مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و چهارم/شماره‌ی ۳۷۳/هفته‌ی اول اردیبهشت ماه ۱۳۹۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۹/۲۴
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۲/۱۵

تعیین ژنوتایپ گونه‌های مایکوباکتریوم غیر توبرکلوزیس موجود در نمونه‌های شیر دام‌های اصفهان به روش تعیین توالی ژن 16S rRNA

محمد حسین رضائیان[۱]، سید اصغر هوایی[۲]، شراره مقیم[۲]، فاطمه ریاحی[۳]، حسینعلی راهدار[۱]، میثم روزبهانی[۱]، بهرام نصر اصفهانی[۲]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: مایکوباکتریوم‌های غیر توبرکلوزیس (NTM یا Nontuberculous mycobacteria)، از مهم‌ترین باکتری‌هایی هستند که می‌توانند از شیر گاو و فراورده‌های آن به انسان منتقل شوند. حضور این باکتری‌ها در شیر گاو، به عنوان یک نگرانی در عرصه‌ی بهداشت عمومی، به ویژه در میان افرادی که شیر خام و فراورده‌های لبنی حاصل از آن را مصرف می‌کنند، محسوب می‌شود. در این مطالعه، به منظور بررسی میزان شیوع مایکوباکتریوم‌های غیر توبرکلوزیس و تعیین انواع آن در نمونه‌های شیر دام‌های استان اصفهان، از روش تعیین توالی ژن 16S rRNA استفاده گردید.

روش‌ها: از ایزوله‌هایی که به عنوان مایکوباکتریوم غیر توبرکلوزیس شناسایی شد، استخراج DNA با روش Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) و فنل کلروفورم صورت گرفت. سپس، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR یا Polymerase chain reaction) ژن 16S rRNA با استفاده از پرایمرهای طراحی شده انجام و پس از تعیین توالی، انواع این باکتری تعیین شدند.

یافته‌ها: از ۱۱۹ نمونه‌ی شیر جمع‌آوری شده از گاوداری‌های استان اصفهان، تعداد ۹ کشت مثبت شناسایی شد که ۸ مورد آن M. fortuitum و یک مورد آن M. gordonae بود.

نتیجه‌گیری: شیوع NTM در نمونه‌های شیر گاو بررسی شده در استان اصفهان ۸/۶ درصد بود که پس از PCR با ژن 16S rRNA و تعیین توالی، فروانی ایزوله‌ی M. fortuitum نوع I ۸۸/۹ درصد و فراوانی ایزوله‌ی M. gordonae نوع III ۱۱/۱ درصد بود. روش PCR و تعیین توالی ژن 16S rRNA به کار گرفته شده در این مطالعه، توانایی تشخیص ۱۰۰ درصد ایزوله‌های مایکوباکتریوم را دارا بود.

واژگان کلیدی: مایکوباکتریوم غیر توبرکلوزیس؛ 16S rRNA، تعیین توالی

ارجاع: رضائیان محمد حسین، هوایی سید اصغر، مقیم شراره، ریاحی فاطمه، راهدار حسینعلی، روزبهانی میثم، نصر اصفهانی بهرام. **تعیین ژنوتایپ گونه‌های مایکوباکتریوم غیر توبرکلوزیس موجود در نمونه‌های شیر دام‌های اصفهان به روش تعیین توالی ژن 16S rRNA.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۵؛ ۳۴ (۳۷۳): ۱۸۱-۱۷۵

مقدمه

مایکوباکتریوم‌های غیر توبرکلوزیس (NTM یا Nontuberculous Mycobacteria)، یکی از مهم‌ترین گروه‌های باکتری‌های فرصت‌طلب مشترک در بین انسان و دام هستند. در سال‌های اخیر، با افزایش بیماری‌های سرکوب کننده‌ی سیستم ایمنی مانند ایدز و استفاده از داروهای سرکوب کننده‌ی سیستم ایمنی مانند کورتیکواستروئیدها، تعداد موارد گزارش شده از بیماری‌های ایجاد شده توسط این میکروارگانیسم‌ها رو به افزایش است. بیماری‌های ریوی، پوستی، عفونت بافت نرم و دیگر انواع عفونت‌ها به وسیله‌ی این باکتری‌ها ایجاد می‌شوند. شایع‌ترین فرم این بیماری‌ها عفونت ریوی می‌باشد. با این حال، عفونت در غدد لنفاوی، زخم یا استخوان و گاهی بیماری‌های منتشره توسط این باکتری‌ها گزارش شده است (۱).

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- دانشیار، مرکز تحقیقات عفونت‌های بیمارستانی و گروه میکروب‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳- دانشجوی دکتری، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر بهرام نصر اصفهانی
Email: nasr@hlth.mui.ac.ir

مایکوباکتریوم‌های غیر توبرکلوزیس از گروه باکتری‌هایی هستند که می‌توانند از شیر گاو و فراورده‌های آن به انسان منتقل شوند. حضور این باکتری‌ها در شیر گاو، به عنوان یک نگرانی در عرصه‌ظس بهداشت عمومی، به ویژه در میان افرادی که شیر خام و فراورده‌های لبنی حاصل از آن را مصرف می‌کنند، می‌باشد (۲). قابل ذکر است که محصولات تولید شده از شیر پاستوریزه نیز می‌توانند حامل NTM باشند و باعث عفونت‌های فرصت‌طلب در انسان و حیوانات شوند (۳-۲).

بررسی میزان فراوانی و انواع گونه‌های رایج مایکوباکتریوم‌های غیر توبرکلوزیس در نواحی جغرافیایی و منابع غذایی و مصرفی مختلف، از جنبه‌های اپیدمیولوژی و اپیدمیولوژی مولکولار، دارای اهمیت ویژه‌ای است.

به طور سنتی، NTM از نمونه‌های بالینی و محیطی به وسیله تکنیک‌های کشت، جداسازی و سپس با روش‌های فنوتیپیک و بیوشیمیایی شناسایی می‌شوند؛ در حالی که این روش‌ها ممکن است جهت شناسایی نمونه‌های محیطی مناسب نباشد؛ چرا که شناسایی NTM بر این اساس، ۶-۴ هفته یا بیشتر برای گونه‌هایی با رشد آهسته طول می‌کشد؛ در نتیجه، شناسایی برخی از گونه‌ها با این روش ممکن است میسر نباشد (۵-۴، ۲).

هیبریدیزاسیون DNA-DNA، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (High-performance liquid chromatography یا HPLC) جهت آنالیز اسید مایکولیک دیواره‌ی سلولی مایکوباکتریوم‌ها، قطعات پلی‌مورف با طول محدود (Restriction fragment length polymorphism یا RFLP) با استفاده از مناطق هدف و ژن‌های مختلف از جمله hsp65، ITS، rpo B و gyrB روش‌های مولکولی رایجی هستند که برای شناسایی مایکوباکتریوم‌ها استفاده می‌شوند (۶-۴، ۲).

مطالعات نشان داده است که روش‌های مولکولی بر پایه‌ی Polymerase chain reaction (PCR) قابل اعتمادتر و سریع‌تر برای شناسایی NTM می‌باشند (۷، ۴). علاوه بر آن، مناطق بیش از حد متغیر در مولکول 16S rRNA، ابزار مناسبی برای تشخیص و تعیین مستقیم گونه‌های مختلف مایکوباکتریوم از طریق توالی‌یابی می‌باشد؛ چرا که الگوی حوزه‌ی حفاظت شده و متغیر مولکول 16S rRNA، می‌تواند ابزار منحصر به فردی را ارایه دهد که با انجام تنها یک واکنش تکثیر، به طور تقریبی تمام گونه‌های مایکوباکتریوم شناسایی شوند (۱۰-۸).

در این مطالعه، از روش تعیین توالی ژن 16S rRNA جهت تشخیص و تعیین نوع ایزوله‌های شایع مایکوباکتریوم غیر توبرکلوزیس در نمونه‌های شیر دام‌های استان اصفهان استفاده گردید.

روش‌ها

نمونه‌برداری: در این مطالعه با مراجعه به سه گاوداری صنعتی و دو گاوداری سنتی در استان اصفهان، در مجموع از ۳۳۳ رأس گاو شیری نمونه‌گیری شد که ۲۴۴ نمونه به صورت تجمعی و ۸۹ نمونه به صورت انفرادی بودند. ۵۰ میلی‌لیتر حجم کل شیر جمع‌آوری شده از هر نمونه‌ی انتخابی، در فلاسک مخصوص جمع‌آوری نمونه‌ی استرلیزه قرار داده شد. نمونه‌ها بلافاصله در جعبه‌های یخ (۸-۴ درجه‌ی سانتی‌گراد) تا رسیدن به آزمایشگاه نگهداری شدند.

آلودگی‌زدایی و فیلتراسیون: ۴۰ میلی‌لیتر از هر نمونه‌ی شیر به یک لوله‌ی درب‌دار اضافه و سپس با شتاب ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. در طی این مرحله، سلول‌ها و چربی نمونه‌ها رسوب کرد و باقی‌مانده جدا و مورد استفاده قرار گرفت. آلودگی‌زدایی با استفاده از هیدروکسید سدیم ۴ درصد و سولفوریک اسید ۴ درصد، انجام شد و مخلوط چربی و پروتئین از هر نمونه جدا و به این ترتیب نمونه‌ها برای کشت مایکوباکتریوم‌ها آماده شدند (۱۱).

کشت نمونه‌ها: کشت بر روی محیط Lowenstein–Jensen و به صورت هوازی و انکوبه در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و به مدت ۹۰ روز انجام شد؛ کشت‌ها به‌طور هفتگی مورد بررسی قرار گرفتند. هر کلنی ظاهر شده، با روش Ziehl-Neelsen رنگ‌آمیزی و خصوصیات مربوط به ظاهر کلنی، تولید پیگمان و سرعت رشد آن‌ها ثبت گردید. سپس کلنی‌های مربوط به باکتری‌های اسیدفاست بر روی محیط کشت Middlebrook 7H10 کشت و خالص‌سازی صورت گرفت.

در موارد با تراکم بالای کلنی‌های مخلوط با دیگر سویه‌های میکروبی، کلنی‌ها ابتدا به صورت خطی بر روی محیط کشت Blood agar کشت مجدد داده شدند و سپس از کلنی تک ایجاد شده بر روی این محیط، برای آزمایش‌های بعدی استفاده شد. برای شناسایی اولیه‌ی ایزوله‌ها از آزمایش‌هایی نظیر سرعت رشد، رنگ‌آمیزی اسید فاست، تولید پیگمان، مورفولوژی کلنی، وجود آنزیم کاتالاز (کاتالاز مقاوم به حرارت و کاتالاز نیمه کمی)، آزمایش تولید نیاسین، احیای نیترات، تست اوره‌آز و هیدرولیز توئین ۸۰ استفاده گردید.

استخراج DNA: در این مرحله، از روش Cetyl trimethylammonium bromide (CTAB) برای استخراج DNA استفاده شد. به این ترتیب که ۳-۲ لوپ باکتری در ۴۰۰ میکرولیتر بافر Tris-EDTA (TE یا Ethylenediaminetetraacetic acid-Tris) به خوبی حل گردید، ۳۰ میکرولیتر آنزیم لیزوزیم ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اضافه گردید و پس از ۲ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۱۰ میکرولیتر پروتئیناز K و ۷۰ میکرولیتر Sodium dodecyl sulfate (SDS) ۱۰ درصد به نمونه اضافه شد و به خوبی مخلوط گردید.

آن گاه، ۱۵ دقیقه در بن‌ماری ۶۵ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت. در مرحله‌ی بعد، ۱۰۰ میکرولیتر NaCl ۵ مولار به نمونه اضافه و

۱۰۰ میکرولیتر CTAB NaCl که از قبل در دمای ۶۵ درجه‌ی سانتی‌گراد گرم شده بود، نیز به آن اضافه شد.

۱۰ دقیقه در بن‌ماری با دمای ۶۵ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه گردید. سپس، ۷۰۰ میکرولیتر فنل کلروفورم هم حجم به میکروتیوب اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید.

لایه‌ی رویی به میکروتیوب جدید منتقل گردید. ۵۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول سرد به میکروتیوب اضافه و ۳۰ دقیقه در فریزر ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت و سپس به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید و ایزوپروپانول دور ریخته شد. سپس به آن ۱ میلی‌لیتر اتانول سرد ۷۰ درصد اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. اتانول با احتیاط دور ریخته شد و الکل اضافه تبخیر گردید.

انجام PCR: با استفاده از مقالات موجود و با مراجعه به بانک ژن، پرایمرهای 16S rRNA به شرح زیر تهیه و مورد استفاده قرار گرفت (۱۰).

16S rRNA F: 5’ TGC ACA CAG GCC ACA AGG GA 3’

16S rRNA R: 5’ GAG AGT TTG ATC CTG CGT CAG 3’

تکثیر قطعه‌ی مورد نیاز در حجم ۲۵ میلی‌لیتر حاوی ۲ میکرولیتر DNA (۵ نانوگرم genomic DNA)، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر (۱۰ پیکومول بر میلی‌لیتر)، ۰/۷۵ میکرولیتر $MgCl_2$ (۵۰ میلی‌مولار)، ۰/۵ میکرولیتر dNTP (۱۰ میلی‌مولار)، ۲/۵ میکرولیتر 10x بافر (۵۰۰ واحد)، ۰/۲۵ میکرولیتر Taq polymerase و ۱۷ میکرولیتر H_2O بود.

شیوه‌نامه‌ی PCR شامل یک مرحله Denaturation اولیه به مدت ۵ دقیقه در ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و در ادامه ۳۵ چرخه به شرح زیر صورت گرفت:

- Denaturation در ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه،
- Annealing در ۵۵/۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه،
- Extention در ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه،
- Eextention نهایی در ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه.

جهت تأیید تولید محصول مورد نظر طی فرایند PCR، بخشی از محصول روی ژل آگارز الکتروفورز و محصول PCR از ژل استخراج و جهت تعیین توالی به شرکت Bioneer کره‌ی جنوبی فرستاده شد.

یافته‌ها

در این مطالعه، تعداد ۹ ایزوله‌ی مایکوباکتریوم غیر توبرکلوزیس از بین ۱۱۹ نمونه‌ی شیر جداسازی و شناسایی شد (شکل ۱). بر طبق نتایج آزمایش‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی، هر ۹ ایزوله به عنوان NTM مورد شناسایی قرار گرفتند. از بین ۹ ایزوله‌ی شناسایی شده، ۸ ایزوله متعلق به غیر کروموژن‌های تند رشد بود که در کمتر از ۷ روز رشد کرده و کلنی آن‌ها ظاهر می‌شود و ۱ ایزوله متعلق به اسکوتوکروموژن‌های کند رشد بود که بیش از ۷ روز نیاز به انکوباسیون دارند و در تاریکی تولید پیگمان می‌کنند.

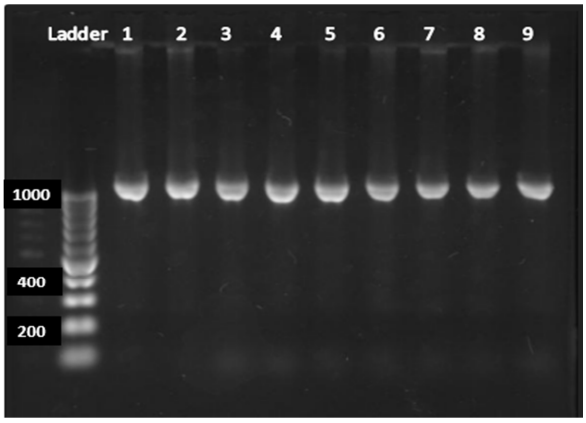
در جدول ۱، نتایج بررسی ویژگی‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی ایزوله‌های جداشده از شیر دام‌های استان اصفهان آمده است.

از بین این ۹ ایزوله به روش تعیین توالی 16S rRNA به صورت رفت و برگشت، ۸ ایزوله M.fortuitum نوع I و یک ایزوله M.gordonae نوع III بودند.

جدول ۱. نتایج آزمایش‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی ایزوله‌های جدا شده از شیر دام‌های استان اصفهان

شماره‌ی ایزوله	گونه‌ی مایکوباکتریوم	اوره‌آز	کاتالاز نیمه کمی	کاتالاز مقاوم به حرارت	احیای نیترات	هیدرولیز توئین ۸۰	نیاسین	سرعت رشد بر حسب روز	تولید پیگمان
۱	M. fortuitum complex	+	+	+	+	-	-	< ۷	-
۲	M.fortuitum complex	+	-	-	-	-	-	< ۷	-
۳	M.fortuitum complex	+	+	+	-	-	-	< ۷	-
۴	M.fortuitum complex	+	+	+	+	-	-	< ۷	-
۵	Mycobacterium.sp	+	+	+	+	+	-	< ۷	-
۶	M.fortuitum complex	+	+	+	-	-	-	< ۷	-
۷	M.fortuitum complex	+	+	+	+	-	-	< ۷	-
۸	M.fortuitum complex	+	+	+	+	-	-	< ۷	-
۹	M.gordonae	-	+	+	+	-	-	> ۷	+

M: Mycobacterium



شکل ۱. تکثیر ژن 16S rRNA به طول ۱۰۲۸ نوکلئوتید از ایزوله‌های مختلف مایکوباکتریوم غیر توبرکلوزیس. ستون اول DNA اندازه‌ی نشانگر bp ۱۰۰، ستون‌های بعدی شامل ایزوله‌های مورد بررسی می‌باشد.

بحث

NTMها یکی از مهم‌ترین گروه‌های باکتری‌های فرصت‌طلب مشترک در بین انسان و دام هستند (۱). از مهم‌ترین دلایل اهمیت یافتن مطالعه‌ی مایکوباکتریوم‌های غیر سلولی، می‌توان به همراه بودن بیماری‌های نقص سیستم ایمنی با عفونت ناشی از مایکوباکتریوم‌های NTM، افزایش میزان شیوع عفونت‌های ریوی ناشی از مایکوباکتریوم‌های غیر سلولی در افراد Human immunodeficiency virus (HIV) مثبت و در نهایت، افزایش جدا شدن این باکتری‌ها در آزمایشگاه‌های میکروبیولوژی به دلیل پیشرفت‌های فنی اشاره کرد (۱۲).

اگر چه گونه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس به عنوان عامل اصلی بیماری‌های ریوی در انسان شناخته شده‌اند، اما امروزه بسیاری از محققین قدرت بیماری‌زایی مایکوباکتریوم‌های غیر توبرکلوزیس را کمتر از این دسته نمی‌دانند (۱۳).

در مطالعه‌ی Sriyabhaya و Wongwatana، پتانسیل بیماری‌زایی در مایکوباکتریوم‌های محیطی برای اولین بار مطرح شد و امروزه بیش از یک سوم مایکوباکتریوم‌های غیر طبیعی، مرتبط با بیماری‌های انسانی گزارش شده‌اند (۱۴). گونه‌های مایکوباکتریوم غیر توبرکلوزیس، یکی از مهم‌ترین گونه‌های باکتریایی است که می‌تواند از شیر گاو و فراورده‌های آن به انسان منتقل شود. لازم به ذکر است که محصولات تولید شده از شیر پاستوریزه نیز می‌توانند حامل NTM باشند و باعث عفونت‌های فرصت‌طلب مختلف در انسان و حیوانات شوند (۳-۲).

مصرف سنتی محصولات لبنی خانگی و به خصوص پنیر که از شیر غیر حرارتی تشکیل می‌شود، خطری جدی برای بهداشت عمومی محسوب می‌شود (۱۵، ۲). به دلیل تعدد آزمایش‌های بیوشیمیایی و همچنین کارآمد نبودن این گونه آزمایش‌ها برای متمایز کردن، توجه زیادی به روش‌های مولکولی شده است (۱۷-۱۶).

در واقع، شناسایی NTM به روش کشت و ویژگی‌های فنوتیپی که به طور گسترده‌ای استفاده می‌شود، ۶-۴ هفته یا بیشتر برای گونه‌های با رشد آهسته طول می‌کشد و شناسایی برخی از گونه‌ها با روش‌های بیوشیمیایی از دست می‌رود (۵-۴، ۲). مناطق بیش از حد متغیر در مولکول 16S rRNA، ابزار مناسبی است که برای تشخیص و تعیین مستقیم گونه‌های مختلف مایکوباکتریوم پیشنهاد شده است (۹-۸). الگوی حوزه‌ی حفاظت شده و متغیر مولکول 16S rRNA، ابزار مناسب و منحصر به فردی را ارایه می‌دهد که با انجام تنها یک واکنش تکثیر، به طور تقریبی تمام گونه‌های Mycobacterium شناسایی می‌گردند (۱۰).

در این مطالعه، از روش تعیین توالی ژن 16S rRNA جهت تشخیص و تعیین نوع ایزوله‌های شایع مایکوباکتریوم غیر توبرکلوزیس نمونه‌های شیر دام‌های اصفهان استفاده گردید. تعداد ۹ ایزوله‌ی مایکوباکتریوم از بین ۱۱۹ نمونه‌ی شیر شناسایی شد. بر طبق نتایج آزمودن‌های فنوتیپی، هر ۹ ایزوله به عنوان NTM مورد شناسایی قرار گرفتند. از بین این ۹ ایزوله به روش تعیین توالی 16S rRNA به صورت رفت و برگشت، ۸ ایزوله M.fortuitum نوع I و یک ایزوله M.gordonae نوع III بودند.

در مطالعه‌ای که در ترکیه که بر روی ۳۵ نمونه‌ی شیر خام انجام شد، گونه‌های M. terrae (۶ ایزوله)، M. kansassi (۳ ایزوله)، M. agri (۱ ایزوله) و M. haemophilum (۳ ایزوله) شناسایی شدند. همچنین، دو نمونه‌ی جداسازی شده با پرایمر hsp65 تشخیص داده نشد (۱۸). Sgarioni و همکاران وجود NTM را در ۳۲ نمونه‌ی شیر خام و ۲۰ نمونه‌ی شیر پاستوریزه در برزیل بررسی کردند که ۹ گونه‌ی NTM شامل M. nonchromogenecum، M. fortuitum، M. peregrinum، M. smegmatis، M. neoaurum، M. chelonae، M. flavescens، M. kansasii و M. scrofulaceum مورد شناسایی قرار گرفتند (۱۹).

در مطالعه‌ای که توسط Jordao Junior و همکاران انجام شد، از ۲۳ نمونه‌ی جمع‌آوری شده‌ی شیر بوفالو، تعداد ۱۰ نمونه‌ی NTM شناسایی گردید که شامل M. gordonae (۳ ایزوله)، M. kansassi (۲ ایزوله)، M. flavesceus (۲ ایزوله)، M. simiae (۲ ایزوله) و M. lentiflavum (۱ ایزوله) بودند (۲۰). در مطالعه‌ای دیگر در برزیل، از بین ۳۰۰ نمونه‌ی جمع‌آوری شده، تعداد ۲۴ ایزوله‌ی مایکوباکتریوم غیر توبرکلوزیس شناسایی شد که شامل ۱۵ ایزوله‌ی منحصر به فرد Mycobacterium bovis، M. gordonae، M. fortuitum، M. intracellulare، M. flavescens،

M. immunogenum، M. haemophilum، M. duvalii، M. novocastrense، M. mucogenicum، M. lentiflavum، M. parafortuitum، M. smegmatis، M. terrae و M. vaccae بودند (۲).

Mendum و همکاران، برای جداسازی NTM از خاک، ژن 16S rRNA را به دلیل اختصاصی بودن برای جنس مایکوباکتریوم در میان طیف وسیعی از جنس‌های باکتریایی مورد استفاده قرار دادند (۲۱). در مطالعه‌ای که توسط Padya و همکاران برای تعیین گونه‌های مایکوباکتریوم NTM جداسازی شده از گاو صورت گرفته است، نتایج قابل قبولی با استفاده از ژن 16S rRNA به دست آمده است (۲۲). در این مطالعه، از پرایمرهای ۲۶۴ و ۲۸۵ ژن 16S rRNA برای تعیین توالی مایکوباکتریوم‌های غیر توبرکلوزیس جداسازی شده از شیر گاو استفاده شد که توانایی تشخیص ۱۰۰ درصد ایزوله‌های مایکوباکتریوم را دارا بودند.

تشکر و قدردانی

این مقاله، حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد محمد حسین رضائیان به شماره‌ی ۳۹۳۱۰۹ می‌باشد که با تأمین اعتبار از معاونت پژوهش و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان به انجام رسید. بدین وسیله، نویسندگان مراتب قدردانی و تشکر خود را از این معاونت و کلیه‌ی پرسنل و مدیر محترم گروه میکروب‌شناسی دانشکده‌ی پزشکی این دانشگاه اعلام می‌دارند.

References

1. Cai L, Chen X, Zhao T, Ding BC, Zhang JZ. Identification of Mycobacterium marinum 65 kD heat shock protein gene by polymerase chain reaction restriction analysis from lesions of swimming pool granuloma. Chin Med J (Engl) 2006; 119(1): 43-8.
2. Franco MM, Paes AC, Ribeiro MG, de Figueiredo Pantoja JC, Santos AC, Miyata M, et al. Occurrence of mycobacteria in bovine milk samples from both individual and collective bulk tanks at farms and informal markets in the southeast region of Sao Paulo, Brazil. BMC Vet Res 2013; 9: 85.
3. Chye FY, Abdullah A, Ayob MK. Bacteriological quality and safety of raw milk in Malaysia. Food Microbiology 2004; 21(5): 535-41.
4. Konig B, Tammer I, Sollich V, Konig W. Intra- and interpatient variability of the hsp65 and 16S-23S intergenic gene region in Mycobacterium abscessus strains from patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol 2005; 43(7): 3500-3.
5. Isfahani BN, Tavakoli A, Salehi M, Tazhibi M. Detection of rifampin resistance patterns in Mycobacterium tuberculosis strains isolated in Iran by polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism and direct sequencing methods. Mem Inst Oswaldo Cruz 2006; 101(6): 597-602.
6. Harmsen D, Dostal S, Roth A, Niemann S, Rothganger J, Sammeth M, et al. RIDOM: comprehensive and public sequence database for identification of Mycobacterium species. BMC Infect Dis 2003; 3: 26.
7. Covert TC, Rodgers MR, Reyes AL, Stelma GN. Occurrence of nontuberculous mycobacteria in environmental samples. Appl Environ Microbiol 1999; 65(6): 2492-6.
8. Bottger EC. Rapid determination of bacterial ribosomal RNA sequences by direct sequencing of enzymatically amplified DNA. FEMS Microbiol Lett 1989; 53(1-2): 171-6.
9. Edwards U, Rogall T, Blocker H, Emde M, Bottger EC. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. Nucleic Acids Res 1989; 17(19): 7843-53.
10. Kirschner P, Springer B, Vogel U, Meier A, Wrede A, Kiekenbeck M, et al. Genotypic identification of mycobacteria by nucleic acid sequence determination: report of a 2-year experience in a clinical laboratory. J Clin Microbiol 1993; 31(11): 2882-9.
11. Balian SC, Pinheiro SR, Guerra JL, Morais ZM, Ferreira F, Ferreira Neto JS. Comparative study of two methods of decontamination of mycobacteria. Arq Inst Biol, Sao Paulo 2002; 69(2): 11-4. [In Portuguese].
12. Diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculous mycobacteria. Am Rev Respir Dis 1990; 142(4): 940-53.
13. Katoch VM. Infections due to non-tuberculous mycobacteria (NTM). Indian J Med Res 2004; 120(4): 290-304.
14. Sriyabhaya N, Wongwatana S. Pulmonary infection caused by atypical mycobacteria: A report of 24 cases in Thailand. Rev Infect Dis 1981; 3(5): 1085-9.
15. Leite CQ, Anno IS, Leite SR, Roxo E, Morlock GP, Cooksey RC. Isolation and identification of mycobacteria from livestock specimens and milk obtained in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2003; 98(3): 319-23.
16. Saviola B, Bishai W. The genus mycobacterium-medical. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E, editors. The prokaryotes. 3rd ed. New York, NY: Springe; 2006. p. 919-33.
17. Aronson T, Holtzman A, Glover N, Boian M, Froman S, Berlin OG, et al. Comparison of large restriction fragments of Mycobacterium avium isolates recovered from AIDS and non-AIDS patients with those of isolates from potable water. J Clin Microbiol 1999; 37(4): 1008-12.
18. Konuk M, Korcan E, Dulgerbaki S, Altindis M. Isolation and identification of Mycobacteria from raw milk samples in Afyonkarahisar district of Turkey. Int J Food Microbiol 2007; 115(3): 343-7.

19. Sgarioni SA, Hirata RD, Hirata MH, Leite CQ, de Prince KA, de Andrade Leite SR, et al. Occurrence of Mycobacterium bovis and non-tuberculous mycobacteria (NTM) in raw and pasteurized milk in the northwestern region of Parana, Brazil. Braz J Microbiol 2014; 45(2): 707-11.

20. Jordao Junior CM, Lopes FC, David S, Farache FA, Leite CQ. Detection of nontuberculous mycobacteria from water buffalo raw milk in Brazil. Food Microbiol 2009; 26(6): 658-61.

21. Mendum TA, Chilima BZ, Hirsch PR. The PCR amplification of non-tuberculous mycobacterial 16S rRNA sequences from soil. FEMS Microbiol Lett 2000; 185(2): 189-92.

22. Padya L, Chin'ombe N, Magwenzi M, Mbanga J, Ruhanya V, Nziramasanga P. Molecular Identification of Mycobacterium Species of Public Health Importance in Cattle in Zimbabwe by 16S rRNA Gene Sequencing. Open Microbiol J 2015; 9: 38-42.

Journal of Isfahan Medical School

Vol. 34, No. 373, 1st Week, May 2016

Received: 15.12.2015

Accepted: 05.03.2016

Determination of Nontuberculosis Mycobacteria Species Genotypes Present in Cattle Milk Samples Using 16S rRNA Gene Direct Sequencing

Mohammad Hosein Rezaeyan[1], Seyed Asghar Havaei[2], Sharareh Moghim[2], Fatemeh Riyahi[3], Hoseinali Rahdar[1], Meysam Rouzbahani[1], Bahram Nasr-Esfahani[2]

Original Article

Abstract

Background: Nontuberculosis Mycobacterium (NTM) is the most common bacterium transferred to human from cow milk and products. The presence of these bacteria in the cow's milk stands as a public health concern particularly among those individuals consuming raw milk and dairy products. In this study the determination of 16S rRNA gene sequence method was used in order to evaluate the amount of Non tuberculosis Mycobacterium incidence and determine its types in milk samples gathered from Isfahan province.

Methods: The cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) and phenol chloroform were used for DNA extraction in isolates recognized as Non tuberculosis Mycobacterium, then using designed primers, 16S rRNA polymerase chain reaction was done and the types were determined after sequencing.

Findings: 9 cultures, out of 119 samples gathered from Isfahan farms, were recognized positive in which 8 samples had M. fortuitum and one of them was M. gordonae.

Conclusion: NTM incidence was 8.6% in evaluated milk samples. By using polymerase chain reaction (PCR) with 16SrRNA and sequencing, the fortuitum isolate type I incidence was 88.9% and Gordonae type III incidence was 11.1%. PCR method and sequencing of 16S rRNA gene which were used in this study are able to recognize isolates up to 100%.

Keywords: Nontuberculous mycobacteria, Direct Sequencing, 16S rRNA Gene, Determination

Citation: Rezaeyan MH, Havaei SA, Moghim Sh, Riyahi F, Rahdar H, Rouzbahani M, Nasr-Esfahani B. **Determination of Nontuberculosis Mycobacteria Species Genotypes Present in Cattle Milk Samples Using 16S rRNA Gene Direct Sequencing.** J Isfahan Med Sch 2016; 34(373): 175-81

1- MSc Student, Department of Microbiology, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Assistant Professor, Nosocomial Infection Research Center AND Department of Microbiology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
3- PhD Student, Department of Microbiology, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Bahram Nasr-Esfahani PhD, Email: nasr@hlth.mui.ac.ir