Archive of SID

مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی
دوره پنجم، شماره بیستم - پائیز ۱۳۹۴

Research Article
مقاله تحقیقی

شناسایی مایکوباکتریوم های بالقوه بیماری زای جدا شده از سیستم های آب های شرب تهران

عبدالرزاق هاشمی شهرکی[1*]، سعید ذاکر بستان آباد[2]

۱. استادیار،انیستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۲. دانشیار،دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پرند، پرند، ایران

چکیده

سابقه و هدف: مایکوباکتریوم های غیر سلی به طوری وسیعی در محیط پراکنده اند و از نمونه های محیطی جدا می شوند. بسیاری از گونه های آن ها به عنوان باکتری های بیماری زا برای انسان شناخته می شوند. هدف این مطالعه جداسازی و شناسایی مایکوباکتریوم های غیرسلی جدا شده از آب های سیستم شهری تهران بود.

مواد و روش ها: از ۲۲ منطقه شهری شهر تهران تعداد ۴۴ نمونه آب برداشت گردید. از هر منطقه دو نمونه آب بررسی شد. یک لیتر آب در بطری های استریل جمع آوری و به آزمایشگاه منتقل شد. بعد از تغلیظ نمونه های آب با استفاده از سیستم فیلتراسیون، با استفاده از NaOH و SDS رسوب نمونه های آب آلودگی زدایی و کشت داده شد. ایزوله های مایکوباکتریومی جدا شده با استفاده از روش تعیین توالی ژن *rpoB* مورد شناسایی قرار گرفتند.

یافته ها: تمامی نمونه آب های مورد استفاده از نظر کشت مثبت بودند. سه نمونه آب دارای دو نوع مختلف کلنی مایکوباکتریوم غیر سلی بود در حالی که بقیه نمونه ها یعنی ۴۱ نمونه دارای فقط یک نوع کلنی خالص مایکوباکتریوم بودند. آلودگی محیط های کشت ۱٪ بود. تعداد ۴۷ ایزوله مایکوباکتریومی در مجموع جدا سازی گردید. بر اساس تعیین توالی ژن *rpoB* گونه های مایکوباکتریوم سیمیه، مایکوباکتریوم فورچیتیوم و مایکوباکتریوم گوردونه شایع ترین ها بودند.

نتیجه گیری: در این مطالعه نشان داده شد که در آب های شرب مایکوباکتریوم ها وجود داشته و جمعیت انسانی با این گروه از باکتری ها مدام در تماس است. مطالعات تکمیلی می تواند مشخص شدن نقش این باکتری ها در کیفیت آب های شرب کمک نماید.

کلمات کلیدی: مایکوباکتریوم های غیرسلی، شناسایی، آب شرب، تهران

مقدمه

مایکوباکتریوم های غیر سلی از مهمترین باکتری های ساکن آب می باشند. تا کنون بیش از ۱۸۰ گونه از آنها شناسایی شده است که تعداد اندکی از آنها مانند مایکوباکتریوم توبرکلوزیس عامل سل در انسان و مایکوباکتریوم بوویس عامل سل در انسان و گاو، پاتوژن مطلق می باشند (۱۰). با این حال غالب مایکوباکتریوم های غیرسلی به صورت بالقوه برای انسان بیماری زا می باشند که از آنها می توان به مایکوباکتریوم سیمیه، مایکوباکتریوم کانزاسی، مایکوباکتریوم آویوم_انتراسلولاره و کمپلکی فورچیتوم اشاره نمود (۱۰ و ۱۸). محیط به ویژه آب مهم ترین منبع مایکوباکتریوم های غیرسلی می باشد که این ارگانیسم ها می توانند در آن علاوه بر بقا رشد و تکثیر نمایند. این در حالی است که امروزه مشخص شده است حشرات، آمیب ها، ماهی ها و

نویسنده مسئول:
انیستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
ایمیل:abdolrazaghh@gmail.com
تاریخ دریافت :۱۳۹۴/۰۱/۰۷
تاریخ پذیرش :۱۳۹۴/۰۵/۱۶

www.SID.ir

Archive of SID

دوزیستان نیز نقش اساسی در حفظ و بقا این باکتری ها در در طبیعت دارند (۱, ۳). بر این اساس لازم است همواره آب را به عنوان منبع اصلی مایکوباکتریوم های غیرسلی در نظر گرفت. این در حالی است که بیماری های ناشی از مایکوباکتریوم های غیر سلی هم در دنیا۴,۵ و هم در ایران (۱۱, ۱۲) رو به فزونی است و آنچه شرائط را بغرنج تر می نماید این است که در کشورهای در حال توسعه مانند ایران، عفونت های آنها به راحتی با بیماری سل اشتباه تشخیص داده شد و حتی به صورت سل مقاوم به درمان در نظر گرفته می شوند (۱۳).

پایش آب می تواند در تعیین اکولوژی مایکوباکتریوم های غیر سلی کمک کند. آب شرب و آبی که در سیستم های توزیع آب شهری در جریان است یکی از انواع آب هایی است که مایکوباکتریوم ها به دلیل مقاومت ذاتی به ضدعفونی آب با کلر، در آن به صورت فلور میکروبی اصلی تبدیل شده اند و با شرکت در ساخت بیوفیلم بقا خود را در آن تضمین نموده اند (۹ , ۱۶).

شهر تهران دارای ۲۲ منطقه شهری است که در این مطالعه از هر منطقه شهری دو نمونه آب شرب از منازل جمع آوری شد و از نظر حضور و تنوع گونه ای مایکوباکتریوم های غیرسلی بررسی گردید.

مواد و روش ها:

از ۲۲ منطقه شهری شهر تهران تعداد ۴۴ نمونه آب از آب های منازل برداشت گردید. از هر منطقه دو نمونه آب بررسی شد. از صاحبان منازل خواسته شد تا بطری استریل یک لیتری را از لوله آب شیر آشپزخانه که به طور عمده مصرف خوراکی دارد پر نمایند. در ضمن کنترل شد که در مسیر آب از هیچ گونه سیستم تصفیه آب استفاده نشده باشد و آب شرب، آب مصرفی موجود در سیستم توزیع آب شهری باشد. یک لیتر آب در بطری های استریل جمع آوری و به آزمایشگاه سامیار (خیابان ستارخان، تهران) منتقل شد. بعد از تغلیظ نمونه های آب به صورت جداگانه با استفاده از سیستم فیلتراسیون و فیلترهای ۰/۴۵ میکرونی، رسوب از روی فیلتر ها با اسکالپل استریل تراشیده شد و در یک میکروتیوپ۱/۵ سی سی استریل وارد شد.

با استفاده از NaOH ۱/۵٪ و SDS ۳٪ با استفاده از پروتکل توضیح داده شده توسط کاورت و همکاران (۶) رسوب نمونه های آب آلودگی زدایی و بر روی دو محیط کشت لونشتاین جانسن کشت داده شد. محیط های کشت در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت دوماه انکوبه شدند و روزانه رشد آن ها کنترل شد. ایزوله های تند رشد در کمتر از هفت روز و ایزوله های کند رشد بیش از هفت روز رشد نمودند.

بعد از رشد و اطمینان یافتن از خالص بودن ایزوله های به دست آمده با استفاده از تکرار پاساژ ایزوله برای رسیدن به کلنی تک، شناسایی مولکولی ایزوله ها با استفاده از تکثیر و تعیین توالی ژن *rpoB* با استفاده از دو پرایمر MycoF و MycoR و روش توضیح داده شده ادکامبی و همکاران مورد شناسایی قرار گرفتند (۲). بعد از تعیین توالی با استفاده از BLAST NT(-GENBANK) و نرم افزار مگا شناسایی ایزوله های جدا شده انجام گردید (۱۵).

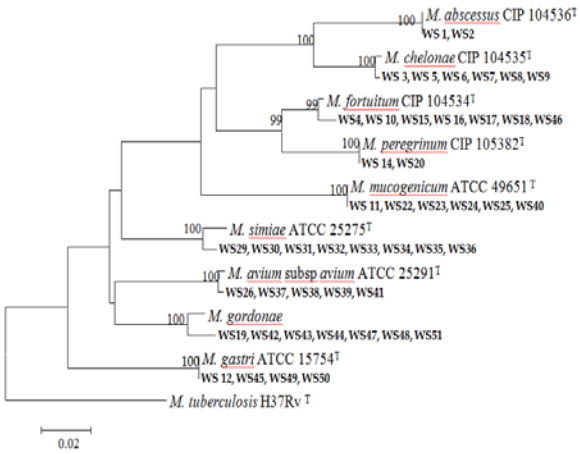
یافته ها:

تمامی نمونه آب های مورد استفاده از نظر کشت مایکوباکتریوم مثبت بودند. سه نمونه آب دارای دو نوع مختلف کلنی مایکوباکتریوم غیر سلی بود در حالی که بقیه نمونه ها یعنی ۴۱ نمونه دارای فقط یک نوع کلنی خالص مایکوباکتریوم بودند. آلودگی محیط های کشت ۱٪ بود ولی به دلیل اینکه از هر نمونه ای دو محیط کشت، تلقیح شده بود لذا هیچ نمونه ای حذف نشد. تعداد ۴۷ ایزوله مایکوباکتریومی در مجموع جدا سازی گردید که بعد از اطمینان یافتن از خلوص کلنی ها، ژن *rpoB* تکثیر و تعیین توالی شد.

بر اساس تعیین توالی ژن *rpoB* گونه های مایکوباکتریوم سیمیه (۸ ایزوله)، مایکوباکتریوم فورچیتیوم (۷ ایزوله)و مایکوباکتریوم گوردونه (۷ ایزوله) شایع ترین ها بودند .مایکوباکتریوم موکاژنیکوم (۶ایزوله)، مایکوباکتریوم چلونه ای (۶ایزوله)، مایکوباکتریوم آویوم (۵ ایزوله)، مایکوباکتریوم گاستری (۴ ایزوله) و مایکوباکتریوم آبسسوس (۲ ایزوله) و مایکوباکتریوم پرگرینوم (۲ ایزوله) مورد شناسایی قرار گرفتند. غالب ایزوله ها دارای شباهت بالای ۹۹,۵٪ به سویه مرجع گونه شناسایی شده بودند. تصویر شمار ۱، آنالیز فایلوژنتیکی ایزوله های جدا شده در این مطالعه را نشان می دهد.

www.SID.ir

Archive of SID



تصویر شماره ۱: درخت تکاملی بر اساس توالی ژن *rpoB*. در این تصویر قرابت ژنتیکی ایزوله های مایکوباکتریوم غیر سلی با ایزوله های مرجع گونه ها نشان داده شده است. درخت تکاملی با استفاده از الگوریتم NJ و ماتریکس K2P و با استفاده از نرم افزار مگا ترسیم شده است. قرابت ها با Bootstrap ۱۰۰۰ بار بدست آمده است (۹۹, ۱۰۰).

بحث

تعداد گونه های مایکوباکتریوم روبه افزایش می باشند. تعدادی از این گونه‌ها از بیماری های انسانی و یا حیوانی مختلف مانند پستانداران و آبزیان جدا سازی و معرفی شده‌اند. بر این اساس همواره نگرانی هایی در مورد پدیدار شدن بیماری های نوظهور ناشی از باکتری های ناشناخته وجود دارد. آب خاستگاه و منبع اصلی این گروه از باکتری ها عنوان شده است (۴،۹ , ۱۶).

در این مطالعه اولیه تلاش شد تا نوع گونه ای غالب در آب های شرب شهر تهران تعیین گردد. گونه های جدا شده در این مطالعه عبارت بودند از مایکوباکتریوم سیمیه (۸ ایزوله)، مایکوباکتریوم فورچیتیوم (۷ ایزوله)، مایکوباکتریوم گوردونه (۷ ایزوله) مایکوباکتریوم موکاژنیکوم (۶ ایزوله)، مایکوباکتریوم چلونه ای (۶ ایزوله)، مایکوباکتریوم آویوم (۵ ایزوله)، مایکوباکتریوم گاستری (۴ ایزوله) و مایکوباکتریوم آبسسوس (۲ ایزوله) و مایکوباکتریوم پروسینوم (۲ ایزوله). در این مطالعه ۹ گونه مختلف مایکوباکتریوم جداسازی شد که گزاراش های متعددی حاکی از بیماری زا بودن آنها به ویژه در افراد دارای نقص سیستم ایمنی است(۷،۸).

در ایران گونه های مورد اشاره به کرات از نمونه های بالینی جدا شده اند (۱۱، ۱۲، ۱۴، ۱۷) که با توجه به اینکه راه انتقال فرد به فرد در عفونت های مایکوباکتریوم غیرسلی مطرح نمی باشد، می توان به آب به عنوان مخزن و راه انتقال اندیشید. در این مطالعه مایکوباکتریوم سیمیه، مایکوباکتریوم فورچیتوم و مایکوباکتریوم گوردونه غالب بودند. دو گونه اول در نمونه های بالینی ایران نیز به کرات مشاهده و گزارش شده اند ولیکن در ایران تاکنون گزارشی در مورد بیماری زا بودن مایکوباکتریوم گوردونه منتشر نشده است (۱۱، ۱۲، ۱۳).

در ایران در مطالعه های اندکی در این زمینه شده است که در غالب آنها مایکوباکتریوم فورچوئتوم ، مایکوباکتریوم شبیه چلونه ای و مایکوباکتریوم موکوژنیکوم شناسایی شدند (۱۷).

این مطالعه به صورت اولیه اهمیت آب های شرب از نظر جایگاه و منبع مایکوباکتریوم های غیرسلی به ویژه انواع بالقوه بیماری زا را نشان می دهد. نتایج این مطالعه می تواند دست مایه ای برای انجام مطالعات تکمیلی و دقیق در این زمینه باشد.

سپاسگزاری:

این مطالعه از نظر مالی توسط معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند حمایت مالی شده است. بدین وسیله نویسندگان از آن معاونت کمال تشکر را دارند.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

1. Abalain-Colloc ML, Guillerm D, Saläun M, Gouriou S, Vincent V, Picard B.. Mycobacterium szulgai isolated from a patient, a tropical fish and aquarium water. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2003;22:768-9.

2. Adékambi T, Berger P, Raoult D, Drancourt M. rpoB gene sequence-based characterization of emerging non-tuberculous mycobacteria with descriptions of Mycobacterium bolletii sp. nov., Mycobacterium phocaicum sp. nov. and Mycobacterium aubagnense sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2006;56:133-43.

3. Avumegah MS, and Wejse C. Order Hemiptera: The true host involved in Mycobacterium ulcerans transmission, or is it an innocent by-stander? PeerJ PrePrints, 2014; 8:12-15.

4. Brown-Elliott BA, and Wallace RJ. Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. Clinical microbiology reviews, 2002; 15: 716-746.

5. Colombo RE, and Olivier KN. Diagnosis and treatment of infections caused by rapidly growing mycobacteria. Seminars in respiratory and critical care medicine, 2008; pp. 577-588.

6. Covert TC, Rodgers MR, Reyes AL, and Stelma GN. Occurrence of nontuberculous mycobacteria in environmental samples. Appl Environ Microbiol, 1999; 65: 2492-2496.

7. Daley C, and Griffith D. Pulmonary non-tuberculous mycobacterial infections [Review article. 2010: The Year of the Lung. Series editor: John F. Murray]. Int J Tuberc Lung Dis, 2010; 14: 665-671.

8. Ebrahimi G, Farshidpour M, Allen MB, Mirsaeidi M, and Falkinham III JO. Nontuberculous mycobacterial disease in North America. Int J Mycobacteriol,2015; 4: 154-155.

9. Falkinham Iii J. Surrounded by mycobacteria: nontuberculous mycobacteria in the human environment. J Appl Microbiol,2009;107: 356-367.

10. Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, Holland SM, Horsburgh R, Huitt G, and Iademarco MF. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. Am J Respir Crit Care Med, 2007; 175: 367-416.

11. Hashemi-Shahraki A, Bostanabad SZ, Heidarieh P, Titov LP, Khosravi AD, Sheikhi N, Ghalami M, and Nojoumi SA. Species spectrum of nontuberculous mycobacteria isolated from suspected tuberculosis patients, identification by multi locus sequence analysis. Infect Gen Evol,2013; 20: 312-324.

12. Hashemi-Shahraki A, Darban-Sarokhalil D, Heidarieh P, Feizabadi MM, Deshmir-Salameh S, Khazaee S, and Alavi SM. Mycobacterium simiae: a possible emerging pathogen in Iran. Jpn J Infect Dis,2013; 66: 475-479.

13. Shahraki AH, Heidarieh P, Bostanabad SZ, Khosravi AD, Hashemzadeh M, Khandan S, Biranvand M, Schraufnagel DE, and Mirsaeidi M. “Multidrug-resistant tuberculosis” may be nontuberculous

www.SID.ir

Archive of SID

mycobacteria. Eur J Intern Med,2015; 26: 279-284.

14. Tabarsi P, Baghaei P, Moniri A, Marjani M, and Velayati AA. Nontuberculous mycobacterium in a tertiary tuberculosis center in Iran: Dispensation and outcome of treatment. Int J Mycobacterio, 2015; 4: 146.

15. Tamura K, Dudley J, Nei M, and Kumar S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Mol Biol Evol.,2007;24: 1596-1599.

16. Vaerewijck MJ, Huys G, Palomino JC, Swings J, and Portaels Fo. Mycobacteria in drinking water distribution systems: ecology and significance for human health. FEMS Microbiol Rev,2005; 29: 911-934.

17. Velayati AA, Farnia P, Mozafari M, and Mirsaeidi M. Nontuberculous Mycobacteria Isolation from Clinical and Environmental Samples in Iran: Twenty Years of Surveillance. BioMed Research International 2015.

18. Wolinsky E. Mycobacterial diseases other than tuberculosis. J Clin infec dis, 1992;15: 1-12.

www.SID.ir