Iranian Journal of Medical Microbiology | ISSN:2345-4342

Optimized Method for Isolation of Nontuberculous Mycobacteria from Hospital Aquatic Sources

Somayeh Moradi[1], Mohammad Javad Nasiri[2], Masoud Dadashi[3], and Davood Darban-Sarokhalil[1]

1. *Department of Microbiology, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
2. *Department of Microbiology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
3. *Department of Microbiology, School of Medicine, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran*

10.30699/ijmm.13.5.246

ABSTRACT

Background: Aquatic ecosystems are an important source of nontuberculous mycobacteria (NTM) that can cause different diseases in human. Since culture of mycobacteria needs long-term incubation, fast-growing microorganisms and contaminants in the environment usually prevents the isolation of mycobacteria. Here, we compare different treatment protocols and describe a method that increases the recovery and improve the culturability of NTM from aqueous samples.

Materials & Methods: A total of 35 samples from the water sources like tap water, and medical devices such as manometer, dialysis devices, nebulizers, ventilator and dental units were collected. Containers containing 50 mL of the sample were immediately transferred for culture on Lowenstein-Jensen medium to the laboratory and examined. For better isolation of NTM, different concentrations of NaOH, sodium dodecyl sulphate (SDS), cetylpyridinium chlorid (CPC), oxalic acid and cyclohexamide in culture media were examined.

Results: Culture media with 1% solution of NaOH, 3% SDS and 5% oxalic acid was completely effective to eliminate the contaminants and it also showed the lowest inhibitory effect on mycobacteria. The concentrations between 0.3 gr to 1 gr of cyclohexamide had the best inhibitory effect on growth of fungi.

Conclusion: Culture media with NaOH 1%, SDS 3%, 5% of oxalic acid and 0.3-1 gr cyclohexamide can increase the recovery and improve the culturability of NTM from aqueous samples.

Keywords: Nontuberculous mycobacteria, Hospital water sources, Isolation protocols

Received: 2019/09/22; **Accepted**: 2020/01/12; **Published Online:** 2020/01/27

Corresponding Information: **Davood Darban-Sarokhalil,** Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. Email: davood_darban@yahoo.com

Copyright © 2019, This is an original open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribution of the material just in noncommercial usages with proper citation.

Use your device to scan and read the article online

Moradi S, Nasiri M J, Dadashi M, Darban Sarokhalil. Optimized Method for Isolation of Nontuberculous Mycobacteria from Hospital Aquatic Sources. Iran J Med Microbiol. 2019; 13 (5) :346-354

Download citation: BibTeX | RIS | EndNote | Medlars | ProCite | Reference Manager | RefWorks

Send citation to: Mendeley Zotero RefWorks

Introduction

Nontuberculous mycobacteria (NTM) are opportunistic pathogens for humans. More than 160 species of Mycobacterium genus have been recognized and they have high variability in the aspects of virulence, adaptation to the environment, pathogenicity, drug resistance and growth characteristics **(1)**. A variety of NTM often widely dispersed in the environment can cause opportunistic infections in human **(2-4)**. Environmental resources including water, soil, dust and aerosol **(5)** and in many cases, water is a carrier of the bacteria. Most NTM infections can cause disease through contact with soil and water resources and human-to-human transmission is not reported until now [6]. Although the contact between the human and environmental mycobacteria is inevitable, the disease by NTM mostly related with skin defect, having previous

lung disease and disorders such as congenital and acquired immunodeficiency.

These bacteria are mostly resistant to antibiotics, antiseptics and disinfectants and are also considered as nosocomial pathogen **(7)**. Currently, more than 20 NTM species have been identified in drinking water that are resistant to disinfectants (such as chlorine) and also tolerate a wide range of pH and temperature. In addition, NTM can survive in pipes containing flowing water due to biofilm formation, their hydrophobicity and amoeba-associated lifestyle **(5, 8-13)**. The bacteria also were isolated from hot water systems, spas and swimming pools. Since culture of mycobacteria needs long-term incubation, fast-growing microorganisms and contaminants in the environment usually prevents the isolation of mycobacteria. For this reason, different treatment protocols were examined to increase the recovery and improve the culturability of NTM from aqueous samples.

Materials and Methods

Sample Collection

A total of 35 samples from the aquatic sources of the teaching hospitals of Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran, including tap water and medical devices such as manometer, dialysis devices, nebulizers, ventilator and dental units were collected. Approximately 50 mL of each sample was collected in a sterile glass bottle, transferred to laboratory in an icebox and examined within 24 hrs.

Sample Preparation and Culture

Water samples were centrifuged for 30 minutes at 3000 rpm. The sediment (3 mL) was transferred to two sterile containers, and was decontaminated by two methods. The first method was implemented as following: 1.5 mL of 1% NaOH and 1.5 mL of 3% SDS were added for decontamination after centrifuge and were incubated at room temperature for 30 minutes. Then, Phenolphthalein reagent and 40% phosphoric acid were added for neutralization. The tubes were then centrifuged at 3000 rpm. Supernatant was discarded and the pellet was cultured on two separate tubes containing Lowenstein Jensen (LJ) media which were then placed at 25°C and 37°C. Second method was as following: 0.05% CPC solution (cetylpyridinium chloride) with a volume equal to the sample was added after centrifugation. Samples were shaked for 20 minutes at room temperature and then centrifuged at 3000 rpm for 15 minutes and supernatant was discarded. Then, 2 mL of distilled water was added to the pellet for neutralization of the remaining CPC and was further centrifuged at 3000 rpm. Finally, pellet was cultured on two separate tubes of LJ media and placed at 25°C and 37°C. Culture media were studied every 48 h for 5 months for the possible growth of colonies. Then, Acid-fast staining was performed by Ziehl-Neelsen method which confirmed the presence of Mycobacteria. Phenotipycal characteristics and molecular method were used for confirmation **(14)**. For high contamination of samples with yeast and fungi, different concentrations of cyclohexamide were added to LJ media for primary isolation of the bacteria. Different cyclohexamide concentrations were 0.025 g, 0.05 g, 0.06 g, 0.64 g, 0.2 g, 0.3 g, 0.5 g and 1 g, were used for each 1600cc of LJ culture media.

Another treatment protocol was conducted for the isolation of colonies on contaminated LJ culture media with other bacteria or fungi by following four methods: First protocol; Mixed colonies were picked off and dissolved in 200 µL of distilled water in a sterile falcon. Then, CPC with the volume equal to the sample was added and vortexed. It was then shaken at room temperature for 30 minutes and centrifuged at 3000 rpm for 30 minutes. In the next step, supernatant was discarded and 200 µL of distilled water was added to the sample for washing and was again centrifuged at 3000 rpm for 15 minutes. Supernatant was discarded and finally, the pellet was cultured on LJ culture media containing cyclohexamide. Second protocol; Mixed colonies dissolved in 200 µL of distilled water in a sterile falcon and 1.5 mL of 1% NaOH and 1.5 mL of 3% SDS was then added. After vortexing and shaking at room temperature for 30 minutes, phenolphthalein reagent and 40% phosphoric acid were added for neutralization. Sample was then centrifuged at 3000 rpm for 30 minutes. Supernatant was discarded and the pellet was cultured on LJ media containing cyclohexamide. Third protocol; mixed colonies dissolved in 200 µL of distilled water in a sterile falcon. Then, 200 µL of 5% oxalic acid was added to the solution. After vortexing, it was shaken at room temperature for 30 minutes. At that point, sample was centrifuged at 3000 rpm for 30 minutes. Supernatant was discarded and pellet was cultured on LJ media containing cyclohexamide. Fourth protocol; mixed colonies dissolved in 200 µL of distilled water in a sterile falcon. 1.5 mL of 1% NaOH and 1.5 mL of 3% SDS were then added. After vortexing, it was shaken at room temperature for 30 minutes. Phenolphthalein reagent and 40% phosphoric acid were added for neutralization. Sample was then centrifuged at 3000 rpm for 30 minutes. Supernatant was discarded and the pellet was vortexed and 200 µL of 5% oxalic acid was added. The tube was then shaken at room temperature for 40 minutes and finally, sample was centrifuged at 3000 rpm for 30 minutes. Supernatant was discarded and the remaining pellet was cultured on LJ media containing cyclohexamide.

Also, different culture media were used for isolation of Mycobacterium colonies from contaminated LJ media. The media was including: BHI agar culture

media, MacConkey culture media, Blood agar containing nalidixic acid (0.056 gr per 1600 cc of culture media), Blood agar containing penicillin G (0.05 gr), Blood agar containing nalidixic acid and penicillin (0.056 gr and 0.05 gr, respectively), LJ culture media containing nalidixic acid, penicillin and cyclohexamide (0.02 gr per 1600 cc culture media).

Results

Among the used protocols, mycobacteria were isolated by the two methods that are shown in Table 1. Concentrations of 0.025, 0.05 and 0.06 were somewhat effective in reducing fungal and yeast contaminations but did not thoroughly prevent contamination. Concentrations of 0.64 to 0.2 eradicated more than half of the fungal and yeast contaminations and in concentrations of 0.3 g and 0.5 g no fungal contamination was observed. But in some cases, small amounts of yeast and fungal contamination were still seen which were completely removed by concentration of 1 g cyclohexamide.

Treating the contaminated colonies by 1-0.05% CPC solution and 2-1% NaOH and 3% SDS protocols did not reduced the contamination. Threating with 3-5% oxalic acid reduced the contamination but was not completely removed and after several days contamination level raised and other bacterial and yeast agents grew along with Mycobacteria. Finally, 4-1% NaOH, 3% SDS and 5% oxalic acid protocol was completely removed contamination from all the treated media and mycobacteria grew purely.

Table 1. Frequency of mycobacterial isolates in water sources of the hospitals

Sample water	Temperature	Positive	Negative	Contaminated
NAOH+SDS	37°C	19	9	7
	25°C	24	7	4
CPC 0.05	37°C	0	33	2
	25°C	8	26	1

On BHI agar, no growth was observed after two months of storage. Culture on MacConkey agar and blood agar containing nalidixic acid and penicillin. A few days after culture, Gram-negative bacteria had growth on all culture media and no growth of mycobacteria was observed. On selective LJ culture media with antibiotics, no contamination was observed and mycobacteria started growth after a month or even two months in some cases but the rate of Mycobacterial growth was lower compared to LJ media containing cyclohexamide without antibiotics (penicillin and nalidixic acid).

Discussion

Today, many studies emphasize on the necessity of identifying NTM in water and finding the suitable solution for controlling these contaminations **(14)**. There are different methods for isolation of NTM from the environment but there is a need for a standard method in order to identify the biological sources contaminated with NTM. In a study conducted by Kamala *et al.* in 1993 in India, 6 decontamination methods were used for isolation of mycobacteria from water and soil. More positive samples were detected by 3% SLS (Sodium Lauryl Sulfate) and 1% NaOH **(15)**. Also, in a study conducted by Nicolas Radomski in 2009, it was shown that decontamination with 0.05% CPC for 30 minutes and culture on rich LJ media containing PANTA, reduces the growth of unwanted bacteria significantly. It was shown that decontamination with 0.05% CPC caused termination of *Mycobacterium chelonae* (71.1%) and *Mycobacterium avium* (70%). In contrast, in a study conducted by Thomson *et al.* it was shown that using 0.005 CPC in water samples leads to the survival of 3.6% of both *M. avium* and *Mycobacterium intercellular* **(16)**. However, CPC could be used in different concentrations for samples with low (0.005%) or high (0.05%) contaminations **(17)**.

In a study by Khosravi and *et al*. in 2016 in Khuzestan province of Iran, 77 culture positive mycobacteria were isolated from 258 hospital water samples. CPC 0.005% was used for decontamination **(18)**. Moreover, in a study by Falsafi *et al.* in Iran, three methods of decontamination including 0.01% CPC, 4% NaOH and 1% NaOH+3% SDS were used and indicated that decontamination with CPC is the best method for decontamination which reduces the growth of unwanted microorganism and does not have much

inhibitory effects on NTM **(19)**. Rahbar *et al.* in Iran in 2010 were studied on 120 water samples, they were able to isolate 10% of the total samples by 0.05% CPC **(20)**.

According to the results of the current study, the use of lower concentrations of CPC was highly effective compared to 1% NaOH and 3% SDS as using 0.05% CPC resulted in less contamination and higher persistence of samples compared to NaOH and SDS. But the number samples with Mycobacterial growth was lower. Most media with CPC showed no growth which is estimated to be a result from using high concentrations of CPC which probably is more effective in lower concentrations. Meanwhile, the growth rate of mycobacteria increases by increasing cyclohexamide level in culture media and no inhibitory effect was observed in Mycobacterial growth in cyclohexamide concentration to 1 g per 1600 cc. However, concentrations of 0.3 g and 0.5 g were the most effective in the purification of NTM. Nalidixic acid was effective in the preventing the contamination of culture media and purification of mycobacteria but can somewhat prevent the growth of Mycobacteria. Nalidixic acid has the highest inhibitory effect on NTM when the number of mycobacteria is low in the sample. Therefore, it is suggested to use nalidixic acid for purification and not for primary decontamination. In many studies conducted in Iran, 1% NaOH and 3% SDS were used same as the current study. But it seems like using low concentrations of CPC is effective in the isolation of NTM and depend on sample volume.

In conclusion, the use of NaOH 1%, SDS 3%, 5% of oxalic acid and 0.3-1 gr cyclohexamide can increase the recovery and improve the culturability of NTM from aqueous samples.

Acknowledgment

This study has been supported by Deputy of Research and Technology, Iran University of Medical Sciences. Grant No: 27867-30-01-95.

Conflict of Interest

Authors declared no conflict of interests.

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۳ ـ شماره ۵ ـ آذر و دی ۱۳۹۸

Journal homepage: www.ijmm.ir

روش بهینه برای جداسازی مایکوباکتریوم‌های غیرسلی از منابع آبی بیمارستان

سمیه مرادی[۱]، محمد جواد نصیری[۲]، مسعود داداشی[۳]، داود دربان ساروخلیل[۱*]

[۱] گروه میکروب‌شناسی، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم‌پزشکی ایران، تهران، ایران

[۲] گروه میکروب‌شناسی، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم‌پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

[۳] گروه میکروب‌شناسی، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم‌پزشکی البرز، کرج، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچهٔ مقاله

دریافت: ۱۳۹۸/۰۷/۰۲

پذیرش: ۱۳۹۸/۱۰/۱۲

انتشار آنلاین: ۱۳۹۸/۱۰/۲۰

موضوع:

میکروب‌شناسی پزشکی

نویسندهٔ مسئول:

داود دربان ساروخلیل، گروه میکروب‌شناسی، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم‌پزشکی ایران، تهران، ایران

ایمیل: darban.d@iums.ac.ir

چکیده

زمینه و اهداف: اکوسیستم‌های آبی مهمترین منابع آبی برای مایکوباکتریوم‌های غیرسلی هستند که منجر به بیماری‌های مختلف در انسان می‌شوند. به دلیل انکوباسیون طولانی مدت کشت مایکوباکتریوم‌ها از منابع آبی، میکروارگانیسم‌های سریع‌الرشد و آلودگی‌های محیطی معمولا از رشد مایکوباکتریوم‌ها جلوگیری می‌کنند. در این مطالعه با مقایسهٔ روش‌های مختلف، روشی که جداسازی مایکوباکتریوم‌های غیرسلی از منابع آبی را افزایش می‌دهد بررسی شده‌اند.

مواد و روش کار: در مجموع تعداد ۳۵ نمونه از منابع آبی مانند شیر آب و سایر تجهیزات پزشکی مانند مانومتر، دستگاه دیالیز، نبولایزر، ونتیلاتور و یونیت‌های دندانپزشکی جمع‌آوری شد. پس از جمع‌آوری در فالکون ۵۰ میلی‌لیتری، نمونه‌ها جهت کشت بر روی محیط لون اشتاین جانسون سریعا به آزمایشگاه انتقال داده شدند. برای جداسازی بهتر مایکوباکتریوم‌های غیر سلی، غلظت‌های مختلف سود، سدیم دودسیل سولفات، ستیل پیریدینیوم کلراید، اسید اگزالیک و سیکلوهگزیمید ارزیابی شدند.

یافته‌ها: محلول سود ۳٪، اسید اگزالیک ۵٪ و SDS ۳٪ به‌طور کامل باکتری‌های آلوده‌کننده را حذف کرد و دارای کمترین میزان تاثیر مهاری بر روی مایکوباکتریوم‌ها بود. غلظت ۱ الی ۰/۳ گرم از سیکلوهگزیمید، بهترین اثر مهاری را بر روی رشد قارچ‌ها داشت.

نتیجه‌گیری: محیط کشت با غلظت ۱-۰/۳ گرم از سیکلوهگزیمید و تیمار با سود ۳٪، اسید اگزالیک ۵٪ و SDS ۳٪ می‌تواند جداسازی و کشت مایکوباکتریوم‌های غیر سلی از منابع آبی را افزایش دهد.

کلید واژه‌ها: مایکوباکتریوم‌های غیر سلی، منابع آبی بیمارستان، روش‌های جداسازی

کپی‌رایت © مجله میکروب شناسی پزشکی ایران: دسترسی آزاد؛ کپی برداری، توزیع و نشر برای استفاده غیرتجاری با ذکر منبع آزاد است.

مقدمه

مایکوباکتریوم‌های غیرسلی پاتوژن‌هایی فرصت‌طلب برای انسان هستند. تا به حال بیش از ۱۶۰ گونه مایکوباکتریوم شناسایی شده است و از نظر بیماری‌زایی، وفق با محیط اطراف، مقاومت آنتی بیوتیکی و خصوصیات رشد دارای تنوع بسیار زیادی هستند (۱). مجموعه‌ای از مایکوباکتریوم‌های غیر سلی در محیط هستند که می‌توانند منجر به عفونت‌های فرصت‌طلب در انسان شوند (۲-۴). منابع محیطی شامل آب، خاک، گردوغبار و ائروسل‌ها هستند و در بسیاری از موارد، آب منبع عفونت برای این باکتری‌ها به حساب می‌آید (۵). بیشتر عفونت‌های حاصله از مایکوباکتریوم‌های غیرسلی می‌تواند از طریق تماس با منابع آبی و خاکی انتقال یابد و تا به حال انتقال انسان به انسان گزارش نشده است. تماس انسان با محیط اطراف خود اجتناب‌ناپذیر است و بیماری حاصله از این باکتری‌ها بیشتر در افراد دچار جراحت پوستی، بیماری ریوی زمینه‌ای و بیماری‌های نقص ایمنی مادرزادی و اکتسابی مشاهده می‌شود (۶).

بیشتر مایکوباکتریوم‌های آتی پیک نسبت به آنتی بیوتیک ها، ضدعفونی کننده ها و گندزداها مقاوم هستند و به عنوان عوامل بیماریزای بیمارستانی در نظر گرفته می شوند (۷). در حال حاضر بیش از ۲۰ گونه مایکوباکتریوم غیرسلی در آب آشامیدنی شناسایی شده است که نسبت به ضدعفونی کننده هایی همچون کلر مقاوم هستند و همچنین طیف وسیعی از دما و pH را می توانند تحمل کنند. به علاوه این باکتری‌ها می توانند به دلیل تولید بیوفیلم، خاصیت آب گریزی و زندگی در داخل آمیب ها در لوله های حاوی آب جاری زنده بمانند. این باکتری‌ها همچنین از منابع آب گرم همچون چشمه

ها و استخرها جداسازی شده اند (۵، ۸-۱۳). به دلیل اینکه جداسازی و کشت مایکوباکتریوم‌ها نیاز به انکوباسیون طولانی مدت دارد، میکروارگانیسم‌های سریع‌الرشد و باکتری‌های آلوده کننده در محیط معمولا از رشد آنها جلوگیری می‌کنند و به همین خاطر روش‌های مختلف تیمار جهت افزایش جداسازی و کشت مایکوباکتریوم‌ها از منابع آبی مورد ارزیابی قرار گرفته است. در این مطالعه ما تلاش کردیم تا با استفاده از یک روش جدید و حجم کمی از نمونهٔ آبی، این باکتری‌ها را جداسازی کنیم.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه

در مجموع تعداد ۳۵ نمونه از منابع آبی بیمارستان‌های آموزشی دانشگاه علوم پزشکی ایران مانند شیر آب و سایر تجهیزات پزشکی مانند مانومتر، دستگاه دیالیز، نبولایزر، ونتیلاتور و یونیت‌های دندانپزشکی در طی سالهای ۱۳۹۴ الی ۱۳۹۷جمع‌آوری شد. تقریبا ۵۰ میلی‌لیتر از هر نمونه آب جمع‌آوری شد و برای آزمایش سریعا به آزمایشگاه انتقال داده شد.

آماده‌سازی نمونه و کشت

نمونه‌های آب در دور rpm۳۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ شد. رسوب (۳ میلی‌لیتر) حاصله از سانتریفوژ به دو لوله استریل انتقال داده شد و هر کدام توسط روش جداگانه‌ای آلودگی‌زدایی شد. در روش اول، پس از سانتریفیوژ به میزان ۱/۵ میلی‌لیتر سود ۱٪ و ۱/۵ میلی‌لیتر SDS ۳٪ جهت الودگی زدایی اضافه و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق همراه با تکان دادن انکوبه شد. در مرحله بعد با اضافه کردن معرف فنل فتالئین و اسید فسفوریک ۴۰٪ خنثی‌سازی صورت گرفت. سپس نمونه‌ها به مدت۳۰ دقیقه با دور rpm۳۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. مایع رویی دور ریخته و سپس رسوب باقی مانده در دو لولهٔ مجزا حاوی محیط کشت لوون اشتاین جانسون (LJ) کشت داده شد و هر کدام در دمای ۳۷ و ۲۵ درجه سلسیوس قرار داده شد. روش دوم به این صورت بود که پس از سانتریفیوژ، به اندازهٔ هم حجم نمونه محلول CPC ۰/۰۵٪ (cetylpyridiniumchloride) اضافه شد، نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای محیط همراه با تکان دادن انکوبه شد و سپس با دور rpm۳۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از دور ریختن مایع رویی، به رسوب حاصله ۲ میلی‌لیتر آب مقطر استریل جهت خنثی‌سازی باقی مانده CPC اضافه شد. سپس با دور rpm۳۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و در نهایت رسوب باقی‌مانده در دو لولهٔ مجزا حاوی محیط کشت LJ کشت داده شد و در دو دمای ۳۷ و ۲۵ درجه سلسیوس قرار داده شد. محیط‌های کشت یک روز در میان به مدت ۵ ماه برای مشاهده پیدایش احتمالی کلنی بررسی شدند. پس از ظاهر شدن کلنی، رنگ‌آمیزی اسید فست به روش زیل-نلسون انجام شد و در نهایت هویت کلنی‌های جداشده با تست‌های فنوتیپیک (شکل کلنی، سرعت رشد و تولید پیگمان) و با روش ملکولی تایید نهایی شدند (۱۴).

در جداسازی اولیه به دلیل آلودگی فراوان نمونه‌ها با مخمر و قارچ ،غلظت‌های مختلف سیکلوهگزامید به محیط کشت LJ اضافه شد تا از رشد آنها جلوگیری شود. به همین منظور غلظت‌های مختلف سیکلوهگزامید به ازای هر ۱۶۰۰ سی سی محیط کشت LJ به ترتیب شامل: ۰/۰۲۵، ۰/۰۵، ۰/۰۶، ۰/۶۴ ، ۰/۲ ، ۰/۳ ، ۰/۵ ، ۱ گرم به محیط کشت اضافه شد. بهترین غلظت سیکلوهگزیمید جهت جداسازی مایکوباکتریوم‌ها ۱- ۰/۳ گرم بود. همچنین جهت جداسازی کامل کلنی محیط‌هایی که ترکیبی از آلودگی باکتریایی و قارچی داشتند از چهار روش تیمار زیر استفاده شد. در روش اول، کلنی‌های آلوده با قارچ‌ها از سطح محیط کشت برداشته شد و در ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل در یک فالکون استریل حل شد، سپس هم حجم نمونه، CPC اضافه شد و ورتکس صورت گرفت. حدود نیم ساعت در دمای محیط همراه با تکان دادن انکوبه شد. سپس در دور rpm۳۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. در مرحله بعد مایع رویی را دور ریخته و پس از آن برای شست و شو، ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل به نمونه اضافه و دوباره به مدت ۱۵ دقیقه با دور rpm۳۰۰۰ سانتریفیوژ شد. مایع رویی دور ریخته شده و در نهایت رسوب باقی مانده کشت داده شد. در روش دوم، کلنی‌های آلوده با قارچ‌ها از محیط کشت برداشته و در ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل در یک فالکون استریل حل شد. سپس به میزان ۱/۵ میلی‌لیتر سود ۱٪ و ۱/۵ میلی‌لیتر SDS ۳٪ به آن اضافه و ورتکس صورت گرفت و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط همراه با تکان دادن انکوبه شد. در مرحله بعد با اضافه کردن معرف فنل فتالئین و اسید فسفوریک ۴۰٪ خنثی‌سازی صورت گرفت. سپس نمونه‌ها به مدت۳۰ دقیقه با دور rpm۳۰۰۰ سانتریفیوژ شد. مایع رویی را دور ریخته و در نهایت رسوب باقی مانده کشت داده شد. در روش سوم، کلنی‌های آلوده از محیط کشت برداشته و در ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل در یک فالکون استریل حل شد. سپس به میزان ۲۰۰ میکرولیتر اگزالیک اسید ۵٪ به محلول اضافه و ورتکس صورت گرفت. سپس به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط همراه با تکان دادن انکوبه شد. پس از آن، نمونه به مدت۳۰ دقیقه با دور rpm۳۰۰۰ سانتریفیوژ شد. مایع رویی را دور ریخته و در نهایت رسوب باقی مانده کشت داده شد. در روش آخر، کلنی‌های آلوده از محیط کشت برداشته و در ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل در یک فالکون استریل حل شد. سپس به میزان ۱/۵

میلی‌لیتر سود ۱٪ و ۱/۵ میلی‌لیتر SDS ۳٪ به آن اضافه شد و ورتکس صورت گرفت. در مرحلهٔ بعد، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط همراه با تکان دادن انکوبه شد. سپس با اضافه کردن معرف فنل فتالئین و اسید فسفوریک ۴۰٪ خنثی‌سازی صورت گرفت. نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه با دور rpm۳۰۰۰ سانتریفیوژ شد. مایع رویی دور ریخته شد و رسوب به دست آمده ورتکس شد و سپس مجددا به رسوب حاصل ۲۰۰ میکرولیتر اگزالیک اسید ۵ درصد اضافه شد، ۴۰ دقیقه در دمای محیط همراه با تکان دادن انکوبه شد و در نهایت نمونه به مدت ۳۰ دقیقه با دور rpm۳۰۰۰ سانتریفیوژ شد. مایع رویی دور ریخته و رسوب باقی مانده کشت داده شد. در نهایت جهت خالص‌سازی نهایی و تیمار نمونه‌های آلوده از روش چهارم استفاده شد و سپس بر روی محیط کشت LJ حاوی سیکلوهگزامید کشت داده شد.

جهت جداسازی بهتر، از محیط کشت‌های زیر نیز جهت کشت مجدد مورد استفاده قرار گرفت. این محیط کشت‌ها شامل محیط کشت انفیوژن قلبی مغزی (BHI) آگار، محیط کشت مکانکی آگار، محیط کشت بلاد آگار حاوی نالیدیکسیک اسید، محیط کشت بلاد آگار حاوی پنی سیلین، محیط کشت بلاد آگار حاوی نالیدیکسیک اسید و پنی سیلین و محیط کشت LJ حاوی نالیدیکسیک اسید ، پنی سیلین و سیکلوهگزامید بودند.

یافته‌ها

از میان روش‌های استفاده شده، مایکوباکتریوم‌های غیر سلی با دو روش نشان داده شده در جدول ۱ جداسازی شدند. غلظت‌های ۰/۰۲۵، ۰/۰۵، ۰/۰۶ گرم تا حدودی از رشد قارچ‌ها و مخمرها جلوگیری کردند، اما نتوانستند به‌طور کامل از رشد آنها جلوگیری کنند. غلظت‌های ۰/۶۴ تا ۰/۲ گرم بیش از نیمی از آلودگی‌های قارچی و مخمری را متوقف کردند، درحالیکه در غلظت‌های ۰/۳ و ۰/۵ گرم هیچ‌گونه آلودگی قارچی یا مخمری مشاهده نشد. البته در برخی مواقع تعداد کمی از کلنی قارچ و مخمر دیده می‌شد که در غلظت ۱ گرم از سیکلوهگزیمید، این آلودگی‌ها هم از بین رفت.

تیمار کلنی‌های مایکوباکتریایی آلوده با قارچ‌ها یا باکتری‌های دیگر با CPC ۰/۰۵ تا ۱٪ ، سود ۱-۲٪ و SDS ۳٪ آلودگی‌های مدنظر را از بین نبرد. تیمار کردن با اسید اگزالیک ۳-۵٪ آلودگی را کاهش داد ولی به‌طور کامل آن را از بین نبرد. بدین صورت که پس از چند روز، سطح آلودگی با مخمرها و سایر باکتری‌ها افزایش یافت. در نهایت، سود ۱-۴ ٪، SDS ۳٪ و اسید اگزالیک ۵٪ به‌طور کامل آلودگی را از تمام محیط کشت از بین برد و مایکوباکتریوم‌ها به‌طور خالص رشد کردند.

بر روی محیط BHI پس از چندین ماه انکوباسیون، هیچ رشدی از مایکوباکتریوم‌ها مشاهده نشد. بر روی محیط‌های کشت مک کانکی آگار و بلاد آگار حاوی پنی سیلین و اسید نالیدیکسیک، پس از چند روز انکوباسیون، باکتری‌های گرم منفی بر روی همه محیط‌های کشت مشاهده شد و هیچ‌گونه رشد مایکوباکتریوم‌ها مشاهده نشد. بر روی محیط کشت LJ حاوی آنتی بیوتیک، آلودگی مشاهده نشد و پس از یک الی دو ماه، رشد کمی از مایکوباکتریوم‌ها مشاهده شد که نسبت به محیط کشت LJ حاوی سیکلوهگزیمید بدون آنتی‌بیوتیک رشد کمتری از مایکوباکتریوم‌ها مشاهده شد.

جدول ۱. نتایج حاصل از رشد جدایه‌های مایکوباکتریایی از منابع آبی بیمارستان با استفاده از روش‌های تیمار مختلف

روش تیمار	دما	مثبت	منفی	آلودگی
سود ۱٪+ ۳٪SDS	۳۷ درجه سلسیوس	۱۹	۹	۷
	۲۵ درجه سلسیوس	۲۴	۷	۴
۰/۰۵CPC	۳۷ درجه سلسیوس	۰	۳۳	۲
	۲۵ درجه سلسیوس	۲۶	۱	۱

بحث

امروزه بسیاری از مطالعات بر ضرورت شناسایی مایکوباکتریوم‌های آتی‌پیک در آب و پیدا کردن راه حل مناسب برای کنترل این باکتری‌ها تاکید دارند (۱۳). روش‌های مختلفی برای جداسازی مایکوباکتریوم‌های غیرسلی از محیط وجود دارد ولی نیاز به یافتن روش استاندارد مناسب با حجم نمونهٔ آب کمتر جهت شناسایی منابع و مخازن زیستی آلوده با مایکوباکتریوم‌های غیرسلی ضروری است. بر همین اساس در مطالعهٔ انجام شده توسط Kamala و همکاران در سال ۱۹۹۳ در هند از شش روش آلودگی زدایی برای مقایسه جداسازی مایکوباکتریوم‌ها از آب و خاک استفاده شد. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده، سه روش از ۶ روش مورد استفاده بر روی نمونهٔ خاک و ۲ روش از ۶ روش بر روی نمونهٔ آب ارزیابی شد. در نهایت برای هر دو نمونه آب و خاک، استفاده از

روش SLS ٪۳ (سدیم لوریل سولفات) و سود ٪۱ منجر به جداسازی مایکوباکتریوم بیشتری شد (۱۵).

در مطالعهٔ انجام‌شده در سال ۲۰۰۹ توسط Radomski و همکاران، نتایج مطالعه نشان داد آلودگی زدایی با CPC ٪۰/۰۵ به مدت ۳۰ دقیقه و کشت در یک محیط کشت LJ غنی حاوی PANTA، رشد سایر باکتری‌ها را به‌طور قابل توجهی کاهش می‌دهد. همچنین نتایج حاکی از این بود که آلودگی‌زدایی با CPC ٪۰/۰۵ منجر به از بین رفتن ٪۷۱/۱ از جدایه‌های مایکوباکتریوم چلونی و ٪۷۰ از جدایه‌های مایکوباکتریوم آویوم می‌شود. در مقابل در مطالعه Thomson و همکاران، استفاده ازCPC ٪۰/۰۰۵ در نمونه آب شیرین موجب بقای ٪۳/۶ برای هر دو سویه مایکوباکتریوم آویوم و مایکوباکتریوم اینتراسلولار شد (۱۶). البته CPC را می‌توان در غلظت‌های مختلف برای نمونه‌های حاوی آلودگی کم (٪۰/۰۰۵) تا آلودگی زیاد (٪۰/۰۰۵) می‌توان استفاده کرد (۱۷).

در مطالعه‌ای که توسط Khosravi و همکاران در سال۲۰۱۶ در خوزستان انجام شد از CPC ٪۰/۰۰۵ جهت آلودگی‌زدایی استفاده شد. از ۲۵۸ نمونه، ۷۷ (٪۲۹) جدایه مایکوباکتریوم جداسازی شد که شامل جدایه‌های مایکوباکتریوم سریع‌الرشد و جدایهٔ مایکوباکتریوم کند رشد بود (۱۸). همچنین در مطالعهٔ انجام شده توسط Falsafi و همکاران در ایران از سه روش آلودگی‌زدایی CPC ٪۰/۰۱، NaOH ٪۴ و NaOH ٪۱+ SDS ٪۳ استفاده شد و نشان دادند که آلودگی‌زدایی با CPC بهترین روش آلودگی‌زدایی بوده و می‌تواند رشد سایر میکروارگانسیم‌ها را کاهش دهد و اثر مهاری کمی بر روی مایکوباکتریوم‌های آتی‌پیک داشته باشد (۱۹). در مطالعهٔ دیگری توسط Rahbar و همکاران در ایران در سال ۲۰۱۰ بر روی ۱۲۰ نمونه آب، ٪۱۰ از کل نمونه‌ها با استفاده از روش CPC ٪۰/۰۵ از نظر مایکوباکتریوم‌های غیر سلی مثبت بودند (۲۰).

بنابر یافته‌های به‌دست‌آمده از این مطالعه به نظر می‌رسد استفاده از غلظت‌های کمتر CPC نسبت به NaOH ٪۱ و SDS ٪۳ اثری به مراتب بهتر داشته باشد، زیرا در موقع استفاده از CPC ٪۰/۰۵ نسبت به NaOH و SDS آلودگی کمتر و جداسازی مایکوباکتریوم‌ها در نمونه‌ها بالاتر بود. اکثر محیط‌های حاوی CPC بدون رشد مایکوباکتریوم‌ها بودند که انتظار می‌رود به دلیل استفاده از غلظت بالای CPC باشد که احتمالا در غلظت‌های پایین‌تر اثرات بهتری خواهد داشت. در ضمن با افزایش میزان سیکلوهگزامید سرعت رشد مایکو باکتریوم‌ها بر روی محیط کشت بیشتر شد و هیچ‌گونه اثر مهاری در رشد مایکوباکتریوم‌ها با افزایش غلظت سیکلوهگزامید تا غلظت ۱گرم به ازای هر ۱۶۰۰ سی‌سی مشاهده نگردید. نالیدیکسیک اسید برای جلوگیری از آلودگی محیط کشت‌ها و خالص‌سازی مایکوباکتریوم‌ها مفید بود، اما تا حدی از رشد مایکوباکتریوم‌ها می‌تواند جلوگیری کند. البته این زمانی صادق است که از کشت خالص مایکوباکتریوم‌ها برای کشت مجدد استفاده نشده باشد. نالیدیکسیک اسید بیشترین اثر مهاری بر روی مایکوباکتریوم‌های غیرسلی در نمونه‌های با تعداد کم مایکوباکتریوم داشت. در نتیجه پیشنهاد می‌شود جهت خالص‌سازی از نالیدیکسیک اسید استفاده شود ولی برای آلودگی‌زدایی اولیه توصیه نمی‌شود.

نتیجه‌گیری

در بسیاری از مطالعاتی که در ایران صورت گرفت، همانند مطالعه ما از روش NaOH ٪۱ و SDS ٪۳ استفاده شده، اما به نظر می‌رسد استفاده از غلظت‌های پایین CPC نیز اثر خوبی در جداسازی مایکوباکتریوم‌های غیرسلی داشته باشد که البته بسته به حجم نمونهٔ مورد استفاده نتایج ممکن است متفاوت باشد. بر خلاف سایر مطالعات انجام شده که از حجم نمونهٔ یک لیتری استفاده کردند، در این مطالعه از حجم آب کمتری (۵۰ میلی‌لیتر) استفاده شد. در نهایت استفاده از روش تیمار با استفاده از NaOH ٪۱، اسید اگزالیک ٪۵ و SDS ٪۳ همراه با کشت بر روی محیط کشت LJ حاوی ۰/۳گرم سیکلوهگزامید به‌عنوان یک روش مناسب برای جداسازی مایکوباکتریوم‌های محیطی توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی

این مطالعه توسط معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی ایران با شماره طرح ۳۰-۰۱-۹۵-۲۷۸۶۷ حمایت مالی شده است.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض منافع گزارش نشده است.

Referance

1. Gopinath, K and Singh S. Non-tuberculous mycobacteria in TB-endemic countries: are we neglecting the danger? PLoS Negl Trop Dis. 2010; 4(4): e615. [DOI:10.1371/journal.pntd.0000615] [PMID] [PMCID]
2. Tortoli, E. Clinical manifestations of nontuberculous mycobacteria infections. Clin Microbiol Infect, 2009; 15(10): 906-910. [DOI:10.1111/j.1469-0691.2009.03014.x] [PMID]
3. Primm, TP, CA Lucero, and JO Falkinham. Health impacts of environmental mycobacteria. Clin Microbiol Rev. 2004; 17(1): 98-106. [DOI:10.1128/CMR.17.1.98-106.2004] [PMID] [PMCID]
4. Nasiri, MJ, Dabiri, H, Darban-Sarokhalil, D, & Shahraki, AH. Prevalence of non-tuberculosis mycobacterial infections among tuberculosis suspects in Iran: systematic review and meta-analysis. PloS one. 2015; 10(6), e0129073. [DOI:10.1371/journal.pone.0129073] [PMID] [PMCID]
5. Falkinham JO. Surrounded by mycobacteria: nontuberculous mycobacteria in the human environment. J Appl Microbiol. 2009;107(2):356-67. [DOI:10.1111/j.1365-2672.2009.04161.x] [PMID]
6. Thomson R, Carter R, Gilpin C, Coulter C and 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): 3094-309. [DOI:10.1128/AEM.02009-07] [PMID] [PMCID]
7. Adekambi T, Colson P, Drancourt M. rpoB-based identification of non-pigmented and late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. J Clin Microbiol. 2003; 41(12):5699-5708. [DOI:10.1128/JCM.41.12.5699-5708.2003] [PMID] [PMCID]
8. Falkinham, JO. Environmental sources of nontuberculous mycobacteria. Clin Chest Med. 2015; 36(1), 35-41. [DOI:10.1016/j.ccm.2014.10.003] [PMID]
9. 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), 911-934. [DOI:10.1016/j.femsre.2005.02.001] [PMID]
10. Castillo-Rodal, AI, Mazari-Hiriart, M, Lloret-Sánchez, LT, Sachman-Ruiz, B, Vinuesa, P, & López-Vidal, Y. Potentially pathogenic nontuberculous mycobacteria found in aquatic systems. Analysis from a reclaimed water and water distribution system in Mexico City. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012; 31(5), 683-694. [DOI:10.1007/s10096-011-1359-y] [PMID]
11. Falkinham, JO. Current epidemiologic trends of the nontuberculous mycobacteria (NTM). Curr Environ Health Rep. 2016; 3(2), 161-167. [DOI:10.1007/s40572-016-0086-z] [PMID]
12. Mullis, SN, & Falkinham, JO. Adherence and biofilm formation of Mycobacterium avium, Mycobacterium intracellulare and Mycobacterium abscessus to household plumbing materials. J Appl Microbiol. 2013; 115(3), 908-914. [DOI:10.1111/jam.12272] [PMID]
13. Primm, TP, Lucero CA, and Falkinham JO. Health impacts of environmental mycobacteria. Clin Microbiol Rev. 2004; 17(1): 98-106. [DOI:10.1128/CMR.17.1.98-106.2004] [PMID] [PMCID]
14. Moradi S, Nasiri MJ, Pourahmad F, Darban-Sarokhalil D. Molecular characterization of nontuberculous mycobacteria in hospital waters: a two-year surveillance study in Tehran, Iran. J Water Health. 2019; 1;17(2):350-6. [DOI:10.2166/wh.2019.294] [PMID]
15. 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; 1;60(3):1021-4. [DOI:10.1128/AEM.60.3.1021-1024.1994] [PMID] [PMCID]
16. 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; 1;76(11):3514-20. [DOI:10.1128/AEM.02659-09] [PMID] [PMCID]
17. Neumann M, Schulze-Robbecke R, Hagenau C, Behringer K. Comparison of methods for isolation of mycobacteria from water. Appl Environ Microbiol. 1997;1;63(2):547-52. [DOI:10.1128/AEM.63.2.547-552.1997] [PMID] [PMCID]
18. Khosravi AD, Hashemi Shahraki A, Hashemzadeh M, Sheini Mehrabzadeh R, Teimoori A. Prevalence of non-tuberculous mycobacteria in hospital waters of major cities of Khuzestan Province, Iran. Front Cell Infect Microbiol. 2016;13;6:42. [DOI:10.3389/fcimb.2016.00042] [PMID] [PMCID]
19. Falsafi S, Zaker Bostanabad S, Feizabadi M M, Khavari-Nejad R A. Comparison and optimization of methods for isolation of Non-Tuberculous mycobacteria from surface water. NCMBJ. 2014; 4 (15) :115-121.
20. Rahbar, M, Lameei, A, Babazadeh, H, Yavari, SA. Isolation of rapid growing mycobacteria from soil and water in Iran. Afr J Biotechnol. 2010; 9 (24). pp. 3618-3621.