Review
Journal of Medical Council of Iran, Volume 41, Issue 4, 2024
https://doi.org/10.22034/41.4.3

Comparison of Decontamination Methods for the Isolation of Non-Tuberculous Mycobacteria from Water Samples

Mehdi Roshdi Maleki

Department of Microbiology, Faculty of Scieneces, Malekan Branch, Islamic Azad University, Malekan, Iran

*** Corresponding Author**

Department of Microbiology, Faculty of Scieneces, Malekan Branch, Islamic Azad University, Malekan, Iran

Email: mehdiroshdi@gmail.com

Received: Apr 11 2023

Accepted: Aug 29 2023

Abstract

Background: Non-tuberculous mycobacteria (NTM) or environmental mycobacteria are diverse species that are scattered in the environment and water is one of their important reservoirs. Several factors are involved in the colonization of mycobacteria in water. Non-tuberculous mycobacteria cause a variety of diseases, especially pulmonary diseases, by being transmitted to humans. Isolation of these bacteria from environmental sources is very complicated due to the presence of other microbes. Although NTMs are resistant to some disinfectants and can be isolated from other microbes in the presence of some disinfectants, the important point here is that all mycobacteria aren't equally sensitive or resistant to disinfectants.

Methods: Various methods have been used by researchers to isolate NTM, but a standard method for this work has not been reported as yet. This study is a systematic review based on valid internal medical databases including SID, Magiran, and foreign databases such as PubMed and Scopus.

Conclusion: The search was performed with the keywords NTM, Environmental mycobacteria, and MOTT. All valid and related articles were included in the study, and effective factors in the isolation of NTM from water samples were investigated. The selection of standard medium, the optimum pH, incubation at 30 degrees Celsius, use of CPC instead of other disinfectants, use of filtration instead of centrifuge, and incubation period were effective factors in isolating NTM from water samples.

Keywords: Decontamination methods, Non-tuberculous mycobacteria, Water

Copyright 2024, Journal of Medical Council of Iran.
This work is licensed under a Creative Commons Attribution–NonCommercial 4.0 International License.

Journal of Medical Council of Iran, Volume 41, Issue 4, 2024
https://doi.org/10.22034/41.4.3

مقـــاله مروری

مقایســـه روش های آلودگـــی زدایی برای جداســـازی مایکوباکتریوم هـــای غیر توبرکلوزی از نمونه هـــای آب

مهدی رشدی ملکی

اســتادیار، گـروه میکـروبیولوژی، دانشـگاه آزاد اسلامی واحد ملکان، ملکان، ایران

*** نشانی نویسنده مسئول:**
مجتمع آموزشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ملکان، ملکان، تبریز، ایران

نشانی الکترونیک:
me.roshdi@iau.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۱/۲۲
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۶/۰۷

چکیده

زمینه: مایکوباکتریوم های غیرتوبرکلوزی (NTM: Non-Tuberculous Mycobacteria) یا مایکوباکتریوم‌های محیطی (EM: Environmental Mycobacteria) گونه‌های متنوعی هستند که در محیط پراکنده‌اند و آب یکی از مخازن مهم آنهاست. فاکتورهای متعددی در کلونیزه شدن مایکوباکتریوم‌ها در آب دخالت دارند. مایکوباکتریوم‌های غیرتوبرکلوزی بواسطهٔ انتقال به انسان موجب انواع بیماری ها بویژه بیماری های ریوی می شوند. جداسازی این باکتری ها از منابع محیطی به دلیل حضور سایر میکروب ها بسیار پیچیده است. اگرچه NTM ها به برخی عوامل ضد عفونی کننده مقاوم هستند و می‌توان در حضور برخی ضد عفونی کننده ها آنها را از سایر میکروب ها جداسازی کرد، اما نکته مهم اینجاست که تمام مایکوباکتریوم ها به یک اندازه در برابر ضد عفونی کننده ها حساس یا مقاوم نیستند.

روش کار: روش‌های مختلفی توسط محققان برای جداسازی مایکوباکتری‌های غیر سلی استفاده شده است، اما روش استانداردی برای این کار گزارش نشده است. این مطالعه یک مرور سیستماتیک بر اساس پایگاه‌های معتبر پزشکی داخلی شامل SID, Magiran و خارجی مانند PubMed و Scopus می باشد. جستجو با کلید واژه های (MOTT (Mycobacterrium Other Than Tuberculosis, Environmental Mycobacteria, NTM مایکوباکتریوم های غیرتوبرکلوزی، مایکوباکتریوم های محیطی، انجام شد. سپس تمامی مقالات معتبر و مرتبط وارد مطالعه شدند و فاکتورهای موثر در جداسازی NTM ها از نمونه های آب مورد بررسی و مطالعه قرار گرفتند.

نتیجه‌گیری: انتخاب محیط کشت استاندارد و مناسب، pH نسبتاً اسیدی محیط کشت، انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه سلسیوس، استفاده از ضد عفونی کنندهٔ CPC به جای سایر ضد عفونی‌کننده ها، استفاده از روش فیلتراسیون به جای سانتریفیوژ و مدت زمان انکوباسیون از عوامل مؤثر در جداسازی مایکوباکتریوم های غیرتوبرکلوزی از نمونه های آب می‌باشند.

واژگان کلیدی: روش های آلودگی‌زدایی، مایکوباکتریوم‌های غیرتوبرکلوزی، آب

مقدمه

به طور کلی مایکوباکتریوم‌ها به ۳ گروه اصلی تقسیم می‌شوند: ۱- مایکوباکتریوم‌هایی که باعث بیماری سل در انسان یا حیوانات می‌شوند و با هم در داخل مجموعهٔ مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (MTC) طبقه‌بندی می‌شوند. این گروه متشکل از گونه‌های کلاسیک مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، مایکوباکتریوم آفریکانوم، مایکوباکتریوم میکروتی و مایکوباکتریوم بویس (همراه با سویه باسیل کالمت-گرین یا BCG) است. همچنین مایکوباکتریوم کاپره و مایکوباکتریوم پینی پدی که به تازگی شناخته شده اند در این گروه قرار گرفته اند. ۲- مایکوباکتریوم لپرا که عامل بیماری جذام است. ۳- مایکوباکتریوم های غیر توبرکلوزی (NTM) که به آنها مایکوباکتریوم‌های غیر از باسیل سل (MOTT) یا مایکوباکتریوم های محیطی (EM) نیز می گویند (۱,۲).

در حال حاضر گروه NTM شامل بیش از ۱۵۰ گونه است که اکثریت آنها به استثناء چند مورد پاتوژن‌های فرصت طلب هستند (۳,۴). مایکوباکتریوم های محیطی در همه جا حضور دارند و مخازن مهم آنها شامل آب طبیعی، آب آشامیدنی و خاک می‌باشد. آنها از آب شرب، مخازن آب، وان حمام، شیر آب بیمارستان‌ها، یونیت های دندانپزشکی، آب سردکن ها، آب های معدنی و همچنین یخ جداسازی شده اند (۵). ماندگاری طولانی مدت مایکوباکتریوم ها در آب ناشی از دو ویژگی کلیدی این باکتری هاست. اول اینکه آنها در سیستم‌های توزیع آّب، جایی که دسترسی به مواد مغذی در آن بسیار کم است، نیاز به اکسیژن و سرعت رشد خود را کاهش می دهند. دوم آنکه دیواره سلولی بسیار آبگریز و نفوذ ناپذیر، آنها را در برابر مواد ضدعفونی کننده محافظت می‌کند و منجر به اتصال آنها به سطوح و تشکیل بیوفیلم می‌شود. نقش آب آشامیدنی در انتقال بیماری قبلا بررسی شده و ارتباط بین گونه‌های جدا شده از بیماران و آب خانگی با استفاده از روش‌های ژنوتیپی به اثبات رسیده است (۶). مایکوباکتریوم‌های غیر توبرکلوزی در منابع آب شرب کلونیزه شده و بواسطهٔ انتقال به انسان موجب بیماری های پوستی، عفونت های بافت نرم و علی الخصوص بیماری های دستگاه تنفسی می‌شوند. بسیاری از آنها نسبت به درجه حرات بالا مقاوم هستند و نشان داده شده که محیط سر دوش حمام غنی از ارگانیسم های تشکیل دهندهٔ بیوفیلم از جمله مایکوباکتریوم ها است (۷). بنابراین استنشاق آئروسل‌های ایجاد شده بوسیلهٔ سر دوش حمام مسیر مهمی برای کسب عفونت های ناشی از NTM ها است و احتمالاً استفاده از دوش به جای وان، عامل افزایش جهانی عفونت های ریوی بواسطهٔ این باکتری می باشد (۸). کودکان، بزرگسالان، افراد دارای نقص سیستم ایمنی و بیماران مبتلا به بیماری‌های ریوی مزمن در معرض خطر بالاتری از این عفونت قرار دارند (۹). اگرچه بیش از ۱۵۰ گونهٔ مختلف از مایکوباکتریوم های محیطی شناسایی شده اند اما شایعترین علت عفونت‌های ریوی مجموعهٔ مایکوباکتریوم آویوم (MAC)، مایکوباکتریوم کانزاسی و مایکوباکتریوم آبسسوس هستند (۳,۱۰). گونه‌های متعددی از NTM بویژه گونه‌های تند رشد موجب عفونت در بیماران تحت دیالیز می‌شوند. این عفونت ها بوسیلهٔ محلولهای آبی آلوده و یا بواسطه استفاده از آب آشامیدنی حاوی NTM در پردازش فیلترهای همودیالیز ایجاد می‌شوند. مایکوباکتریوم فورچوئیتوم در بیماران تحت دیالیز صفاقی نیز موجب عفونت بیمارستانی می‌شود. بیماری‌های ناشی از مایکوباکتریوم‌های محیطی رو به افزایش است و محققین قدرت بیماری زایی NTM ها را کمتر از مجموعهٔ MTC نمی‌دانند.

جداسازی و شناخت مایکوباکتریوم ها و آگاهی از چگونگی پراکندگی این گونه‌ها و تشخیص گونهٔ غالب در نواحی مختلف جغرافیایی به دلیل متفاوت بودن استراتژی درمان بیماری‌های ناشی از آنها ضروری بوده و یکی از مباحث اساسی مایکوباکتریوم ها در سالهای اخیر بوده است و لذا لازم است مورد توجه جدی قرار گیرد (۱۱). روش‌های زیادی برای جداسازی مایکوباکتریوم‌های محیطی از آب توسط پژوهشگران مختلف گزارش شده، اما تاکنون یک روش استانداردی برای جداسازی آنها ارائه نشده است (۱۲). هدف از این تحقیق، بررسی روش‌های مختلف جداسازی مایکوباکتریوم‌ها از نمونه های آب از نظر آلوده زدایی، دمای انکوباسیون و سایر فاکتورها و ارائه یک روش ایده آل می‌باشد. برای این منظور مقالات مرتبط با جداسازی NTM ها از نمونه‌های آب در پایگاه های معتبر پزشکی داخلی شامل SID، Magiran و پایگاه‌های معتبر خارجی مانند Scopus، PubMed، Elsevier، مورد جستجو قرار گرفتند. جستجو با کلید واژه‌هایNTM Environmental Mycobacteria MOTT، مایکوباکتریوم های غیرتوبرکلوزی و مایکوباکتریوم های محیطی انجام شد. سپس تمامی مقالات معتبر و مرتبط که بین سال های ۱۹۹۰ تا ۲۰۲۲ چاپ شده بودند وارد مطالعه شدند و فاکتورهای موثر در جداسازی NTM ها از نمونه های آب مورد بررسی و مطالعه قرار گرفتند.

عوامل مؤثر در کلونیزاسیون مایکوباکتریوم ها در لوله های شیر آب آب یکی از مخازن مهم مایکوباکتریوم های محیطی است. دما، pH، کیفیت شیمیایی آب و همچنین در دسترس بودن مواد مغذی، از جمله عواملی هستند که حضور و تنوع گونه های مایکوباکتریوم در آب را تحت تاثیر قرار می‌دهند (۸). مطالعه بر روی آب های آشامیدنی نشان داده که برخی از گونه‌های NTM مانند *M.xenopi* و *M. kansasii* تنها از سیستم های توزیع آب آشامیدنی جدا شده اند. سیستم های قدیمی‌تر توزیع آب میزان بالاتری از کلونیزاسیون NTM ها را دارند اما شیوع عفونت های بیمارستانی در ارتباط با NTM از سیستم‌های تازه توزیع آب نیز گزارش شده است. بررسی طیف وسیعی از سیستم‌های توزیع آب نشان داده است که صرف

نظر از مدت زمان تماس، لوله های پلاستیکی در مقایسه با مواد دیگر چگالی بالاتری از NTM را دارند. بالاترین میزان کلونیزاسیون NTM در سیستم‌های آب آشامیدنی بیمارستان ها، سیستم همودیالیز و مطب‌های دندانپزشکی پیدا شده است (با نرخ بین ۶۰٪ تا ۱۰۰٪). کلونیزاسیون M. avium در سیستم های آب گردشی در بیمارستان ها احتمالا بیشتر از سیستم های آب غیر چرخشی است. همچنین میزان کلونیزاسیون در آب گرم بیشتر از آب سرد است و نشان داده شده که سر دوش حمام بیشترین تعداد ارگانیسم M. avium را دارد. کاهش دمای آب داغ از ۷۰ درجه سلسیوس به ۵۰ درجه سلسیوس یک عامل کمک کننده به افزایش تعداد کلونیزاسیون M. avium در نظر شده است. M. avium و M. xenopi غالباً از منابع آب گرم بیمارستان‌ها جدا شده‌اند که نشان دهندهٔ بهینه دمای رشد این ارگانیسم هاست. در حالیکه M. kansasii غالبا از منابع آب سرد جدا سازی شده است (۱۰،۱۳).

در مقایسه با سایر باکتری‌ها، مایکوباکتریوم‌ها به دلیل داشتن دیوارهٔ سلولی بسیار آبگریز و نفوذناپذیر، مقاومت بالایی به مواد ضد عفونی‌کننده از قبیل کلر نشان می‌دهند. از طرفی با تشکیل بیوفیلم مقاومت آنها در برابر ضد عفونی کننده‌ها افزایش می‌یابد. بطور کلی مقاومت NTMها به کلر بیش از ۴۰ برابر سودوموناس آئروژینوزا و ۱۰۰ برابر *E. coli* است (۱۴-۱۷). در یک مطالعه میزان مقاومت مایکوباکتریوم های محیطی جدا شده از سیستم های توزیع آب نسبت به کلر مورد ارزیابی قرار گرفته است که در آن *M.fortuitum* و *M. chelonae* مقاوم ترین و *M. gordonae* و *M. aurum* حساس ترین گونه ها گزارش شده اند. با این حال *M. aurum* و *M. gordonae* به ترتیب ۱۰۰ برابر و ۳۳۰ برابر مقاوم تر از *E. coli* نسبت به کلر بوده اند (۱۸). اگرچه در آزمایشگاه برای کشت NTM ها از محیط های غنی استفاده می‌شود، اما آنها قادر هستند در غلظت های پایین ماده آلی (۵۰ میلی گرم کربن آلی قابل جذب در هر لیتر) رشد کنند (۱۷). مایکوباکتریوم ها این توانایی را دارند در جایی که دسترسی به مواد مغذی بسیار کم است نیاز به اکسیژن و سرعت رشد خود را کاهش دهند و این ویژگی اساس ماندگاری طولانی مدت آنها در محیط های ناسازگار است (۹). مایکوباکتریوم ها و لژیونلا نموفیلا اکولوژی مشابهی در سیستم های توزیع آب شهری دارند و آن تعامل با تک یاخته‌های موجود در آب و همچنین تشکیل بیوفیلم است. بنابراین عامل دیگر بقای مایکوباکتریوم‌ها ارتباط آن با آمیب‌ها با زندگی آزاد و دیگر پروتوزوآها است (۶). پروتوزوآها و ماکروفاژهای پستانداران صفات مشترکی دارند، لذا شواهدی وجود دارد که باکتری هایی که اخیراً درون پروتوزوآ بوده اند خاصیت بیماری‌زایی آنها بیش از باکتری‌های آزادزی است. لذا این مساله می‌تواند تایید کننده این فرضیه باشد که رشد باکتری در درون پروتوزوآ شرایط را برای عفونت ماکروفاژهای انسانی مهیا می‌کند (۴،۱۲،۱۹،۲۰).

روش های جداسازی مایکوباکتریوم های محیطی

جداسازی مایکوباکتریوم‌ها از نمونه‌های آب شرب و آب محیطی اولین بار در اوایل سال ۱۹۰۰ میلادی گزارش شد، هر چند این مایکوباکتریوم‌ها در ۳ دههٔ گذشته به عنوان پاتوژن برای انسان شناخته شده‌اند (۲۱،۲۲). جداسازی این باکتری‌ها عموماً بخاطر زمان تقسیم طولانی مشکل است و اگر روش مناسبی برای جداسازی آنها انتخاب نشود ارگانیسم های مرتبط (آلاینده ها) قبل از اینکه مایکوباکتریوم ها رشد کنند محیط را آلوده خواهند کرد (۲۳). اگرچه مایکوباکتریوم‌ها نسبت به برخی عوامل ضد عفونی کننده مقاوم هستند و از این خاصیت می توان در جداسازی آنها از سایر باکتری ها استفاده نمود ولی باید به این نکته توجه داشت که اولا تمامی مایکوباکتریوم‌ها به یک اندازه نسبت به مواد ضد عفونی‌کننده مقاوم نیستند. ثانیاً برخی آلاینده ها نظیر سودوموناس نیز در محیط حضور دارند که آنها هم به مواد ضد میکروبی مقاوم بودند و می توانند در جداسازی NTMها مشکل ساز باشند و محیطها را آلوده کنند. تعدادی از روش‌های ضدعفونی‌کننده از جمله روش Petroff و N- NALC-NaOH استیل (L- سیستئین سدیم هیدروکساید) برای جداسازی عامل بیماری سل (مایکوباکتریوم توبرکلوزیس) از نمونه‌های بالینی بصورت روتین استفاده می‌شوند. اما جداسازی مایکوباکتریوم از نمونه های محیطی به جهت حضور سایر میکروب ها از حساسیت بالایی برخوردار است و نیاز به یک روش دقیق دارد. به عبارتی، استفاده از یک روش غیر دقیق منجر به رشد بیش از حد آلاینده‌ها و از سویی دیگر بکارگیری یک روش سخت گیرانه مانع جداسازی مایکوباکتریوم ها خواهد شد (۲۴). بنابراین جداسازی مایکوباکتریوم ها از نمونه های محیطی نیاز به یک روش دقیقی دارد که نه تنها از رشد باکتری های مزاحم جلوگیری کند بلکه شرایط رشد را برای مایکوباکتریوم های محیطی محدود نکند (۲۵). مطالعات متعددی توسط پژوهشگران مختلف به منظور تعیین بهترین روش آلودگی‌زدایی نمونه های آب برای جداسازی مایکوباکتریوم های غیرتوبرکلوزی انجام شده است اما تا بحال یک روش استانداردی برای این منظور پیشنهاد نشده است. هیدروکسید سدیم (NaOH)، فرمالدئید (HCHO)، ستیل پیریدینیوم کلراید (CPC)، سدیم لوریل سولفات (SLS)، سدیم دودسیل سولفات (SDS)، PBS، ستریماید، اگزالیک اسید، اسید سولفوریک و NALC-NaOH از جمله مواد ضدعفونی کننده ای هستند که در غلظت های مختلف برای جداسازی مایکوباکتریوم‌ها از نمونه های آب مورد استفاده قرار گرفته اند. (۳۳-۱۷،۲۱-۱۰،۱۳).

مقاومت ذاتی بسیاری از مایکوباکتریوم‌ها به قلیاها اجازه داده تا از ۴٪ NaOH به منظور حذف آلوده کننده ها استفاده شود. آلودگی زدایی با ۱٪ NaOH به همراه ۳٪ SLS در مقایسه با استفاده از غلظت‌های بالاتر NaOH روش مؤثر دیگری بوده که در جداسازی NTM ها

از نمونه های محیطی مورد استفاده قرار گرفته است (۴,۱۷,۲۶). در جدول ۱ تعدادی از روش‌های آلودگی‌زدایی نمونه های آب با هدف جداسازی مایکوباکتریوم های غیرتوبرکلوزی نشان داده شده است.

جدول ۱. روش های ضد عفونی نمونه های آب با هدف جداسازی مایکوباکتریوم های غیرتوبرکلوزی

نویسندگان	مادهٔ ضدعفونی کننده	روش جداسازی	نتیجه	منبع
Kamala و همکاران	NaOH ٪۴	فیلتراسیون و سانتریفیوژ	۱۳ مایکوباکتریوم متعلق به ۳ گونه جداسازی شد	۲۵
	SLS ٪۳ + NaOH ٪۱		۲۱ مایکوباکتریوم متعلق به ۷ گونه جداسازی شد	
Roshdi Maleki و همکاران	CPC ۰/۰۱٪	فیلتراسیون	۸۷ مایکوباکتریوم متعلق به ۱۳ گونه	۲۶
Parashar و همکاران	SDS ۳٪ + NaOH ۱٪	سانتریفیوژ	هیچ مایکوباکتریومی جداسازی نشد – میزان آلودگی ٪ ۱۰۰	۲۷
	SDS ۳٪ + NaOH ۲٪		گونه های کمی جداسازی شدند – میزان آلودگی بالا	
	SDS ۳٪ + NaOH ۴٪		گونه های کمی جداسازی شدند و رضایت بخش نبود	
	SDS ۳٪ + NaOH ۴٪ + cetrimide ۱٪		میزان آلودگی ٪۵۰ - رضایت بخش نبود	
	SDS ۳٪ + NaOH ۴٪ + cetrimide ۲٪		میزان آلودگی صفر و گونه های زیادی جداسازی شدند. زمانبر و هزینه بر	
Narang و همکاران	NaOH ۲٪ و از تکنیک Paraffin bait	سانتریفیوژ	تنها یک گونه NTM جداسازی شد	۱۳
Gonca و همکاران	CPC ۰/۰۰۵ ٪	فیلتراسیون	از ۱۶۰ نمونه آب تنها ۳ گونه NTM جداسازی شدند	۲۸
Schulze-Röbbecke و همکاران	CPC, NaOH, HCHO در غلظت‌های مختلف	فیلتراسیون	CPC با غلظت ٪۰/۰۰۵ موثر بوده و میزان جداسازی NTMها ٪۶۴ بوده است	۲۳
Sartori و همکاران	محلول اسید سولفوریک ٪۴	سانتریفیوژ	از ۲۱۰ نمونه آب تنها ۵ گونه NTM جداسازی شد.	۲۹
Rossella و همکاران	CPC ۰/۰۴٪	فیلتراسیون		۳۰
Shin و همکاران	NaOH ۱٪	سانتریفیوژ	از ۵۰ درصد نمونه ها NTM جداسازی شد ولی تعداد پاتوژن‌ها کم بود و ٪۷۳/۳ سویه‌ها ساپروفیت بودند.	۳۱
Jitka و همکاران	HCl - NaOH	سانتریفیوژ	۲۳ درصد از نمونه ها از نظر NTM مثبت شدند و تنوع گونه ها ۱۰ تا بود.	۳۲

بحث

جداسازی و شناخت مایکوباکتریوم ها و آگاهی از چگونگی پراکندگی این گونه‌ها و تشخیص گونهٔ غالب در نواحی مختلف جغرافیایی به دلیل متفاوت بودن استراتژی درمان بیماری‌های ناشی از آنها ضروری بوده و لازم است مورد توجه جدی قرار گیرد. استفاده از یک روش غیر دقیق در جداسازی NTM ها می‌تواند منجر به رشد بیش از حد آلوده کننده ها شود. از طرف دیگر، استفاده از یک روش به شدت سختگیرانه می تواند منجر به از دست دادن مایکوباکتریوم ها شود. جداسازی NTM ها شامل ۳ مرحلهٔ پاکسازی از ذرات معلق،

آلودگی‌زدایی و تغلیظ بوده که مرحلهٔ آلودگی زدایی یک نگرانی عمده می باشد.

بطور کلی جداسازی مایکوباکتریوم ها از نمونه های آب بر اساس ۲ روش فیلتراسیون و سانتریفیوژ انجام می‌گیرد. حجم های متفاوتی از آب (۵۰ میلی لیتر تا ۱۰۰ لیتر در موارد نادر) به منظور کشت و استخراج DNA در مطالعات مختلف مورد استفاده قرار گرفته است. به لحاظ محدود بودن سانتریفیوژ آب در حجم های بالا، در اغلب مطالعات روش فیلتراسیون نسبت به روش سانتریفیوژ ترجیح داده شده است (۲۵).

نتایج مطالعه Thomson و همکاران (۲۱) در مورد مقایسه روش‌های پردازش نمونه های آب به منظور جداسازی M.avium و M.intracellulare نشان داد که خنثی‌سازی کلر اضافی آب با تیوسولفات سدیم باعث کاهش بازده می‌شود. در نمونه‌هایی که از تیوسولفات سدیم استفاده کرده بودند هم میزان آلودگی نمونه‌ها و هم تعداد کلنی‌های مایکوباکتریوم کمتر بود. لذا از نتایج مطالعهٔ آنها می‌توان چنین استنباط کرد که ممکن است سدیم تیوسولفات در آب خاصیت ضد باکتریایی داشته باشد و احتمالا باعث تولید گوگرد در آب شود و به نظر می رسد در جداسازی مایکوباکتریوم‌ها از نمونه های آب، افزودن تیوسولفات سدیم چندان ضروری نباشد.

Schulze-Robbecke و همکاران (۲۳)، سه مادهٔ ضد عفونی کنندهٔ CPC، NaOH و HCHO را در غلظت های مختلف برای جداسازی مایکوباکتریوم های محیطی از آلاینده های بالقوه و همچنین از نمونه های آب شرب مورد مقایسه قرار دادند و استفاده از ضد عفونی کننده CPC با غلظت ۰/۰۰۵% به مدت ۳۰ دقیقه را مؤثرترین روش (درصد جداسازی ۶۴%) پیشنهاد کردند. آنها پیشنهاد دادند که اگر هدف، جداسازی مایکوباکتریوم فورچوئیتوم و مایکوباکتریوم چلونه باشد، استفاده از ۰/۵% NaOH مناسب‌تر است. Kamala و همکاران (۲۵) به منظور جداسازی مایکوباکتریوم های محیطی از نمونه های آب، ۱۳ نمونه آب را با استفاده از ۶ روش آلودگی زدایی کردند. آنها در یکی از روش ها از ۴% NaOH و در روش دیگر از ۳% SLS + ۱% NaOH استفاده کردند که تعداد و تنوع گونه های ایزوله شده از ۱۳ نمونه یکسان، کاملاً متفاوت بود. در استفاده از ۴% NaOH تنها ۱۳ مایکوباکتریوم جداسازی شد که متعلق به ۳ گونه بود. ولی در استفاده از ۳% SLS به همراه ۱% NaOH، ۲۱ مایکوباکتریوم جداسازی شده بود که متعلق به ۷ گونه بود. به عبارتی، روش استفاده از لوریل سولفات سدیم ۳ درصد در ترکیب با ۱% NaoH نتایج مثبت بهتری نسبت به روش های دیگر داشت. Parashar و همکاران (۲۷) برای جداسازی مایکوباکتریوم های محیطی از نمونه های آب چندین مواد ضد عفونی کننده را مورد مطالعه قرار دادند. در روش اول از ۳% SDS + ۱% NaOH استفاده نمودند. در این روش نه تنها هیچ مایکوباکتریومی جداسازی نشد بلکه تمامی نمونه‌ها آلوده شدند (درصد آلودگی ۱۰۰%). در روش دوم بجای ۱% NaOH از ۲% NaOH استفاده کردند که در این روش میزان آلودگی ۶۲/۵% بود و گونه‌های کمی جداسازی شدند. در روش سوم از ۳% SDS به همراه ۴% NaOH استفاده کردند که این روش نیز چندان رضایت‌بخش نبود زیرا ۵۶/۲ نمونه آلوده شدند و تعداد گونه های ایزوله شده نیز کم بود. در روش چهارم به ۳% SDS و ۴% NaOH، ستریماید ۱% (Cetrimide ۱%) نیز اضافه شد اما در این روش نیز ۵۰% نمونه ها آلوده شده بودند و رضایت بخش نبود. در روش آخر به جای ۱% Cetrimide از Cetrimide ۲% استفاده کردند. در این روش درصد نمونه های آلوده به عدد صفر رسید و گونه‌های زیادی از مایکوباکتریوم‌های محیطی نیز جداسازی شدند. اگرچه در روش آخر میزان آلودگی صفر درصد بود و تنوع بیشتری از مایکوباکتریوم ها نیز جداسازی شدند اما خالی از اشکال نیز نبود. اول آنکه زمان بر بود و برای کار بر روی یک نمونه، حداقل ۲/۵ ساعت زمان نیاز بود. دوم اینکه به سانتریفیوژ یخچال داری نیاز بود که ۵۰ سی سی آب را با دور g ×۸۰۰۰ سانتریفیوژ کند و چنین سانتریفیوژی ممکن است در هر آزمایشگاهی در دسترس نباشد. لذا به روشی نیاز بود که اولاً مقرون به صرفه باشد و ثانیاً در آزمایشگاه‌های با امکانات معمولی نیز قابل انجام باشد. Narang و همکاران (۱۳) با استفاده از تکنیک Paraffin bait از ۲۵ نمونه آب آشامیدنی مورد مطالعه تنها یک گونه را جداسازی کردند. این سیستم همانند یک محیط انتخابی برای مایکوباکتریوم های محیطی است و بر این اصل استوار است که با استفاده از پارافین، ارگانیسم های استفاده کننده از این ماده یا ارگانیسم های پارافین دوست از موم پارافین به عنوان تنها منبع کربن در یک محیط بر پایهٔ نمک (Czapek Broth) که عاری از هر منبع کربن دیگر است قرار داده می شوند. این تکنیک علاوه بر مایکوباکتریوم های محیطی به ارگانیسم هایی مانند نوکاردیا و رودوکوکوس نیز اجازه رشد می دهد. مقیم و همکاران (۱۴) تعداد ۸۵ نمونه از منابع مختلف آب اصفهان که ۲۲ نمونه آن از نوع آب شرب بود را با ۰/۰۵% CPC در مدت زمان ۳۰ دقیقه آلوده زدایی کردند که تعداد ۹ نمونه (۴۱%) مثبت گزارش شدند. Jitka و همکاران (۳۲) تعداد ۳۹۶ نمونه آب آشامیدنی را از نظر وجود مایکوباکتریوم مورد مطالعه قرار دادند. آنها در مطالعهٔ خود برای حذف سایر میکروارگانیسم ها از اسیدکلریدریک–سود (HCl–NaOH) استفاده کردند. در مطالعه آنها بیش از یک سوم نمونه‌ها (تعداد ۳۸ نمونه یا ۳۴/۹%) از نظر مایکوباکتریوم مثبت بودند. Rossella و همکاران (۳۰) سیستم های توزیع آب آشامیدنی خانه‌ها و بیمارستان‌ها در دو شهر کالابریا و لاتیوم را از نظر وجود مایکوباکتریوم بررسی کردند. آنها در مطالعهٔ خود از مادهٔ ضد عفونی کنندهٔ CPC با غلظت ۰/۰۴% استفاده کردند. در مطالعهٔ آنها ۶۰% آبهای جمع آوری شده از خانه ها و ۷۳% نمونه های آب جمع آوری شده از بیمارستان ها از نظر

وجود مایکوباکتریوم مثبت گزارش شدند. Gonca و همکاران (۲۸) در کشور ترکیه برای جداسازی مایکوباکتریوم های محیطی از نمونه های آب بیمارستان ها، از ضدعفونی کننده ستیل پریدینیوم کلراید (CPC) با غلظت ۰/۰۰۵% استفاده کردند. آنها از ۱۶۰ نمونه آب شیر تنها ۳ گونه مایکوباکتریوم (مایکوباکتریوم لنتیفلاووم، مایکوباکتریوم گوردونه و مایکوباکتریوم پرگرینوم) را جداسازی کردند. Roshdi Maleki و همکاران (۲۶,۳۳) برای جداسازی NTM از نمونه‌های آب بیمارستانی از CPC ۰/۰۱% برای آلودگی زدایی نمونه ها استفاده کردند. آنها از ۱۲۰ نمونه آب موفق به جداسازی ۸۷ نمونه NTM شدند که متعلق به ۱۳ گونه بودند. Sartori و همکاران (۲۹) تعداد ۲۱۰ نمونه آب دیالیز را به منظور جداسازی مایکوباکتریوم های محیطی مورد آزمایش قرار دادند و در مرحلهٔ آلوده زدایی از اسید سولفوریک ۴% استفاده کردند. در مطالعهٔ آنها ۵۱ نمونه از نظر وجود NTM مثبت. ۱۴۳ نمونه NTM منفی و تعداد ۱۶ نمونه توسط سایر باکتری ها آلوده شده بودند.

در کشور کره جنوبی، Shin و همکاران (۳۱) با بررسی تعداد ۱۵۰ نمونه آب که از بخش‌های مختلف بیمارستان جمع آوری کرده بودند، در مجموع، ۶۰ سویه NTM از ۵۰ نمونه آب جداسازی کردند. ۷۳/۳% مایکوباکتریوم های جدا شده توسط این محققان ساپروفیت، ۲۱/۷% پاتوژن بالقوه و ۵% ناشناخته بودند. آنها در مطالعه خود برای آلودگی‌زدایی از NaOH ۱% استفاده کرده بودند.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج بدست آمده تحقیقات قبلی، چنین استنباط می‌شود که آلودگی زدایی نمونه های آب به منظور جداسازی مایکوباکتریوم های غیرتوبرکلوزی از حساسیت بالایی برخوردار است و ضد عفونی کنندهٔ ستیل پریدینیوم کلراید (CPC) بهتر از سایر ضد عفونی کننده ها موثر می باشد. غلظت ۰/۰۲% ستیل پریدینیوم کلراید مناسبترین غلظت در جداسازی از نمونه های آب شرب در مدت ۳۰ دقیقه است. در جداسازی مایکوباکتریوم از نمونه های آب شرب خنثی سازی کلر اضافی آب با تیوسولفات چندان ضرروی نیست و ممکن است باعث کاهش بازده شود. مایکوباکتریوم های محیطی برخلاف مجموعه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس که pH خنثی (Ph=۷) برایشان مطلوب است، pH حدود ۵/۵ –۶/۵ را ترجیح می‌دهند. بنابراین بهتر است pH محیط کشت لوانشتاین جانسون (LJ) را کمی اسیدی تنظیم کرد که با HCl نرمال قابل انجام است. بهینه دما انکوباسیون برای جداسازی مایکوباکتریوم های محیطی ۳۰ درجه سانتیگراد است. البته باید در نظر داشت که برخی از گونه ها به دمای خاصی نیاز دارند. به عنوان مثال M. xenopi در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد کلنی تشکیل نمی‌دهد و برای جداسازی آن بایستی از دمای انکوباسیون ۴۰ تا ۴۵ درجه سانتیگراد استفاده نمود. روش فیلتراسیون (استفاده از فیلترهای غشایی با قطر منافذ ۰/۴۵ میکرون) در مقایسه با روش سانتریفیوژ از حساسیت بالایی برخوردار است ضد عفونی کننده CPC علاوه بر آنکه برای کاهش رشد آلاینده ها مؤثر است، می تواند در غلظت های بالا (۰/۰۵%) بطور قابل توجهی موجب کاهش تعداد مایکوباکتریوم‌ها شود. برای جداسازی مایکوباکتریوم‌ها از نمونه های آب، عملکرد محیط کشت LJ نسبت به سایر محیط ها برتر گزارش شده است.پ

تضاد منافع

تضاد منافع وجود ندارد.

منابع

1. Vasconcellos SE, Huard RC, Niemann S, Kremer K, Santos AR, Suffys PN, et al. Distinct genotypic profiles of the two major clades of Mycobacterium africanum. BMC Infect Dis. 2010;10:80.

2. Weiss CH, Glassroth J. Pulmonary disease caused by nontuberculous mycobacteria. Expert Rev Respir Med. 2012;6(6):597-612; quiz 3.

3. Johnson MM, Odell JA. Nontuberculous mycobacterial pulmonary infections. J Thorac Dis. 2014;6(3):210-20.

4. Falkinham Iii JO. The biology of environmental mycobacteria. Environ Microbiol Rep. 2009;1(6):477-87.

5. Halstrom S, Price P, Thomson R. Review: Environmental mycobacteria as a cause of human infection. International Journal of Mycobacteriology.4(2):81-91.

6. Whiley H, Keegan A, Giglio S, Bentham R. Mycobacterium avium complex--the role of potable water in disease transmission. J Appl Microbiol. 2012;113(2):223-32.

7. Feazel LM, Baumgartner LK, Peterson KL, Frank DN, Harris JK, Pace NR. Opportunistic pathogens enriched in showerhead biofilms. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106(38):16393-9.

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

9. Kaevska M, Slana I. Comparison of filtering methods, filter processing and DNA extraction kits for detection of mycobacteria in water. Ann Agric Environ Med. 2015;22(3):429-32.

10. Garcia Garcia JM, Palacios Gutierrez JJ, Sanchez Antuna AA. [Respiratory infections caused by environmental mycobacteria]. Arch Bronconeumol. 2005;41(4):206-19.

11. Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, Catanzaro A, Da-

ley C, Gordin F, et al. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. Am J Respir Crit Care Med. 2007;175(4):367-416.

12. Vaerewijck MJ, Huys G, Palomino JC, Swings J, Portaels F. Mycobacteria in drinking water distribution systems: ecology and significance for human health. FEMS Microbiol Rev. 2005;29(5):911-34.

13. 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.

14. Moghim S, Sarikhani E, Nasr Esfahani B, Faghri J. Identification of Nontuberculous Mycobacteria Species Isolated from Water Samples Using Phenotypic and Molecular Methods and Determination of their Antibiotic Resistance Patterns by E- Test Method, in Isfahan, Iran. Iran J Basic Med Sci. 2012;15(5):1076-82.

15. Sebakova H, Kozisek F, Mudra R, Kaustova J, Fiedorova M, et al. Incidence of nontuberculous mycobacteria in four hot water systems using various types of disinfection. Can J Microbiol. 2008; 54: 891-898.

16. Nasr-Esfahani B, Sarikhani E, Moghim S, Faghri J, Fazeli H, et al. Molecular Characterization of Environmental Non-Tuberculous Mycobacteria Using PCR- RFLP Analysis of 441 bp Heat Shock Protein 65 Fragments. Iran J Public Health. 2012; 41: 108- 114.

17. M. S. Phillips and C. F. von Reyn. Nosocomial Infections Due to Nontuberculous Mycobacteria. Clinical Infectious Diseases 2001 Vol. 33 Issue 8 Pages 1363-74.

18. 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.

19. Falkinham JO, 3rd. Nontuberculous mycobacteria from household plumbing of patients with nontuberculous mycobacteria disease. Emerg Infect Dis. 2011;17(3):419-24.

20. Falkinham JO, III. Nontuberculous Mycobacteria: Community and Nosocomial Waterborne Opportunistic Pathogens. Clinical Microbiology Newsletter.38(1):1-7.

21. Thomson R, Carter R, Gilpin C, Coulter C, Hargreaves M. Comparison of methods for processing drinking water samples for the isolation of Mycobacterium avium and Mycobacterium intracellulare. Appl Environ Microbiol. 2008;74(10):3094-8.

22. Thomson R, Tolson C, Carter R, Coulter C, Huygens F, Hargreaves M. Isolation of nontuberculous mycobacteria (NTM) from household water and shower aerosols in patients with pulmonary disease caused by NTM. J Clin Microbiol. 2013;51(9):3006-11.

23. Schulze-Röbbecke R, Weber A, Fischeder R. Comparison of decontamination methods for the isolation of mycobacteria from drinking water samples. Journal of Microbiological Methods. 1991;14(3):177-83.

24. Kiran Tripathi, Purti C. Tripathi, Shashwati Nema, Arun Kumar Shrivastava, Kalpana Dwiwedi, Ashok Kumar Dhanvijay. Modified Petroff's Method: an Excellent Simplified Decontamination Technique in Comparison with Petroff's Method. International Journal of Recent Trends in Science and Technology.Volume 10, Issue 3, April 2014 pp 461-464.

25. Kamala T, Paramasivan CN, Herbert D, Venkatesan P, Prabhakar R. Evaluation of procedures for isolation of nontuberculous mycobacteria from soil and water. Appl Environ Microbiol. 1994;60(3):1021-4.

26. Maleki MR, Kafil HS, Harzandi N, Moaddab SR. Identification of nontuberculous mycobacteria isolated from hospital water by sequence analysis of the hsp65 and 16S rRNA genes. Journal of water and health. 2017 Oct 1;15(5):766-74.

27. Parashar D, Das R, Chauhan DS, Sharma VD, Lavania M, Yadav VS, et al. Identification of environmental mycobacteria isolated from Agra, north India by conventional & molecular approaches. Indian J Med Res. 2009;129(4):424-31.

28. Gonca E G,Elvira R,Zayre E. Isolation of nontuberculous mycobacteria from hospital waters in Turkey. APMIS. 2013 Dec;121(12):1192-7.

29. Sartori FG, Leandro LF, Montanari LB, de Souza MG, Pires RH, et al. Isolation and identification of environmental mycobacteria in the waters of a hemodialysis center. Curr Microbiol. 2013; 67: 107-111.

30. Rossella B, Maurizio S, Simonetta D L, Massimo S, Lucia B. Non-tuberculous mycobacteria and microbial populations in drinking water distribution systems. Ann Ist Super Sanita . 2010;46(3):254-8.

31. Shin JH, Lee EJ, Lee HR, Ryu SM, Kim HR, et al. Prevalence of non-tuberculous mycobacteria in a hospital environment. J Hosp Infect. 2007; 65: 143-148.

32. Jitka Ma, Michal S, Vladimir B, Iva S, Petr K. The water environment as a source of potentially pathogenic mycobacteria. J Water Health. 2014 Jun;12(2):254-63.

33. Maleki MR, Moaddab SR, Kafil HS. Hemodialysis waters as a source of potentially pathogenic mycobacteria (PPM). Desalination and Water Treatment. 2019;152:168-73.