دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی اصفهان

دانشکده پزشکی

گروه باکتری شناسی و ویروس شناسی

پایان نامه کارشناسی ارشد میکروب شناسی پزشکی

بررسی تنوع مایکوباکتریومهای آتیپیک موجود در خاک و گرد و غبار بیمارستانی و خانه‌های سالمندان شهر اصفهان با استفاده از16SrDNA sequencing

شماره طرح تحقیقاتی

۳۹۰۳۸۹

اساتید راهنما:

دکتر حسن شجاعی

نگارش: معصومه داورپناه

۹۲ بهمن

چکیده فارسی

مقدمه

شناسایی مایکوباکتریوم های آتیپیک که منبع اصلی آنها محیط بوده و به طور فزاینده ای در سالهای اخیر ادامه یافته است.بر اساس آخرین اطلاعات موجود در بانک اطلاعاتی مایکوباکتریوم ها، این جنس امروزه بیش از ۱۵۰ گونه را در بر می گیرد.

تعداد مایکوباکتریوم های شناخته شده در طول ۱۵ سال گذشته ۲ برابر شده است، تاییدی بر همین موضوع می باشد. در عین حال شواهد بالینی متعددی وجود دارد که نشان میدهد هرگونه منابع محیطی و بویژه آب و خـاک می توانند حاوی مایکـــوباکتریوم ها بوده و به عنوان منبع انتقال و انتشار عفونت به انسان تلقی می گردند.

مایکوباکتریوم های آتیپیک می توانند در خاک زنده مانده و سپس از طریق گرد و غبار انتشار یابند و افرادی که بویژه دارای شرایط زمینه ای خاص مانند ضعف سیستم ایمنی هستند را دچار عفونت نمایند. اینگونه باکتری ها و عفونت های ناشی از آنها غالباً به جهت پیچیدگی، سرعت رشد آهسته و نیازهای کشت خاص با روشهای مرسوم میکروبیولوژیک شناسایی نشده و در نتیجه عفونت ناشی از آنها اغلب مورد غفلـت قرار می گیرد.

هدف از مطالعه ی حاضر، پی بردن به تنوع مایکوباکتریوم های غیر سلی موجود در منابع خاک و گرد و غبار محیط های بیمارستانی که سلامت بیماران را تهدید می کنند.

مواد و روش ها:

تعداد ۲۱۸ نمونه از خاک و گرد و غبار بیمارستان و خانه های سالمندان در شهر اصفهان جمع اوری **شد و توسط** ستیدیل پیرادینیوم کلرایدا۵/. و سود۱/. و سدیم دی دسیل سولفات الودگی زدایی گردید.و سپس میزان ۱۰۰ میکرولیتر ان بر روی محیط لوونشتین جانسون قرار میگرفت.

ایزوله های جدا شده مایکوباکتریوم های غیر سلی در ابتدا توسط تست های فنوتیپیک رایج مانند پیگمانتاسیون،سرعت رشد،نیاسین و کاتالاز کمی تا مرحله قرار گیری در گروه رانیون شناسایی شدند.سپس بر اساس روش های مولکولی شامل بررسی تعیین توالی و انالیز قطعات ژنی *h*sp65 و قطعه تقریبا کامل ژن 16SrDNA مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج:

در این مطالعه تعداد ۲۳ ایزوله مایکوباکتریوم (۱۱٪) از ۲۱۸ نمونه خاک و گرد و غبار بیمارستانی اصفهان با استفاده از تست های فنوتیپیک و روش های مولکولی شامل بررسی تعیین تالی و انالیز قطعات ژنی *h*sp65 و تعیین توالی ژن 16SrDNA مورد شناسایی قرار گرفتند.

گونه های مورد شناسایی شامل ۱ ایزوله م. الفنتیس، ۱ ایزوله م. فلاری سنس، ۴ایزوله م. چلونه ای، ۲ایزوله م. ستنسی، ۱ ایزوله م. ارپنسی، ۱ ایزوله م. آبسوس، ۲ ایزوله م. گوردونه، ۱ ایزوله م سیمیه، ۱ ایزوله نان کروموژنیکوم، ۲ ایزوله م. لنتی فلاورم، ۲ ایزوله م. فورچوئیتم، ۱ ایزوله م. دوریکم، ۳ ایزوله م. کمماتنسی، ۱ ایزوله م. سپاهانیکوم بودند.

بحث

جدا سازی و شناسایی مایکوباکتریوم های غیر سلی از منابع خاک و گرد و غبار می تواند بیان گر این موضوع باشد که کشور ما با توجه به شرایط آب و هوایی خود می تواند زیستگاه گونه های متفاوتی از مایکوباکتریوم های غیر سلی باشد. و اگر محیط را به عنوان یک منبعی از میکروارگانیسم ها برای ایجاد بیماری های غفونی در نظر بگیریم لازم است که برخورد پاتوژن های محیطی را با انسان ودیگر میزبان های حساس تخمین بزنیم. زیرا با ظهور HIV به طور ناشناخته ای نقش مایکوباکتریوم ها پررنگ تر شده است.این باکتری ها قادر به تحمل شرایط سخت محیطی می باشند بنابراین می توانند منابع بالقوه بیماری برای انسان باشند.

نتیجه گیری

نتایج مطالعاتی که برای جداسازی مایکوباکتریوم های غیر سلی از نمونه های بالینی در کشور ما یا نقاط دیگر جهان انجام شده است، گویای این موضوع می باشد که موارد عفونت به مایکوباکتریوم های غیر سلی در حال افزایش بوده و میزان عفونت های مربوطه بسیار فراتر از تصور عمومی دست اندرکاران بهداشت عمومی جامعه می باشد.

اگر محیط را به عنوان یک منبعی از میکروارگانیسم ها برای ایجاد بیماری های عفونی در نظر بگیریم لازم است که برخورد پاتوژن های محیطی را با انسان و دیگر میزبان های حساس تخمین بزنیم. نتایج این مطالعه نشان می دهد که در محیط زیست ما در خاک و حتی گرد و غبار، تنوع بالایی از مایکوباکتریوم ها وجود دارد. که بخصوص در افراد نقص ایمنی قابل توجه می باشد.و حتی ممکن است این تنوع و فراوانی بسیار بالاتر از نتیجه این مطالعه با شد زیرا تعداد حقیقی از مایکوباکتریوم هایی که در نمونه های خاک حضور

دارند می تواند بطورقابل توجه ای بالاتراز شمارش زنده مایکوباکتریوم ها در نمونه هایی که آلودگی زدایی نشده اند باشد.

شناسایی گونه در مایکو باکتریومها تنها بر اساس تستهای فنوتیپیک و یا تعیین توالی ژن 16SrDNA چندان قابل اتکا نیست. بدین منظور برای تشخیص مطمئن و کامل گونه های مایکوباکتریوم موجود در نمونه های کلینیکی و منابع مختلف محیطی بکار بردن حداقل دو روش فنوتیپی به همراه استفاده از ازمایشات بیوشیمیایی مرسوم در شناسایی اولیه این گونه ها ی میکروبی پیشنهاد میگردد.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول – مقدمه

مقدمه..... ۱۰

تاکسونومی و طبقه بندی اکتینومیست های هوازی ۱۱

جنس مایکوباکتریوم..... ۱۱

میکروبیولوژی مایکوباکتریوم ها ۱۱

ژنوم مایکوباکتریوم ها..... ۱۲

بیماری های ناشی از عفونت با مایکوباکتریوم های غیر سلی ۱۴

اهداف و فرضیات ۱۶

فصل دوم – مواد و روشها

جمع اوری نمونه و ایزوله های مورد بررسی ۱۸

الودگی زدایی نمونه ها..... ۱۸

رنگ امیزی اسید فست..... ۱۸

ازمایشهای مرسوم بیوشیمیایی ۲۲

روش های مولکولی مورد شناسایی مایکوباکتریوم..... ۳۷

فصل سوم – نتایج

ایزوله های مایکوباکتریوم غیر سلی مورد بررسی..... ۵۲

شناسایی مولکولی ایزوله های مایکوباکتریوم..... ۵۴

استخراج DNA از ایزوله های مایکوباکتریوم ها و ارزیابی کیفی و کمی ان ۵۵

فصل چهارم - بحث و نتیجه گیری

بحث و نتیجه گیری.....۶۱

منابع.....۷۳

فهرست منابع مورد استفاده در این طرح:

1. Genus Mycobacterium- Bacterial Nomenclature Up- to- Date. 2009-7-14 retrievable from http://www. Dsmz.de/bactnom/nam3637.htm.

2. Tortoli E. Impact of genotypic studies on mycobacteria taxonomy: The new mycobacteria of the 1990s. Microbial ReU 2003; 16:319-354.

3. Kent P T Kubica G P. public health mycobacteriology: a gaide for the level III laboratory. Centers for Disease Control, U.S. Department of Heath and Human Services, Atlanta, Ga.;1985.

4. Peters m, Muller C, Rush gerdes s, seided c, Gobel u, Pohle H D and Ruf B. Isolation of Atypical mycobacteria from tap water hospital. J infect. 1995; 31.39-44.

5. Bicmen C, Coskun M, Gunduz AT, Senol G, CirakAk, Tivet G. Nontuberculous Mycobacteria isolated from pulmonary specimens between 2004 and 2009: causative agent or not? New Microbiol.2010; 33(4):399-403.

6. Ghaemi E, Ghazisaidi K, koohsari H, Khodabakshi B, Mansoorian A(2006). Environmental mycobacteria in area of high and lowtuberculosis prevalence in the Islamic Republic of Iran. EMHJ. 12: 280-285.

7. Vantrakis A, Tsintzoa A, Diamadopulos and Dapapetropoulos M. Non tuberculosis Mycobacteria in hospital water supplie. Water, Air and soil pollution. 1998; 104:331-337.

8. Primm PT, Lucero A C and Falkinham III O. Health Impacts of Environmental Mycobacteria.ClinMicrobiol Rev. 2004;17(1):98-106.

9. Toosi Z and Ellner J. Mycobacterium tuberculosis and other mycobacteria. In: Gorbach S, Bartlett J, Blacklow N, end. Infectious Disease. 1998, Philadelphia, PA: Sauders and Company,p :89-139.

10. Ghazi Saiidi K, Mohammadi M, Fatemi-Nasab FA (1998). Study ofenvironmental mycobacteria from sediments of fish breeding pools innorthern Iran and its relationship with human skin disease. Iran. J.Infect. Dis. 2: 22-25.

11. Roayaei M, Gazi-Saiidi K, Jamshidi M (1996). Isolation of mycobacteriafrom soil and patients In Ahvaz region. 2nd Iranian Congress inMicrobiology. Iran Yazd.

12. Kazda J, Pavlik, Falkinham III J O. and Hruska K. The Ecology of Mycobacteria: Impact on Animal's and Human's Health. Springer London.2000.

13. Patel J B, Leonard D G B, Pan X, Musser J M, Berman R E and Nachamkin I. Sequence- based idenfication of Mycobacterium species using the MicroSeq 500 16srDNA bacterial identification system. J. Clin Microbial. 2000; 38: 246-251.

14. Rahbar M, LameiA, Babacadeh H and AfsharYavariSH. Isolation of rapid growing Mycobacteria from soil and water in Iran. African J of Biotechnology. 2010; Vol. 9(24),p.3618-3621.

15. Adenkambi T, colson P and Drancourt M. rpoB- based identification of nonpigmented and late-pigmenting rapidly growing Mycobarteria. J Clin Microbial. 2003; 41: 5699-5708.

16. Portaels F, De Muynck A and sylla MP. Selective isolation of Mycobacteria from soil: a statistical analysis approach. J Gen Mocrobial. 1988 ; 134(3: 849-855).

17. Kent PT and Kubica GP. (1985): Public Health Mycobacteriology: a Guide for the Level III Laboratory. Centers for Disease Control, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, Ga.

18. Turenne C Y, Tschetter L, Wolfe J, et al. Necessity of quality-controlled 16s rRNA gene sequence databases: identifying to nontuberculous mycobacterium species. J Clin Microbial 2001; 39:3637-3648.

19. Goodfellow M and Wayne L. Taxonomy and nomenclature. In: Ratledge C, Stanford J, eds. The Biology of the mycobacteria Volume 1: Physiology, Identification and Classification. UK: Academic Press, 1982:471-521.

20. Devallois A, Goh k S and Rastogi N. Rapid identification of mycobacteria to species level by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hsp*65 gene and proposition of an algorithm to differentiate 34 mycobacterial species. J Clin Microbial 1997;35:2969-2973.

21. Ringuet H, Koua-Koffi C, Honore S, et al. *hsp*65 sequencing for identification of Rapidly growing mycobacteria. J Clin Microbial 1999;37:852-857.

22. Shojaei H, Magee JG, Freeman R, Yates M, HoradagodaNU, Goodfellow M. *Mycobacterium novacastrense*sp. Nov, a rapidly growing photochromogenic mycobacterium. Int J syst bacterial. 1997; 47: 1205-7.

23. Pitcher D G, Saunders N A& Owen R J. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate, *Letters in Applied Microbiol.* 1989; pp. 151–156.

24.Kirschner P, Springer B, Vogal U, et al. Genotypic indetification of mycobacteria by nucleic acid sequence determination: report of a 2-year experience in a clinical laboratory. J Clin Microbial 1993; 31:2882-2889.

25. Williams K J, Ling C L, Jenkins C, et al. A paradigm for the molecular identification of Mycobacterium species in a routine diagnostic laboratory. J Clin Microbial 2007; 56:589-602.

26. Could J L, Neall H, Rosenberry R, Turenne C Y, Jama M, Hillyard D R and Carroll K C. Identification of *Mycobacterium spp.* By using a commercial 16S ribosomal DNA sequencing kit and additional sequencinglibraries. J ClinMicrobiol. 2002; 40: 400-406.

27. Hall L, Doerr K A, Wohlfiel S L and Roberts G D, Evalution of the MicroSeq system for idenftification of Mycobarteria by 16S ribosomal DNA sequencing and its integration into a routine clinical Mycobacteriologylaboratory. J ClinMicrobiol. 2003;41: 1447-1453.

28. Khan IU andYadav JS. Development of a singl-tube, cell lysis- based, genus- specific PCR method for rapid identification of Mycobacteria: optimoization of cell lysis, PCR primers and conditions, and restriction pattern analysis. J clinMicrobiol. 2004; 42:453-7

29. Brook RW, Parker BC, Gruft H, Falkinham JO (1984). Epidemiology ofinfections by nontuberculous mycobacteria Numbers in eastern United States soils and correlation with soil characteristics. Am. Rev.Resp. Dis. 130: 630-633.

30. Chilima BZ, Clark IM, Floyd S, Fine PE, Hirsch PR (2006). Distributionof environmental mycobacteria in Karonga District Northern Malawi.Appl. Environ. Microbiol. 72: 2243-2250

31. Dawson D J. Mycobacterial terminology. J Clin Microbiol. 2000:38: 3913.

32. Kamala T, Paramasivan CN, Herbert D, Venkatesan P, Prabhakar R (1994). Evaluation of procedures for isolation mycobacteria from soiland water. Appl. Environ. Microbial. 60: 1021-1024.

33. Rogall T, wolters J, flohr T, et al. towards a phylogeny and definition of species at the molecular level within the genus Mycobacterium. Int J syst bacterial 1990; 40:323-30.

34. D, Chauhan DS, Sharma VD, Chauhan A, Chauhan SV, Katoch VM (2004). Optimization of procedures for isolationof mycobacteria from soil and water samples obtained in northern India.Appl Environ Microbiol. 2004: 70: 3751.

35. Chun J. Computer Assisted Classification and identification of Actinomycetes. 1995. Department of Microbiology. The Medical School Newcastle upon Tyne England-UK.

36. Kim S H, Shim T S, et al. for differentiation of Mycobacterium species analysis of the heat-shock Protein 65 gene (*hsp*65). Int J Syst EUol Mivrobiol 2005; 55:1649-1656.

37. Griffith D, Girard W and Wallace R J. Clinical features of pulmonary disease caused by rapidly growing mycobacteria. Am ReU respir Dis 1993; 147:1271-1278.

38. Brown-Elliott B and Wallace R J. Clinical and taxonomic sotatus of pathogenic nonpigmented or late pigmenting rapidly growing mycobacteria. Clin Microbial ReU 2002; 15:716-746.

39. O' Brien R, Geiter L and Snider D. of the epidemiology to non tuberculous mycobacteria disease in United state: results form a nation survey. . Am ReU respir Dis 1987; 135:1007-1014.

40. Katoch VM. Infection due to non-tuberculous mycobacteria (NTM). Indian J Med Res 2004; 120:290-304.

41. Wallace, R.J. Jr (1994) Recent changes in taxonomy and diseasemanifestations of the rapidly growing mycobacteria.Eur J Clin Microbiol Infect Dis 13, 953–960.

42. Wallace, R.J. Jr, Brown, B.A. and Griffith, D.E. (1998) Nosocomialoutbreaks/pseudo-outbreaks caused by nontuberculousmycobacteria. Annu Rev Microbiol 52, 453–490.

43. Wang, Y., Ogawa, M., Fukuda, K., Miyamoto, H. and Taniguchi,H. (2006) Isolation and identification of mycobacteriafrom soils at an illegal dumping site and landfills in Japan.Microbiol Immunol 50, 513–524.

44. Schulze-Ro¨bbecke, R., Janning, B. and Fischeder, R. (1992)Occurrence of mycobacteria in biofilm samples. TubercLung Dis 73, 141–144.

45. Wolinsky, E. (1979) Nontuberculous mycobacteria and associateddiseases. Am Rev Respir Dis 119, 107–159.

46.Falkinham JO. Surrounded by mycobacteria: nontuberculous mycobacteria in the human environment. Journal of AppliedMicrobiology. 2009;107:356-367.

47. Bland CS, Ireland JM, Lozano E, Alvarez ME, and Primm TP. Mycobacterial ecology of the Rio Grande. *Applied andEnvironmental Microbiology*. 2005;71:5719-5727.

48. De Groote, M.A., Pace, N.R., Fulton, K. and Falkinham,J.O. III (2006) Relationship between Mycobacteriumisolates from patients with pulmonary mycobacterialinfection and potting soils. Appl Environ Microbiol 72,7602–7606.

49.Narang R, Narang P, Mendiratta DK. Isolation and identification of nontuberculous Mycobacteria from water and soil in central India. Indian J Med Microbiol. 2009; 27(3): 247-50.

50.Yajko D M, Chin D P, Gonzalez PC, Nassos P S, Hopewell P C, Rheingold A L, Horsburgh CR, Yakrus M A, Ostroff S M and Hadley W K. *Mycobacterium avium* complex in water, food, and soil samples collected from the environment of HIV- infected individuals. J.AIDs Hum. Retrovirusses. 1995;9:176-182.

51.Chen WC, Peng CF. Isolation of non-tuberculousMycobateria from hospital cockroaches (Periplanta Americana). J Hosp Infect. 2003; 53(3):224-8.

52.Bicmen C, Coskun M, Gunduz AT, Senol G, CirakAk, Tivet G. Nontuberculous Mycobacteria isolated from pulmonary specimens between 2004 and 2009: causative agent or not? New Microbiol.2010; 33(4):399-403.

53.Tsukamura M, Mizuno S, Murate H, Nemoto H and Yugi H, comparative study of Mycobacteria from patients' room dusts and from sputa of tuberculolous patients. Jp. J Microbiol. 1974; 18:271-277.