مجله علمی- پژوهشی زیست فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی
زمستان 1390، دوره سوم، شماره یازدهم، صفحه 34-29

جداسازی و شناسایی مایکوباکتریومهای غیر سلی (آتیپیک) از آبهای سطحی استان اصفهان

معصومه کرمی میرآبادی[1]، رامین دیباج[2]، عبدالرزاق هاشمی شهرکی[2]، عباس دایی ناصر[2]، محمد حسن شاه حسینی[3]، حسن شجاعی[2]

1. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات (تهران).
2. مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی و گرمسیری اصفهان، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ایران.
3. دپارتمان میکروبیولوژی- دانشگاه آزاد اسلامی- واحد شهر قدس – تهران/ایران و موسسه ایرانیان ژن فناور- تهران/ایران.

نویسنده مسؤول: دکتر حسن شجاعی. گروه میکروبشناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان.h_shojaei@idrc.mui.ac.ir

دریافت: 90/10/1 پذیرش: 90/12/22

چکیده

زمینه و هدف: مطالعه مایکوباکتریومهای غیرسلی به دلیل اهمیت و اثرات اثبات شده‌ای که در امر سلامت عمومی اجتماعات انسانی دارند بسیار ضروری و حیاتی به نظر می‌رسد. از سوی دیگر در میان عوامل محیط زیستی، آب نقش عمده‌ای را به عنوان منبع و واسطه انتقال این گروه از میکروارگانیسم‌ها به انسان ایفاء می‌نماید و شواهد فزاینده‌ای دال بر ارتباط مایکوباکتریوم‌های موجود در آب با عفونت‌های انسانی وجود دارد. هدف از این پژوهش شناسایی و جداسازی اعضای این خانواده باکتریایی در منابع آبهای سطحی استان اصفهان بود.

روش بررسی: در مجموع 70 نمونه آب از منابع آبی سطحی استان اصفهان برداشت و پس از انتقال نمونه ها به آزمایشگاه عمل فیلتراسیون وآلودگی زدایی روی آن صورت گرفت و روی محیط لونشتین جانسون کشت داده شد و در دماهای مختلف انکوبه گردید. در صورت رشد عوامل میکروبی شبیه به مایکوباکتریومها تستهای تشخیصی برای شناسایی آنها شامل تست‌های بیوشیمیایی، و نیز مولکولی مانند PCR مبتنی‌بر ژن hsp65 برای شناسایی جنس مایکوباکتریوم بکار گرفته شد.

یافته ها: از مجموع 70 نمونه آب 24 (36%) ایزوله مایکوباکتریوم جداسازی شد که 5 (14%) ایزوله مربوط به آب پارک، 6 (17%) ایزوله ازآب میادین شهری، 1 (6/8%) ایزوله از آب چشمه، 2 (13/6%) ایزوله از آب چاه، 1 (2/7%) ایزوله از آب لوله‌کشی منازل شخصی، 3 (10/2%) ایزوله از آب کشاورزی، 3 (12/6%) ایزوله از آب رودخانه و 3 (17%) ایزوله از آب بیمارستان بودند.

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که درصد قابل توجهی از منابع آبی آلوده به مایکوباکتریومها می باشد که چنانچه افراد با ضعف سیستم ایمنی مانند سالمندان، کودکان و بیماران مبتلا به بیماریهای زمینه‌ای در معرض اینگونه میکروبها قرار گیرند می‌تواند پیامد خطرناکی داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: مایکوباکتریومهای غیر سلی، آبهای سطحی، ژن hsp65 ، PCR

www.SID.ir

مقدمه

مایکوباکتریومها یکی از مهمترین جنس‌های باکتریایی از لحاظ پزشکی و اکولوژیک محسوب می‌شوند که تا کنون نزدیک به 140 گونه و زیرگونه از آنها شناسایی شده است (1). مایکوباکتریوم‌های غیرسلی که به مایکوباکتریومهای محیطی و یا آتیپیک هم معروفند باکتری‌هایی اسیدفاست بوده که در آب‌های سطحی، خاک، گرد و غبار و سبزیجات وجود دارند. این باکتریها به عنوان باکتریهای فرصت طلب در افراد دچار ضعف سیستم ایمنی مانند سالمندان و یا کسانی که به بیماریهای زمینه‌ای همچون ایدز، دیابت و انواع سرطان‌ها مبتلا باشند ممکن است ایجاد بیماری نمایند (1-4). تماس‌های محیطی از طریق آب، عامل بسیاری از عفونت‌های ناشی از مایکوباکتریومهای غیر سلی در انسان است. اگرچه قرار گرفتن در معرض این باکتریها به طور متداول اتفاق می‌افتد ولی میزان بروز بیماریهای منتقله از آب در عفونتهای تنفسی، پوستی و بافت نرم بیماران مبتلا به نارسایی و نقص سیستم ایمنی رو به افزایش است (5-9). متاسفانه در کشور ما بدلیل عدم وجود امکانات تشخیصی پیشرفته در اکثر آزمایشگاههای بالینی و حتی آزمایشگاههای مرجع منطقه‌ای و استفاده از روش‌های قدیمی و سنتی بسیاری از عفونت‌های ناشی از مایکوباکتریومها تشخیص داده نمی‌شوند و یا در صورت تشخیص ممکن است بعلت ویژگی رنگ آمیزی مشابه با *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* به عنوان بیماری سل تحت درمان قرار می‌گیرند. مطالعات بسیاری از این اشتباهات که خسارت جانی و مالی بسیاری را برای جامعه می‌تواند به همراه داشته باشد، پرده برداشته‌اند و بر ضرورت ورود روش‌های مولکولی در سیستم‌های تشخیص بالینی صحه گذارده‌اند (2،3). مطالعه حاضر با توجه به اهمیت موضوع که در نوع خود برای بهداشت عمومی جامعه ضروری است میزان فراوانی وتنوع مایکوباکتریومهای غیرسلی در آبهای سطحی استان اصفهان را با استفاده از روشهای فنوتیپیک و مولکولی مورد بررسی قرار داد.

روش بررسی

جمع آوری نمونه‌ها: در مطالعه حاضر تعداد 70 نمونه از آبهای سطحی استان اصفهان (آبهای لوله کشی، کشاورزی، بیمارستان، رودخانه و چاه) جمع آوری شد. نمونه‌گیری آب با رعایت تکنیک‌های آسپتیک و در ظروف استریل یک لیتری صورت گرفت. ظرف حاوی آب بلافاصله به آزمایشگاه انتقال و مورد بررسی قرار گرفت و یا در موارد با فاصله دور از اصفهان در دمای 4 درجه نگهداری و حداکثر ظرف مدت 24 ساعت به آزمایشگاه انتقال داده شد. ویژگیهای فیزیکی آبها مانند دما، میزان سختی کلی آب و میزان کلر نیز برای هر نمونه اندازه‌گیری شد.

جداسازی مایکوباکتریومها: برای جداسازی مایکوباکتریومها از آب از روش استاندارد توصیه شده توسط سازمان جهانی بهداشت استفاده شد (4). بطور خلاصه نمونه‌های آب ابتدا با استفاده از دستگاه پمپ خلاء مجهز به فیلتر 0/45 میکرومتری فیلتر شدند. بعد از انجام فیلتراسیون، آلودگی‌زدایی با استفاده از محلول حاوی 3% SDS و 1% NaOH، انجام و سپس نمونه ها در دور 6000rpm به مدت 20 دقیقه سانتریفوژ شدند. رسوب حاصل از آلودگی‌زدایی بر روی دو محیط کشت لونشتین جنسون کشت داده شد و در دمای 30 و 35 درجه سانتی گراد انکوبه گردیدند. سپس محیط‌های کشت یک روز در میان به مدت دو ماه برای مشاهده پیدایش احتمالی کلنی مورد بررسی قرار گرفتند. پس از ظاهر شدن کلنی، رنگ آمیزی اسید فاست با روش کنیون انجام گرفت و هویت کلنی ایزوله شده با تست‌های فنوتیپیک، بیوشیمیایی و مولکولی مربوط به شناسایی مایکوباکتریومها تعیین شد (10،4).

شناسایی فنوتیپیک: برای شناسایی مایکوباکتریومها از تستهای فنوتیپیک مانند بررسی کلنی، سرعت رشد، رشد در دماهای مختلف و تولید پیگمان که مایکوباکتریومها با توجه به نوع گونه به سه دسته فتوکروموژن، اسکوتوکروموژن و غیرکروموژن تقسیم می‌شوند، استفاده شد. سپس انواعی از تستهای بیوشیمیایی مانند تست اوره‌آز، تست کاتالاز، تست تحمل نمک و تست پارانیتروبنزوئیک اسید برای شناسایی و تعیین ویژگیهای ایزوله جدا شده مورد استفاده قرار گرفت. همچنین از *مایکوباکتریوم فورچویتوم* ATCC 6841T ، *مایکوباکتریوم کانزاسی* ATCC 12478 و *م. توبرکلوزیس* سویه H37RV به عنوان سویه های

Archive of SID

www.SID.ir

استاندارد در تستهای فنوتیپیک استفاده شد(4). برای شناسایی مولکولی مراحل زیر مورد بررسی قرار گرفت.

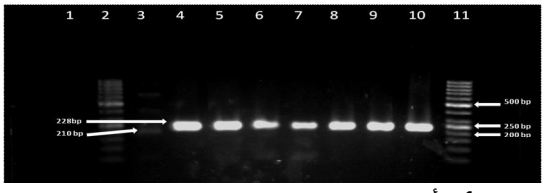
استخراج DNA: برای استخراج DNA از مایکوباکتریومها از روش استاندارد پیچر (12, 13) با تغییرات جزیی به منظور سهولت لیز دیواره سلولی مستحکم مایکوباکتریومها استفاده شد. بطور خلاصه لیز کشت خالص سوشهای ایزوله شده مایکوباکتریوم‌ها با استفاده از لیزوزیم (50 میلیگرم در میلی لیتر) به مدت 24 ساعت در 37 درجه سانتی گراد و سپس آنزیم پروتئیناز k به مدت 2 ساعت در محلول حاوی SDS و Tris-EDTA انجام شد و خالص‌سازی DNA با استفاده از روش فنل–کلروفرم-ایزوامیل الکل صورت گرفت. کیفیت و کمیت تمامی DNA ایزوله‌های جدا شده با اسپکتروفتومتر و همچنین الکتروفورز روی ژل مورد بررسی قرار گرفتند. مقدار 5 میکرولیتر DNA ژنومیک استخراج شده (0/2 میکروگرم) به میکروتیوب افزوده شد تا حجم نهایی به 25 میکرولیتر رسید. کلیه مراحل تهیه میکس اولیه و توزیع آن در لوله‌های واکنش بر روی یخ انجام پذیرفت. از پرایمرهای MSGPF-CTGGTCAAGGAAGGTCTGCG-3(5) و MSGPR-GATGACACCCTCGTTGCCAAC-3(5) جهت تکثیر ژن hsp65 استفاده شد (11). برای پی بردن به آلودگی احتمالی از کنترل منفی استفاده گردید که شامل همه اجزاء PCR بدون DNA الگو بود. همچنین یک کنترل مثبت شامل اجزاء واکنش PCR به همراه DNA *م.توبرکلوزیس* سویه H37Rv به عنوان سویه استاندارد که تولید قطعه‌ای به طول 210 جفت باز می‌کرد استفاده گردید. برای انجام واکنش PCR از برنامه زیر (طبق جدول 1) به تعداد 35 چرخه استفاده شد (11).

جدول 1. شرایط PCR برای تکثیر ژن hsp65 به منظور شناسایی مایکوباکتریومها

Initial denaturation	Denaturation	Amplification Annealing	Extension	Final Amplification	Cooling
95°C	94°C	58°C	72°C	72°C	25°C
5 min	15 sec	15 sec	30 sec	10 min	5 min
1 cycle	35 cycles			1 cycle	1 cycle

یافته ها

در این مطالعه تعداد 24 ایزوله مایکوباکتریوم از 70 نمونه آب‌های سطحی استان اصفهان جداسازی و شناسایی شدند. ابتدا خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آب که از آنها مایکوباکتریوم جدا شده بود مورد بررسی قرار گرفت، سپس فیلتراسیون و آلودگی‌زدایی انجام شد. از مجموع 24 ایزوله مایکوباکتریوم، 16 ایزوله اسکوتوکروموژن و 7 ایزوله غیرکروموژن بودند. تست اوره از مجموع 24 ایزوله، 20 ایزوله مثبت و 4 ایزوله منفی بودند. در تست کاتالاز 12 تا از ایزوله های جدا شده تولید حباب بالاتر از 45 میلی متر نمودند که واکنش مثبت تلقی می شوند. درتست پارانیتروبنزوییک اسید کلیه ایزوله های جداسازی شده واکنش مثبت به این تست نشان دادند. در واقع به نیتروبنزوئیک اسید حساس نبوده و روی این محیط رشد کردند از مجموع 24 ایزوله مایکوباکتریوم، 11 ایزوله توانایی رشد بر روی محیط کشت حاوی نمک را داشتند. ایزوله‌ها بر اساس معیارهای رانیون طبقه بندی شدند که بر این اساس از 24 مایکوباکتویوم جدا شده، 5 نمونه به رانیون گروه دو و 19 نمونه به رانیون گروه چهار متعلق بودند. نتایج در جدول شماره 2 آورده شده است. بعد از استخراج DNA و انجام PCR بر روی ژن hsp65، باند 228bp مربوط به جنس مایکوباکتریومها بدست آمد که نشان دهنده نمونه‌های متعلق به مایکوباکتریوم‌های غیر سلی می‌باشند (جدول 2). برای تأیید مولکولی و طبقه‌بندی ایزوله‌ها در جنس مایکوباکتریوم با استفاده از PCR قطعه‌ای از ژن به طول 228 جفت‌باز که در تمامی ایزوله‌های مایکوباکتریوم‌های غیرسلی وجود دارد ردیابی شد. قطعه مذکور در ایزوله‌های بالینی *م. توبرکلوزیس*، سویه استاندارد H37Rv مشاهده نمی‌شود و به جای آن باندی به طول 210 جفت باز تولید می‌گردد. شکل 1 نمونه ای از نتایج بدست آمده در این مرحله را نشان می دهد.



شکل 1. تأیید مولکولی جنس مایکوباکتریوم بر اساس تولید قطعه 228 جفت باز.

Archive of SID
www.SID.ir

ستون1شامل کنترل منفی می باشد، ستون :2و11 شامل DNA سایز مارکر 50 جفت بازی، ستون 3 م توبرکلوزیس H37Rv می باشد; که تولید باند 210 جفت بازی می نماید، ستون های 4 الی 10 شامل گونه های مختلف مایکوباکتریوم های غیرسلی که با تولید قطعه 228 جفت باز مشخص گردید.

جدول 2: نتایج نهایی جداسازی و شناسایی مایکوباکتریومهای جدا شده از منابع آبی در اصفهان*. اعداد داخل پرانتزها نشان دهنده تعداد مثبت نمونه ها می باشند.

شناسائی		ویژگی بیوشیمیائی (+)			دمای رشد مطلوب	دمای رشد		پیگمانتاسیون			سرعت رشد			رنگ کلنی			تعداد مایکوباکتریوم ایزوله شده	منابع آب *								تعداد نمونه
گروه رانیون	مارکرژنتیکی تایید جنس (hsp65)	تحمل نمک (5%)	پارانیتروبنزوئیک اسید	کاتالاز	اوره آز	35	42	35	30	گاس کرمون	فوتوکرومون	اسکوتوکرموژن	کند رشد	تند رشد	ناتحه رنگ	کرم رنگ	زرد رنگ		پارک	میادین شهری	چشمه	چاه	آب لوله کشی	کشاورزی	رودخانه	بیمارستان	
IV																											
19	0	5	0	24	11	24	12	20	24	17	24	22	7	0	17	5	19	10	24	7	7	6(3)	8(3)	10(3)	12(1)	5(2)	5(1)	12(6)	12(5)	70

بحث

اهمیت مطالعه مایکوباکتریومها از زوایای متعددی قابل طرح است. شیوع روزافزون عفونت‌های بیمارستانی ناشی از این باکتریها به عنوان یکی از معضلات جدی سیستم‌های بهداشتی کشورهای جهان و در صنعت شیلات، به دلیل استفاده از آبهای سطحی جهت رشد ماهیها و گزارش‌های بسیاری مبنی بر شیوع انواعی از عفونت‌های مایکوباکتریومی، این خانواده باکتریایی اهمیت مطالعه این باکتری‌ها و ردیابی آن‌ها را در منابع آبهای سطحی دو چندان کرده است(14-16). نتایج مطالعات مختلف نشان می‌دهد که انواعی از مایکوباکتریومهای محیطی از آبهای مورد بررسی جدا شدند. در سال 2011 فالکینهام از امریکا گزارش جداسازی مایکوباکتریومها غیر سلی را از 59% منابع آب شرب خانگی بیماران مبتلا به عفونتهای ناشی از این میکروبها را داد (5). شرما و همکاران در سال 2007 از 21 نمونه منبع آب آشامیدنی چندین مرکز آموزشی در هند، 16 گونه (76%) مایکوباکتریوم غیر سلی را جدا نمودند (6). کورت و همکاران توانستند 32 گونه از مایکوباکتریوم غیر سلی را از 89 نمونه آب آشامیدنی (36%) در سیستم‌های توزیع آب جداسازی کنند (7). چانگ و همکاران نمونه‌های آب را از یک بیمارستان در چین مورد بررسی قرار دادند و دریافتند که 10 مورد از 49 نمونه آب آشامیدنی

www.SID.ir
Archive of SID

بیمارستانی (20%) حاوی مایکوباکتریومهای محیطی می‌باشند (16). در مطالعه حاضر از 70 نمونه‌ای که از آب‌های سطحی استان اصفهان جمع‌آوری شد بیشترین میزان جداسازی مایکوباکتریومها از آب‌های میادین شهری (17%) و آب‌های شیر بیمارستان (17%) و پس از آن آب پارکها (14%)، آبهای چاه (13/6%) صورت گرفت که این داده ها از آلودگی بالا و قابل تامل منابع آبی بیمارستانی و نیز آب‌های میادین شهری به عنوان مکان‌هایی که روزانه انسانهای بسیاری احتمال تماس با این منابع آبی را دارند حکایت می‌کند و اینکه آلودگی بالای این منابع آبی به مایکوباکتریومهای آتیپیک به نظر می‌رسد نشان دوام این باکتریها در آب باشد که احتمال تماس و انتقال این باکتری‌های فرصت طلب را از این منابع آبی به انسان بیشتر کرده است. با این حال کمترین میزان آلودگی در نمونه‌های آب‌های لوله‌کشی منازل مشاهده شد که می تواند نشان دهنده بهبود وضعیت تدابیر ضدعفونی کنندگی این منابع آبی و به نحوی الگوبرداری از این تدابیر جهت ارتقاء سطح بهداشتی منابع آب‌های بیمارستانی و نیز آب‌های میادین شهری باشد در مطالعه ما از 6 نمونه آبی که از آبهای آشامیدنی بیمارستانهای اصفهان جمع آوری شد، 3 نمونه یعنی (50%) از آنها حاوی مایکوباکتریومهای محیطی بودند که از بالا بودن میزان آلودگی آبهای بیمارستان‌ها به این باکتریها در این استان و متعاقب آن افزایش احتمال عفونت‌های بیمارستانی که مسلماً به دلیل مقاومت بالای این نوع از باکتریها به داروهای آنتی‌بیوتیک در زمره سرسخت‌ترین عفونت‌های بیمارستانی از نقطه‌نظر ریشه‌کنی و درمان به شمار می‌آید، حکایت می‌کند. دانته و همکاران در سال 2002 از فرانسه گزارش دادند که مایکوباکتریومهای ساپروفیت در 41/3 درصد منابع آبی، مایکوباکتریومهای بالقوه بیماریزا در 16/3 درصد و مایکوباکتریومهای ناشناخته در 54/8 درصد سیستم توزیع آب پاریس وجود دارند. (18). در مطالعه‌ای که در ایتالیا در سال 2010 توسط برایانس و همکاران صورت گرفت، از مجموعه 42 نمونه‌ای که از آبهای سطحی گرفته شد،60% از آب‌های آشامیدنی منازل شخصی و73 % از آبهای بیمارستانی آلوده به مایکوباکتریومهای محیطی تشخیص داده شدند (9). در مطالعه ما از 12 نمونه آب آشامیدنی منازل شخصی، تنها 1 نمونه از آنها، مثبت بود که نشاندهنده رشد شاخص‌های بهداشتی آبهای لوله‌کشی در منازل شخصی در شهر اصفهان می باشد.

از جمله معدود مطالعاتی که در کشور ما در رابطه با جداسازی مایکوباکتریومها از آب صورت گرفته است، می توان به مطالعه آقای رهبر و همکارانش در سال 2010 که بر روی 120 نمونه آب از آب رودخانه‌ها، جویبارها و آب‌های آشامیدنی استان تهران انجام گردید و نیز مطالعه آقای قائمی و قاضی سعید و همکاران اشاره نمود (18و 19). در مطالعه اولی مجریان توانستند از 12 نمونه که 10% کل نمونه ها را شامل می شد مایکوباکتریوم آتیپیک جدا کنند که بیشترین نمونه‌های آلوده را آب جویبارها و آب‌های سطحی به خود اختصاص دادند. در مطالعه دوم اهمیت مایکوباکتریوم مارینوم در عفونت آبزیان و ماهیگیران مورد بحث قرار گرفته است. مجموع این مطالعات و مطالعه ما، همگی بر یک واقعیت مسلم که همان اهمیت فوق العاده منابع مختلف آب‌های سطحی، اعم از آب آشامیدنی، آبهای سطحی، آبهای رودخانه و غیره در انتشار مایکوباکتریومهای محیطی و ایجاد یک تهدید جدی برای سلامت انسان از طرق مختلفی همچون آشامیدن مستقیم آب، آبیاری زمینهای کشاورزی، استفاده از منابع آب عمومی همچون رودخانه‌های کم عمق، جهت تفریح و شنا و نیز استفاده از آب‌های سطحی صحه می‌گذارند. که در صورت آلوده بودن این منابع آبی، احتمال ابتلای به عفونت‌های ناشی از این مایکوباکتریومها بویژه عفونت‌های تنفسی شدیداً افزایش می‌یابد.

نتیجه گیری

مطالعه حاضر نشان داد که منابع آبی کشور ما بویژه در نقاط حساس مانند بیمارستانها و خانه های سالمندان و غیره همانند سایر نقاط دنیا می تواند حاوی مایکوباکتریومهای محیطی باشد و خطراتی را برای افراد در معرض اینگونه آب ایجاد نماید. لذا برای ضدعفونی آب اینگونه مراکز با توجه به مقاومت نسبی آنها به روشهای معمول مانند کلرینه نمودن آب، باید تمهیدات بیشتری را مد نظر قرار داد.

Archive of SID
www.SID.ir

تقدیر و قدردانی

نویسندگان از مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی و گرمسیری اصفهان برای در اختیار گذاردن امکانات سخت افزاری آزمایشگاهی سپاسگزار می باشند.

References

1. Shojaei H, Heidarieh P, Hashemi A, Feizabadi MM, Daei Naser A. *Species identification of neglected nontuberculous Mycobacteria in a developing country*. Jpn J Infect Dis. 2011; 64(4):265-71.
2. Primm TP, Lucero CA, Falkinham JO 3rd. *Health impacts of environmental Mycobacteria.* Clin Microbiol Rev. 2004; 17(1):98-106.
3. Tortoli E, Bartoloni A, Böttger EC, Emler S, Garzelli C, Magliano E. *Burden of unidentifiable Mycobacteria in a reference laboratory*. J Clin Microbiol. 2001; 39(11):4058-4065.
4. Bartram J, Rees G, Dufour A , Cotruvo J, Pedley S . *Pathogenic Mycobacteria in Water: A Guide to Public Health Consequences, Monitoring and Management.* World Health Organization. 2004. IWA publishing, London, UK.
5. Falkinham JO 3rd. *Nontuberculous Mycobacteria from household plumbing of patients with nontuberculous Mycobacteria disease*. Emerg Infect Dis. 2011; 17(3):419-24.
6. Sharma A, Chandraker SK, Bharti M. *Nontubercular Mycobacteria in drinking water of some educational institutes in Jabalpur*. Indian J Microbiol. 2007; 47(3):233–240.
7. Covert TC, Rodgers MR, Reyes AL, Stelma GN. *Occurrence of Nontuberculous Mycobacteria in Environmental Samples*. Applied and Enviro Microbio. 1999; 65(6):2492–2496.
8. Le Dantec C, Duguet JP, Montiel A, Dumoutier N, Dubrou S, Vincent V. *Occurrence of Mycobacteria in water treatment lines and in water distribution systems*. Appl Environ Microbiol. 2002; 68(11):5318-25.
9. Briancesco R, Semproni M, Libera SD, Sdanganelli M, Bonadonna L. *Non-tuberculous Mycobacteria and microbial populations in drinking water distribution systems.* Ann Ist super sanit. 2010; 46(3):254-258.
10. Kent PT, Kubica GP. *Public Health Mycobacteriology: A guide for the level III laboratory*. 1985. Centers for Disease Control, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, Ga.
11. Khan IU, Yadav JS. *Development of a single-tube, cell lysis-based, genus-specific PCR method for rapid identification of Mycobacteria: optimization of cell lysis, PCR primers and conditions, and restriction pattern analysis.* J Clin Microbiol. 2004;42(1):453-457.
12. Pitcher DG, Saunders NA, Owen RJ. *Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate.* Lett Appl Microbiol. 1989;8:151-158.
13. Shojaei H, Magee JG, Freeman R, Yates M, Horadagoda NU, Goodfellow M. *Mycobacterium elephantis sp. nov., a rapidly growing non-chromogenic Mycobacterium isolated from an elephant*. Int J Syst Evol Microbiol. 2000;50(5):1817-1820.
14. Martín-Casabona N, Bahrmand AR, Bennedsen J, Ostergaard Thomsen V, Cursio M, Fauville-Dufaux M. *Non-tuberculous Mycobacteria: patterns of and water in iran. African J Biotech. isolation. A multi-country retrospective survey*. Int J Tuberc Lung. Dis. 2004; 8(10):1186-1193.
15. Tortoli E, Rogasi PG, Fantoni E, Beltrami C, De Francisci A, Mariottini A. *Infection due to a novel Mycobacterium, mimicking multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis*. Clin Microbiol Infect. 2010; 16(8):1130-1134.
16. Chang CT, Wang LY, Liao CY, Huang SP. *Identification of nontuberculous Mycobacteria existing in tap water by PCR-restriction fragment length polymorphism*. Appl Environ Microbiol. 2002; 68(6):3159-3161.
17. Le Dantec C, Duguet JP, Montiel A, Dumoutier N, Dubrou S, Vincent V. *Occurrence of Mycobacteria in water treatment lines and in water distribution systems.* Appl Environ Microbiol. 2002; 68(11):5318-25.
18. Ghaemi E , Ghazi Saeedi K, Fatemi Nasab F , Hashemzadeh Z, Vatani S, Mohammadi M. *Mycobacterium Marinum infection in Caviar Fishes and Fisher's man in Caspian sea Province in North of Iran.* J Bio Sci. 2006; 6(6):1150-1152.
19. Rahbar M, Lamei A, Babazadeh H, Yavari SA. *Isolation of rapid growing Mycobacteria from soil. and water in iran*. African J Biotech. 2010; 9(24):3618-3621.

Archive of SID

www.SID.ir