸٪)، ۱ مورد مایکوباکتریوم آبسسوس[7] (۳/٤٪)، ۱ مورد مایکوباکتریوم اوبوانس[8] (۳/٤٪)، ۱ مورد مایکوباکتریوم پوریفرا[9] (۳/٤٪)، ۱ نمونه مایکوباکتریوم موکوژنیکوم[10] (۳/٤٪) و سایر نمونه‌ها (۷۹/۸٪) کند رشد بودند.

در شکل ۱ نتایج حاصل از hsp65PCR بر روی ژل آگارز نشان داده شده است. در شکل ۲ الگوی حاصل از هضم محصولات hsp65 تعدادی از مایکوباکتریوم‌های سریع‌الرشد با استفاده از BsteII و HaeIII نشان داده شده است. در شکل ۳ الگوی حاصل از هضم محصولات 16S-23S rRNA تعدادی از مایکوباکتریوم‌های سریع‌الرشد با استفاده از CfoI و HaeIII نشان داده شده است.



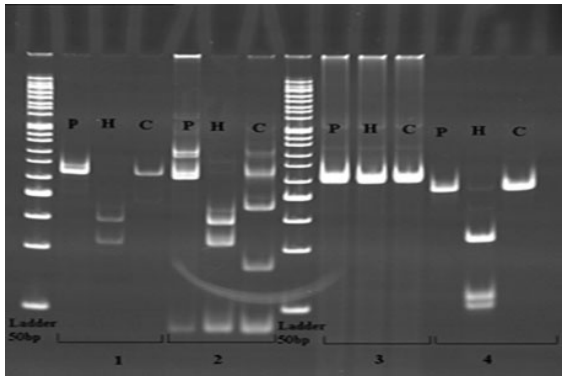
شکل۱. نتایج حاصل از hsp65PCR بر روی ژل آگارز
شماره ۱ تا ۸: نمونه‌های آب H37 RV: کنترل مثبت
شماره ۹ تا ۱۷: نمونه‌های خاک NC: کنترل منفی

[1] *M. senegalense*
[2] *M. fortuitum*
[3] *M.peregrinum*
[4] *M.mucogenicum*
[5] *M.aurum*
[6] *M.parafortuitum*
[7] *M.abscessus*
[8] *M.obuense*
[9] *M.poriferae*
[10] *M.mucogenicum*



شکل۲. شناسایی مایکوباکتریوم‌های سریع‌الرشد با هضم محصول hsp65 با استفاده از BsteII و HaeIII

شماره ۱ مایکوباکتریوم کانسپتیوننس، شماره ۲ مایکوباکتریوم پارافورتیتوم، شماره ۳ مایکوباکتریوم سنگالنس ،شماره ٤ مایکوباکتریوم آئوروم، شماره ۵ مایکوباکتریوم موکوژنیکوم، شماره ۶ مایکوباکتریوم آبسسوس، شماره ۷ H37 RV



شکل ۳. شناسایی مایکوباکتریوم‌های سریع‌الرشد با هضم محصول 16S-23S rRNA با استفاده از CfoI و HaeIII

H:HaeIII C:CfoI P:PCR Product

شماره ۱: مایکوباکتریوم فورتیتوم، شماره ۲ مایکوباکتریوم سنگالنس، شماره ۳ مایکوباکتریوم آبسسوس، شماره ٤ H37RV

بحث

با اینکه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس به عنوان عامل اصلی بیماری‌های ریوی در انسان شناخته شده‌اند، اما امروزه قدرت بیماریزایی مایکوباکتریوم‌های آتیپیک را کمتر از مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس نمی‌دانند. مایکوباکتریوم‌های سریع‌الرشد شامل ۳ گونه کلینیکی مرتبط شامل مایکوباکتریوم فورتیتوم، مایکوباکتریوم چلونی و مایکوباکتریوم آبسسوس می‌باشد که توانایی ایجاد طیف وسیعی از عفونت‌ها را دارند (٤). مایکوباکتریوم فورتیتوم، ارگانیسم سریع‌الرشدی است که از خاک، آب، گرد و غبار و محیط بیمارستان کشت داده می‌شود. مایکوباکتریوم فورتیتوم از طریق تلقیح مستقیم، باعث عفونت اولیه انسان شامل عفونت اولیه پوست، عفونت بافت نرم و عفونت زخم‌های جراحی می‌گردد. عمده مایکوباکتریوم‌های فورتیتوم در افرادی با بیماری‌های تنفسی نهفته یافت می‌شوند و معمولاً به اغلب داروهای ضد سل مقاوم می‌باشند (۹). استفاده از روش‌های بیوشیمیایی و تست‌های فنوتیپی برای تشخیص گونه‌های مایکوباکتریومی پر زحمت و زمان‌بر است. در سال‌های اخیر روش‌های ژنوتیپی برای شناسایی مایکوباکتریوم‌ها توسعه یافته است. روش‌های مولکولی متعددی برای تشخیص دقیق گونه‌های مختلف مایکوباکتریوم توسعه یافته است که از این میان روش PCR-RFLP از مزیت‌هایی همچون سریع و صریح بودن نتایج برخوردار است (۱۰). موندراگون و همکاران به مقایسه سه روش شناسایی مایکوباکتریوم‌ها شامل تست‌های بیوشیمیایی، کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا (HPLC) و PCR-RFLP پرداختند. طی یک سال آزمایش، ۱۰۷ مایکوباکتریوم با استفاده از این سه روش شناسایی شد و نتیجه حاصل بیانگر این بود که روش PCR-RFLP سریعترین و اختصاصی‌ترین روش تشخیص مایکوباکتریوم‌های غیرتوبرکلوزیس است و سپس تست‌های بیوشیمیایی روش مناسب برای شناسایی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس است و HPLC به‌عنوان روشی متوسط از نظر قیمت، سرعت و اختصاصی بودن بود (۱۱). چیمارا و همکارانش، مراحل تشخیصی برای hsp65 PCR-RFLP مطرح کردند و موفق شدند ۳۳۳ گونه مورد مطالعه را با کمک این روش در سطح گونه‌ای و زیرگونه‌ای مورد شناسایی قرار دهند (۱۲). در مطالعه حاضر، از مجموع ٤۵٤ نمونه آب و خاک جمع‌آوری شده از منطقه رباط کریم، ۱۹۳ نمونه (٤۲/۵٪) از نظر مایکوباکتریوم براساس کشت و

مشاهده میکروسکوپی مثبت گردید که مایکوباکتریوم سریع‌الرشد در ۳۶ نمونه (۱۸/۶٪) آب و خاک یافت شد که شناسایی ۵۵/۵٪ آنها با روش hsp65PCR-RFLP صورت گرفت و شناسایی ٤٤٪ آنها براساس ژن 16S-23SrRNA صورت گرفت. از آنجا که ژن hsp65 به‌صورت حفاظت شده در همه گونه‌های مایکوباکتریایی وجود دارد و از تنوع کافی برای تمایز این گونه‌ها برخورداراست، روش PCR-RFLP بر اساس ژن hsp65 گزینه مناسبی در مقایسه با روش PCR-RFLP بر اساس 16S-23SrRNA برای شناسایی مایکوباکتریوم‌های غیرتوبرکلوزیس می‌باشد. از طرفی انجام آزمایشات مولکولی بااستفاده از DNA نمونه‌های کشت مثبت به سهولت انجام می‌پذیرد، اما رشد کلنی بر روی محیط کشت خصوصاً در مایکوباکتریوم‌های کندرشد نیاز به زمان طولانی دارد و از طرفی کارکردن بر روی محیط کشت برای کاربر و آزمایشگاه ریسک آلودگی بالایی در بر دارد. در نتیجه در مطالعه حاضر آزمایشات مولکولی بر اساس استخراج DNA از نمونه مستقیم انجام شده است.

در مطالعه‌ای که توسط لی و همکاران با جمع‌آوری ۱۵۸ نمونه آب از آب‌های سطحی و آبهای لوله‌کشی انجام شد. مایکوباکتریوم در ۵۹٪ از آبهای سطحی و ۲۶٪ از آبهای لوله کشی یافت شد که بیشترین گونه یافت شده با استفاده از hsp65 PCR-RFLP در آبهای سطحی، مایکوباکتریوم گوردنی و در آبهای لوله‌کشی مایکوباکتریوم لنتی فلاویوم بود (۱۳). در مطالعه حاضر با توجه به شیوع مایکوباکتریوم‌های سریع‌الرشد در ایران به بررسی مایکوباکتریوم‌های سریع‌الرشد در آب و خاک منطقه رباط کریم پرداخته شد. در مطالعه‌ای که توسط قائمی و همکاران در سال ۲۰۰۶ انجام گرفت، مقایسه مایکوباکتریوم‌های محیطی در مناطق کم شیوع و پر شیوع بیماری سل استان گلستان صورت گرفت. برای این منظور از خاک این دو منطقه نمونه‌گیری صورت گرفت و پس از مراحل تیمار، روی محیط لوین اشتاین جانسون کشت داده شد. به طور کلی ۲۲۰ نمونه گرفته شد که ۱۲۰ نمونه از مناطق پر شیوع سل بود که از این تعداد ۲۰ درصد کشت مثبت شدند و ٤۷ نوع مایکوباکتریوم تشخیص داده شد. از ۱۰۰ نمونه گرفته شده از مناطق کم شیوع سل ۶۶ درصد کشت مثبت شدند که ۱۱٤ نوع مایکوباکتریوم تشخیص داده شد (۱٤). در ایران در مطالعه‌ای که توسط رهبر و همکاران صورت گرفت، جداسازی مایکوباکتریوم‌های سریع‌الرشد از ٤۷۰ نمونه آب و خاک جمع‌آوری شده از مناطق مختلف ارومیه مورد بررسی قرار گرفت. از سدیم لوریل سولفات ۳٪ و NaOH ۱٪ برای آلودگی زدایی نمونه‌های خاک استفاده شد. از ۳۵۰ نمونه خاک، مایکوباکتریوم از ۶۵ نمونه، جداسازی شد و مایکوباکتریوم فورتیتوم با ۱۸ سویه بیشترین فراوانی در نمونه‌های جداسازی شده بود. از ۱۲۰ نمونه آب جمع‌آوری‌شده از رودخانه‌ها و آبهای نوشیدنی، مایکوباکتریوم در ۱۲ نمونه یافت شد که گونه عمده جداسازی شده مایکوباکتریوم فورتیتوم و مایکوباکتریوم چلونی بود (۱۵). نتیجه این مطالعه بیانگر این است که شیوع مایکوباکتریوم سریع‌الرشد مشابه دیگر منابع جغرافیایی در ایران است. با توجه به اینکه در سال‌های اخیر مایکوباکتریوم‌های غیرتوبرکلوزیس به عنوان عامل اصلی عفونت‌های فرصت طلب ظهور یافته‌اند، شناخت درباره گونه‌های باکتریایی در محیط و شناسایی گونه‌های عمده در محیط می‌تواند در استراتژی درمان عفونت‌های ایجاد شده توسط آنها نقش مهمی داشته باشد. تنوع مایکوباکتریوم‌های غیرتوبرکلوزیس، عدم امکانات تشخیصی پیشرفته و از طرفی پیچیدگی تشخیص اینگونه باکتری‌ها را می‌توان از عواملی دانست که موجب شده مطالعات جامعی در ارتباط با آنها صورت نپذیرد.

نتیجه گیری

نتیجه مطالعه حاضر بیانگر تنوع فراوانی مایکوباکتریوم‌های سریع‌الرشد می‌باشد و بیشترین مایکوباکتریوم سریع‌الرشد در مجموع نمونه آب وخاک، مایکوباکتریوم فورتیتوم بود و از طرفی فراوانی مایکوباکتریوم‌های سریع‌الرشد در آب در مقایسه با خاک در منطقه رباط‌کریم بیشتر می‌باشد. با توجه به تنوع مایکوباکتریوم‌های سریع‌الرشد و قدرت بیماریزایی آنها و از طرفی مقاومت آنها به داروهای ضد سل، یافتن منابع دارای مایکوباکتریوم‌های سریع‌الرشد و همچنین راه‌های انتقال آنها به انسان کمک شایانی به پیشگیری از ابتلا به مایکوباکتریوم‌های غیر توبرکلوزیس می‌نماید.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله در پایان‌نامه به شماره تصویب ٤٨١٣٠٥٠٧٩١١٠٠٢، از همکاری مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی آزمایشگاه رفرانس سل کشوری واقع در بیمارستان مسیح دانشوری تهران و همچنین دیگر پرسنل این بخش تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

1- Gupta S, Bandyopadhyay D, Paine SK, Gupta S, Banerjee S, Bhattacharya S, Gachhui R, Bhattacharya B. Rapid identification of mycobacterium species with the aid of multiplex polymerase chain reaction (PCR) from clinical isolates.Open Microbiol J. 2010; 4: 93-97.

2- Van Ingen J, Boeree MJ, Dekhuijzen PN, Van Soolingen D. Environmental source of rapid growing nontuberculous mycobacteria causing disease in humans.Clin Microbiol Infect. 2009; 15(10): 888-93

3- Radomski N, Cambau E, Moulin L, Haenn S, Moilleron R, Lucas FS. Comparison of culture methods for isolation of nontuberculous mycobacteria from surface waters,Appl Environ Microbiol. 2010; 76(11): 3513-3520.

4- De-Groote M, Huitt G. Infection due to rapidly growing mycobacteria. Clin Infect Dis. 2006; 42(12): 1756-1763.

5- Katoch VM, Parashar D, Chauhan DS, Singh D, Sharma VD, Ghosh S. Rapid identification of mycobacteria by gene amplification restriction analysis technique targeting 16S-23S ribosomal RNA internal transcribed spacer and flanking region, Indian J Med Res . 2007; 125(2): 155-162.

6- Falkinham JO. Nontuberculous mycobacteria from household plumbing of patients with Nontuberculous mycobacteria disease,Emerg Infect Dis. 2011; 17(3): 419-424.

7- Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Bottger E, Bodmer T. Rapid identification of Mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. Journal of Clinical Microbiol. 1993; 31(2): 175-178.

8- Roth A, Reischl U, Streubel A, Naumann L, Kroppenstedt R, Habicht M, Fischer M, Mauch H. Novel diagnostic algorithm for identification of mycobacteria using genus-specific amplification of the 16S-23S rRNA gene spacer and restriction endonucleases. Journal of Clinical Microbiology. 2000; 38(3): 1094-1104.

9- Al Majid. Farhad M. Peritonitis due to Mycobacterium fortuitum fpllowing gastric banding. Saudi J Gastroenterol. 2010; 16(2): 113-115.

10- Brunello F, Ligozzi M, Cristelli E, Bonora S, Tortoli E, Fontana R. Identification of 54 Mycobacterial species by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the hsp65 gene.Journal of Clinical Microbiology. 2001; 39(8): 2799-2806.

11- Mondragon-Barreto M, Vazquez-chacon C, Barron-Rivero C, Acosta-Blanco P, Jost K, Balandrano S, Olivera-Diaz H. Comparison among three methods for mycobacteria identification. Salud Publica Mex. 2000; 42: 484-489.

12- Chimara E, Ferrazoli L, Ueky SY. Reliable identification of mycobacterium species by PCR-restriction enzyme analysis (PRA)-hsp65 in a reference laboratory and elaboration of a sequence based extended algorithm of PRA-hsp65 patterns. BMC Microbial. 2008; 8(48): 1471-2180.

13- Lee ES, Lee MY, Han SH, Ka JO. Occurrence and molecular differentiation of environmental mycobacteria in surface water. J Microbiol Biotechnol. 2008; 18: 1207-15.
14- Ghaemi E, Ghazisaidi K, Koohsari H, Khodabakhshi B, Mansoorian A. Environmental mycobacteria in areas of high and low tuberculosis prevalence in the Islamic Republic of Iran, East Mediterr Health J. 2006; 12(3-4): 280-5.
15- Rahbar M, Lamei A, Babazadeh H, Afshar Yavari S. Isolation of rapid growing mycobacteria from soil and water in Iran. African Journal of Biotechnology. 2010; 9(24): 3618-3621.

Isolation and Identification of Rapidly Growing Mycobacteria from Water and Soil by PCR-RFLP Method in Robat Karim

Rahideh S[1]*, Farnia P[2], Darbouy M[3]

1. MSc Student, Department of Microbiology, Sciences and Research Branch, Islamic Azad University, Fars, Iran
2. Associate Professor of Medical Microbiology, Mycobacteriology Research Center, National Research Institute of Tuberculosis and Lung Diseases (NRITLD), Masih Daneshvari Hospital, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
3. Professor of molecular genetics, Department of Microbiology, Sciences and Research Branch, Islamic Azad University, Fars, Iran.

**** Corresponding Author.*** Tel:+989122506485 Fax: +982126109505 E-mail: sanaz.raha83@yahoo.com

Received: 23 Jul 2013 Accepted: 26 Oct 2013

ABSTRACT

Background & Objective*:* Nontuberculous mycobacteria (NTM) especially rapid growing mycobacteria (RGM) are opportunistic environmental pathogens and their role in human disease is increasingly recognized. In addition, several studies indicated that humans can be infected by NTM from various environmental sources especially soil and water. Identification of rapid growing mycobacteria is important for both clinical and epidemiological studies because of their worldwide propagation. Incidence of rapid growing mycobacteria from water and soil in different regions of Robat Karim was studied using PCR-RFLP method and targeting hsp65 gene and 16S-23SrRNA.

Methods*:* In this study a total number of 454 water and soil samples were collected from different areas of Robat Karim. After decontamination of isolates by petroff method, the sediment obtained was cultured onto Lowenstein Jensen media and Ziehl Neelsen staining was performed for microscopic observations. After DNA extraction, hsp65 gene amplified by PCR-RFLP and then PCR products were digested by two restriction enzymes, BsteII and HaeIII, prior to undergoing polyacrilamid gel electrophoresis (PAGE). 16S-23S rRNA gene was also amplified and then PCR products were digested by restriction enzymes of HaeIII and CfoI and analyzed using PAGE.

Results*:* Based on the culture and microscopic observations, 49 (21.5%) out of 227 soil samples and 144 (63%) out of 227 water samples were positive regarding mycobacterium. 7 soil samples and 29 water samples were contained rapid growing mycobacteria based on PCR-RFLP method.

The results obtained by molecular method matched completely with those from culture method. Therefore, identification of Rapid Growing Mycobacterium has a sensitivity of 100% and mycobacterium fortuitum was the predominant isolated rapid growing mycobacteria in water and soil samples with a frequency of 27.8%.

Conclusion: Mycobacterium fortuitum was the most dominant rapid growing mycobacterium isolated from soil and water samples in Robat Karim area.

Keywords*:* Rapid Growing Mycobacteria; PCR-RFLP; Hsp65 Gene; 16S-23S rRNA Gene