



مقایسه روش PCR با روش استاندارد MPN جهت تشخیص آلودگی باکتریایی در آب شرب

فاطمه دهقان^۱*, محمد رضا ذوالفقاری^۲, محمد ارجمندزادگان^۲, سمیه گراوند^۲,

غلامرضا احمدی^۳, سالومه کلاتری^۳, علیرضا کسری^۴

^۱دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، گروه میکروبیولوژی، قم، ایران

^۲مرکز تحقیقات سل و عفونی کودکان، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

^۳دفتر کنترل کیفیت و بهداشت شرکت آب و فاضلاب استان مرکزی

^۴گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات، اراک، ایران

(دریافت مقاله: ۹۲/۳/۶ - پذیرش مقاله: ۹۲/۳/۲۹)

چکیده

زمینه: تشخیص آلودگی میکروبی آب شرب بهروش کشت علاوه بر هزینه برقی، زمان بربوده و بر حسب میزان آلودگی چند روز به طول می‌انجامد. این در حالی است که شهروندان در این زمان از آب مورد بررسی استفاده می‌نمایند. روش‌های ملکولی دارای حساسیت و سرعت عمل بالایی و زمان عملیاتی کمتری هستند. در این تحقیق روش Multiplex PCR جهت ارزیابی سریع میکروبی آب از نظر کلی فرم، Ecoli و تشخیص احتمالی باکتری‌های VBNC در آزمایشگاه باکتریولوژی شرکت آب و فاضلاب استان مرکزی و مرکز تحقیقات سل و عفونی کودکان در فاز عملیاتی اجرا گردید.

مواد و روش‌ها: تشخیص سریع کلی فرم با کمک آمپلی فیکاسیون ژن‌های lacZ و uidA در واکنش Multiplex PCR طراحی و اجرا گردید. ۸۰ نمونه آب شرب شهر اراک شامل ۴۱ نمونه چاه، ۳۶ نمونه شبکه و ۳ نمونه مخزن در این بررسی جمع‌آوری شده و با استفاده از آمپلی فیکاسیون ژن‌های lacZ و uidA مورد آزمایش Multiplex PCR قرار گرفتند. همچنین آزمایش MPN به عنوان روشی استاندارد و جهت مقایسه یافته‌ها، روی تمامی نمونه‌ها انجام شد. روش‌های MPN Multiplex PCR و روی باکتری استاندارد، باکتری‌های خالص شده از نمونه‌های MPN مثبت و نیز CRM (Certified Reference Material) مثبت و نیز CRM (سویه مرجع) انجام گردیدند.

یافته‌ها: در نمونه‌های چاه، شبکه و مخزن، اکثر نمونه‌ها در هر دو روش نتایج مشابه را نشان دادند. نتیجه PCR روی باکتری استاندارد، کشت‌های خالص شده نمونه‌های MPN مثبت و CRM نیز تأیید کننده روش PCR بود. پنج نمونه دارای PCR مثبت و نتیجه MPN منفی گزارش شدند. زمان کل عملیات PCR با تغییر فاکتورها به حدود یکصد و پنج دقیقه کاهش یافت.

نتیجه گیری: روش Multiplex PCR امکان شناسایی همزمان باکتری‌های کلی فرم کل و اشرشیاکلی را در آب آشامیدنی فراهم نمود.

واژگان کلیدی: آب شرب، آلودگی باکتریایی، روش PCR، روش MPN

* اراک، مرکز تحقیقات سل و عفونی کودکان، دانشگاه علوم پزشکی اراک

در آب آشامیدنی توصیه شده است (۴). در PCR از آمپلی فیکاسیون ژن (lacZ(gene beta-galactosidase) برای تشخیص توتال کلی فرم و از ژن (beta-DuidA glucuronidase gene) برای تشخیص E. Coli به صورت اختصاصی استفاده می شود (۴). با توجه به معایب یاد شده روش های معمول کشت، حجم بالای نمونه های ورودی به آزمایشگاه و همچنین از نظر دیدگاه اقتصادی، در این بررسی روش مولکولی PCR جهت تشخیص سریع کلی فرم کل و مدفعوعی در آب شرب مورد استفاده قرار گرفته است.

محققی به نام بژ (Bej) در سال ۱۹۹۰ از آمپلی فیکاسیون ژن lac Z (کد کنده بتاگالاکتوزیداز) و lam B برای اثبات وجود یا عدم وجود کلی فرم ها و اشرشیاکلی در آب آشامیدنی استفاده کرد. روش PCR مورد استفاده در این روش یک PCR ساده بوده است و نتایج به دست آمده از این بررسی مؤید برتری روش های مولکولی در شناسایی آلدگی باکتریایی در آب می باشد (۲).

از دیگر بررسی های انجام شده در این مورد می توان به پژوهش انجام شده توسط تانتاویوات (Tantawiwat) در سال ۲۰۰۵ تحت عنوان بررسی وجود اشرشیاکلی و کلستریدیوم پرفرونز با استفاده از روش Multiplex PCR اشاره کرد. نام برده از ژن Z و lac Z و plc استفاده نمود و نتایج به دست آمده از بررسی نیز نشان دهنده دقیق و اختصاصیت بالای روش مولکولی جهت شناسایی باکتری ها در آب می باشد (۴).

هدف این بررسی مقایسه و ارزیابی روش کشت (MPN) و روش PCR با کمک ژن های lac Z و uidA در شناسایی باکتری های کلی فرم کل (سیتروباکتر، کلبسیلا، اشرشیاکلی و انتروباکتر) و همچنین روتین سازی آزمایش جهت اجرای عملیاتی در آزمایشگاه های میکروب شناسی آب می باشد.

مقدمه

باکتری های کلی فرم مهم ترین شاخصی هستند که در آزمایشات باکتریولوژیکی آب ها مورد توجه قرار می گیرند. تعیین کلی فرم به عنوان شاخص آلدگی آب در استاندارد شماره ۱۰۱۱ (ویژگی های میکروبیولوژیکی آب) تبیین شده و همان گونه که در جدول ۱ مشاهده می شود، استفاده از اشرشیاکلی، سایر کلی فرم های گرم پایی و کلی فرم ها به عنوان باکتری های نشانگر در کنترل روزمره آب آشامیدنی توصیه شده است (۱).

جدول ۱) ویژگی های استاندارد میکروبیولوژی آب آشامیدنی

ردیف	نام	نحوه توزیع	آششیاکلی یا کلی فرم های منفی	کلیه آب های آشامیدنی گرم پایی
۱	آب تصفیه شده جهت استفاده	در شبکه توزیع	آششیاکلی یا کلی فرم های منفی	آب تصفیه شده جهت استفاده
۲	آب تصفیه شده موجود در سیستم توزیع	آششیاکلی یا کلی فرم های منفی	آششیاکلی یا کلی فرم های منفی	آب تصفیه شده جهت استفاده
۳		گرم پایی		آششیاکلی یا کلی فرم های منفی

روش های معمول برای تشخیص آلدگی میکروبی آب شامل روش های مبتنی بر کشت نمونه آب و نیز تشخیص آنزیم بتاگالاکتوزیداز (به کمک (ortho-nitrophenyl-β-Dgalactopyranoside است که دارای اشکالاتی مانند دوره انکوباسیون طولانی (۷۷-۴۸ ساعت)، امکان آلدگی با سایر باکتری ها، توانائی اندک در تشخیص باکتری های با رشد کند و عدم توانائی در تشخیص باکتری های "زنده غیرقابل کشت" (VBNC) که اخیراً در ایران بسیار مورد توجه قرار دارند، می باشد (۲ و ۳).

امروزه از روش های مولکولی برای بازیبینی پاتوژن های ویروسی و باکتریایی استفاده می شود. PCR به عنوان روشی اختصاصی و قابل اعتماد برای تشخیص کلی فرم

نظر بهداشتی اهمیت دارند، از نمونه‌های MPN مثبت جداسازی و تخلیص شدند و با روش‌های میکروب‌شناسی تا حد گونه مورد شناسایی قرار گرفتند. به این‌منظور از محیط‌های کشت به این‌منظور IMVIC، EMB، Nutrient agar فنیل آلانین و اوره در کنار رنگ‌آمیزی گرم انجام شد (۸ و ۹).

در این ارزیابی در مرحله کشت تعدادی از نمونه‌های ارسالی به آزمایشگاه باکتریولوژی آب شرکت آب و فاضلاب استان مرکزی در فاصله زمانی مهر ۱۳۹۰ تا اردیبهشت ماه ۱۳۹۱ مورد بررسی قرار گرفت. در این تحقیق آزمایش PCR بر روی سه نوع نمونه انجام گرفت.

الف- نمونه‌های واقعی: ۸۰ نمونه آب از سیستم آبرسانی شهر اراک که شامل ۴۱ نمونه آب چاه، ۳۶ نمونه شبکه آب شرب شهر اراک و ۳ نمونه آب مخازن شهر انتخاب شد.

باکتری‌های استاندارد: که شامل اشرشیاکلی CRM A TCC 25922 و دو نوع CRM بود.

پ- نمونه‌های ساختگی: نمونه‌های BGB مثبت بوده که آلدگی میکروبی آن‌ها به کلی فرم محرز شده بوده. این نمونه‌ها برای تنظیم PCR نگهداری و پاساز داده شد. پس از جداسازی باکتری‌ها، باکتری خالص به نمونه آب MPN منفی اضافه گردید.

۲- انجام آزمایش استاندارد میکروبی (MPN) آب شرب: روش‌های استاندارد آزمون میکروبی آب شامل آزمون تعیین کلی فرم و نیز تعیین اشرشیاکلی به روش کشت می‌باشد. برای اثبات آلدگی آب بر اساس استاندارد ۱۰۱۱ می‌باید وجود باکتری‌های کلی فرم کل (اشرشیاکلی، کلبسیلا، انتروباکتر و سیتروباکتر) و یا اشرشیاکلی اثبات گردد (۳).

مواد و روش‌ها

۱- در این بررسی از سه گروه سویه شامل سویه‌های استاندارد و سویه‌های جدا شده از آب آلدگی در کنار نمونه‌های جمع‌آوری شده از شبکه با هدف افزایش دقیق، جهت ارزیابی و مقایسه روش PCR طراحی شده، استفاده شد:

الف) اشرشیاکلی ATCC 25922 با کمک پرایم‌های اختصاصی انتخاب شده و برای ارزیابی روش مورد مطالعه در تشخیص اشرشیاکلی مورد استفاده قرار گرفت (۷).

ب) بر اساس استانداردهای میکروب‌شناسی آب آمریکا (۱)، از مجموعه باکتری‌های لیوفیلیزه استاندارد (CRM)، جهت ارزیابی روش مورد استفاده در آزمایشگاه‌های میکروب‌شناسی آب استفاده گردید. یک نوع از CRM‌های مورد استفاده (CRM04)، در این روش دارای $83/00 \pm 4$ CFU/۱۰۰ mL باکتری‌های گروه کلی فرم به غیر از اشرشیاکلی و CRM دیگر (CRM07) حاوی 100 ± 2 CFU/۱۰۰ mL باکتری‌های گروه کلی فرم و اشرشیاکلی بود.

در این مرحله با استفاده از دستورالعمل مندرج در کاتالوگ CRM، آزمایش MPN روی هر دو CRM04 و CRM07 انجام گرفت. سپس نتایج مثبت حاصل از هر دو CRM مورد آنالیز میکروبی قرار گرفتند. بدین ترتیب که نمونه‌های مثبت حاصل از مرحله احتمالی MPN روی محیط‌های BGB و EC کشت داده شدند و نمونه‌های مثبت این محیط‌ها بر روی محیط EMB و NA جهت به دست آوردن کلنج خالص کشت داده شد (۶ و ۷). کلنج‌های خالص به دست آمده مستقیماً جهت انجام روش PCR استفاده گردید.

ج- جداسازی باکتری‌ها از آب آلدگی: با هدف ارزیابی روش مورد استفاده باکتری‌های آلدگی کننده آب که از

منتقل می‌شود. تشکیل گاز به هر میزان در لوله‌های دورهای و در هر زمان تا پایان 48 ± 3 ساعت انکوباسیون، بیانگر پاسخ مثبت در این مرحله و وجود باکتری‌های کلی فرم مدفوعی است.

۳- فیلتراسیون و آماده‌سازی نمونه‌ها: در این آنالیز 150 سی سی نمونه‌های مورد نظر از صافی با قطر $0/42$ میکرون با کمک پمپ خلاء عبور داده شدند. برای جلوگیری از آلودگی احتمالی، این عمل زیر لامینار فلو کلاس ۲ انجام گردید.

جدا کردن میکروب‌ها از کاغذ صافی به دو روش صورت پذیرفت:

الف- شستشو با کمک دی‌اتیل پیروکربنات: کاغذ صافی را در بشر 50 سی سی قرار داده و در ابتدا حدود 5 سی سی محلول $1/0$ درصد دی‌اتیل پیروکربنات (DEPC) اتوکلاو شده به بشر اضافه گردید. صافی با کمک سمپلر در دیواره بشر و نیز غوطه‌ور سازی و تلاطم شدید، به خوبی شستشو داده شد و محلول حاصل از شستشو به لوله فالکون سانتریفیوژ منتقل گردید. سپس بار دیگر 5 سی سی دیگر از محلول $1/1$ درصد دی‌اتیل پیروکربنات اتوکلاو شده به بشر اضافه شد و به همان روش ذکر شده در مرحله قبل به خوبی شستشو داده شد و محلول حاصل از شستشو به لوله فالکون سانتریفیوژ منتقل شد و به لوله فالکون سانتریفیوژ منتقل شد.

ب- شستشو با آب مقطر: در این روش کاغذ صافی با استفاده از آب مقطر استریل دقیقاً به همان روش ذکر شده در شستشو با کمک دی‌اتیل پیروکربنات به خوبی شستشو داده شد. 13 سی سی حجم نهایی محلول حاصل از شستشو، با دور 14000 به مدت 10 دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول رویی با دقت با سمپلر حذف

آزمایش MPN به شرح ارائه شده در کتاب استاندارد اجرا گردید (۸). به طور خلاصه، در مرحله احتمالی از آزمایش تخمیر چند لوله‌ای، از محیط کشت لوریل تریپتوز برای استفاده شد. برای آب آشامیدنی، ده لوله حاوی 10 میلی‌لیتر نمونه آماده گردید. بعد از 24 ± 2 ساعت انکوباسیون در دمای $0/5$ ، $35 \pm 0/5$ لوله‌ها از نظر رشد میکروبی و تولید گاز مورد بررسی قرار گرفتند. در صورتی که بعد از 24 ساعت تمامی نمونه‌ها نتایج منفی را نشان دادند، جهت اطمینان از صحیح بودن نتایج منفی، 24 ساعت دیگر نمونه‌ها در انکوباتور قرار داده می‌شوند. عدم واکنش اسیدی یا تولید گاز پس از 48 ± 3 ساعت، بیانگر نتیجه منفی بود. ایجاد واکنش اسیدی یا تولید گاز پس از 48 ± 3 ساعت، بیانگر مثبت بودن آزمایش احتمالی بود. لوله‌های مثبت در واکنش احتمالی به مرحله‌ی تأییدی منتقل شدند. نمونه‌های آب آشامیدنی که رشد میکروبی را بدون واکنش اسیدی و یا تولید گاز نشان دادند، نیز به مرحله‌ی تأییدی منتقل شدند. در مرحله تأییدی، از لوله‌های تخمیری آبگوشت برليانت گرين لاكتوز بايل (BGB) استفاده شد.

لوله‌ها یا بطری‌های مرحله‌ی احتمالی که تولید گاز و اسید در آنها مشاهده شده بود به آرامی تکان داده شدند تا ارگانیسم‌ها در آن به حالت شناور درآیند. با استفاده از یک لوپ استریل 3 میلی‌متر قطر، یک یا بیشتر لوپ کامل از لوله تخمیری مرحله‌ی اول به لوله تخمیر حاوی آبگوشت برليانت گرين لاكتوز بايل در مرحله‌ی تأییدی منتقل شد. لوله‌های مرحله‌ی تأییدی در دمای $35 \pm 0/5^{\circ}\text{C}$ گرمگذاری شدند. تشکیل گاز به هر میزان در لوله‌های دورهای و در هر زمان تا پایان 48 ± 3 ساعت انکوباسیون، بیانگر پاسخ مثبت در این مرحله است (۸). در مورد محیط کشت C نیز همانند BGB یک لوپ استریل از لوله تخمیری مرحله‌ی اول به لوله حاوی EC

باکتری‌های جدا شده در ابتدا در ۲۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل حل شده و سپس دقیقاً مشابه نمونه آب شرب شهری، بنابر روش ذکر شده در بخش ۴/۱ عمل شده و در پایان PCR اجرا گردید.

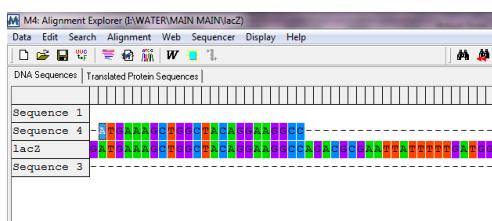
۴- انجام PCR

انتخاب ژن

با انجام Blast در بانک ژنی مشخص شد که ژن lacZ به عنوان ژن کدکننده بتا گالاكتوزیداز در تمام باکتری‌های یاد شده وجود داشته و دارای توالی نسبتاً مشابهی می‌باشد. با انجام Blast نوکلئوتیدی، وجود این ژن در باکتری‌های کلی فرم مورد نظر مانند اشرشیاکلی، سیتروباکتر، کلیسیلا و انتروباکتر اثبات شد.

با بررسی بانک ژنی و منابع علمی مشخص شد (۴) که می‌توان از ژن uidA برای اثبات وجود اشرشیاکلی در نمونه‌های آب به صورت اختصاصی استفاده نمود. بنابراین پرایمرهای Forward و Reverse ژن‌های uidA و lacZ (۴) برای تشخیص وجود باکتری‌های یاد شده در آب انتخاب شدند.

همان‌گونه که در نرمافزار MEGA ویرایش ۰/۴ (شکل ۱) مشاهده می‌شود، با کمک پرایمرهای مشخص شده از ناحیه ۳۹۲ تا ۱۲۶۶ از ژن lacZ، یک قطعه ۸۷۴ جفت بازی انتخاب و مورد شناسائی قرار می‌گیرد.



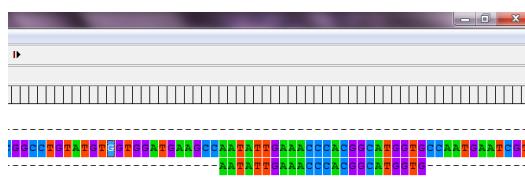
شکل ۱) پرایمرهای فوروارد و ریورس در ناحیه ۳۹۲ تا ۱۲۶۶ از ژن lacZ

(Multiplex PCR) اجرا و نتایج آن مقایسه گردید. در این مطالعه شناسایی نمونه‌ها با تشخیص ژن‌های lac Z و uid A با کمک PCR و به صورت همزمان (Multiplex PCR)

شده و حدود ۱۰ سی‌سی سرم فیزیولوژی اتوکلاو شده به رسوب اضافه گردید. پس از تلاطم، با همان روش سانتریفیوژ شد. بدین ترتیب DEPC از رسوب شسته شد. ۳۰۰ میکرولیتر رسوب نهایی به میکروتیوب ۱/۵ منتقل و پس از سانتریفیوژ در ۱۴۰۰۰ دور بهمدت ۲ دقیقه نهایتاً حدود ۵۰ میکرولیتر رسوب نهایی به عنوان توده باکتریایی به یک میکروتیوب ۱/۵ دیگر منتقل گردید و در مرحله بعد تحت آزمون PCR قرار گرفت. در این بررسی تعدادی از نمونه‌ها به صورت مقایسه‌ای با دی‌اتیل پیروکربنات و بدون آن (استفاده از آب مقطر استریل) مورد آزمایش قرار گرفتند.

به منظور انجام آزمایش PCR، در ابتدا روش‌های جداسازی DNA از باکتری‌های خالص شده و نیز نمونه‌های فیلتر شده آب مورد استفاده قرار گرفت. سپس با هدف تسريع در انجام آزمایش و ساده‌سازی روش در اجرای روتین، از روش PCR مستقیم توده سلولی استفاده شد. در این روش توده سلولی به دست آمده از نمونه‌های آب پس از فیلتراسیون و تغییض مورد استفاده قرار گرفت. بدین ترتیب که حجم نهایی PCR ۲۵ میکرولیتر شامل ۲۰ میکرولیتر کل اجزا به همراه ۵ میکرولیتر توده میکروبی در نظر گرفته شد.

برای انجام PCR روی باکتری‌های خالص نیز از کلینی استفاده گردید. بدین ترتیب که کلینی‌های خالص PCR



Multiplex PCR

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای دو ژن lac Z و uid A به صورت مجزا و همزمان

محصول روی ژل الکتروفورز تشخیص داده شده و نهایتاً نتایج با روش کشت مورد مقایسه قرار گرفت.

(PCR)، مورد بررسی قرار گرفت. از پرایمرهای متدرج در جدول ۲ جهت تکثیر قطعات ۸۷۶ زوج باز از ژن uid A و ۱۴۷ زوج باز از ژن lacZ استفاده شد.

جدول ۲) توالی پرایمرهای مورد استفاده در MultiplexPCR و برنامه طراحی شده اصلاحی جهت کاهش زمان

Primer set	Primer set	ژن هدف	پرایمر PCR	برنامه اصلاح شده	برنامه Multiplex PCR
Coliform bacteria	LZL:ATGAAAGCTGGCTACAGGAAGGCC	lacZ	۹۴-۱ دقیقه	۴۰-۹۴ S	
	LZR:CACCATGCCGTGGGTTCAATATT		۵۵-۱ دقیقه	۴۰-۵۵ S	
			۷۲-۱ دقیقه	۷۲-۳۰ S	۱-۹۴ دقیقه
			Cycles:۲۵	Cycles:۲۳	۱-۵۵ دقیقه
Ecoli	UAL:TGGTAATTACCGACGAAAACGGC	uidA	۴۵-۹۴ S	۴۹-۳۰ S	۸۵۰-۷۲
	UAR:ACCGTGGTACAGTCTIGCG		۶۲-۴۵ S	۵۵-۳۰ S	Cycles:۲۳
			۷۲-۴۵ S	۷۲-۳۰ S	
			Cycles:۳۰	Cycles:۲۳	

سیکل آغازین شامل ۱۰ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی گراد و سیکل پایان ۲ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد می باشد.

موفقیت استفاده شد. مقایسه روش‌های جداسازی DNA با کیت و نیز روش فیلتراسیون کل باکتری‌های نمونه مشخص نمود که در هنگام آزمایش روتین نمونه‌های آب، روش جداسازی DNA با استفاده از کیت، ضمن اعمال مراحل و هزینه‌های اضافی می‌تواند باعث ارائه منفی کاذب و نیز عدم تشخیص احتمالی VBNC گردد.

PCR

سویه‌های استاندارد

الف) انجام PCR روی باکتری اشرشیاکلی ATCC 25922-۸۷۶ bp را در الکتروفورز ارائه نمود که نشانگر طراحی صحیح بررسی می‌باشد.

ب) انجام PCR روی CRM 04 جهت CRMs وجود کلی فرم (به استثنای باکتری اشرشیاکلی) و طراحی صحیح تحقیق می‌باشد. علاوه‌بر این باند bp ۱۴۷ به دست آمده از انجام PCR جهت بررسی وجود ژن uidA نیز نشانگر وجود باکتری اشرشیاکلی در CRM ۰۷ است.

واکنش آمپلیفیکاسیون در حجم نهائی ۲۵ میکرولیتر شامل ۵ میکرولیتر DNA تخلیص شده و یا باکتری رقیق شده، ۲/۵ میکرولیتر بافر، ۱ میکرولیتر dNTPs ۱/۵، آنزیم taq و ۲ میکرولیتر از هر دو نوع پرایمر اضافه شد. مراحل انجام واکنش PCR به این ترتیب بوده است: دمای واسرشتنگی اولیه ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۹ دقیقه و در ادامه ۲۳ سیکل حرارتی برای تکثیر در واکنش PCR به صورت ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵۰ ثانیه طراحی شد (جدول ۲).

یافته‌ها

ژنوم باکتریایی

همان‌گونه که در بخش مواد و روش‌ها ذکر شد، در این بررسی جهت کاهش مراحل انجام PCR، افزایش سرعت عمل و پیرو آن کاهش خطای کارکنان، مرحله جداسازی DNA حذف شده و از روش PCR مستقیم توده سلولی (colony PCR) جهت جداسازی ژنوم با

نیم کاهش یافت. باندهای حاصل از این روش در اندازه‌ای می‌باشد که هیچ‌گونه نیازی به استفاده از پلی‌آکریل آمید برای الکتروفورز نبوده و بنابراین با افزایش ولتاژ هنگام استفاده از ژل آگارز، زمان الکتروفورز نیز کاهش یافت.

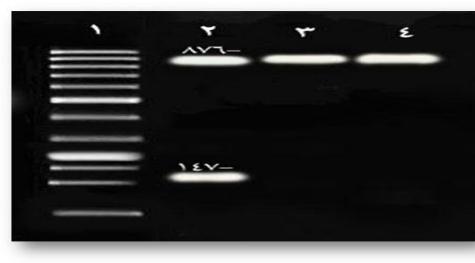
۲- جداسازی و تشخیص باکتری‌های مورد مطالعه از آب شرب

تلخیص باکتری‌های عامل آلودگی آب، اعضای کلی فرم کل، از نمونه‌های MPN مثبت به صورت ایزوله تهیه و آزمایش‌های شناسایی منجر به تشخیص ۴ گونه باکتری‌ای اشرشیاکلی، کلبسیلا پنومونیه و انتروباکتر گردید. نتایج آزمایش‌های بیوشیمیایی برای شناسایی این باکتری‌ها در

جدول ۳ قابل مشاهده می‌باشد (۹).

انجام PCR برای ژن‌های *uidA* و *lacZ* روی این نمونه‌ها، رخداد باندهای ۸۷۶ bp، ۱۴۷ bp را اثبات نمود (جدول ۳). این مسئله مؤید روش بررسی مورد استفاده بود.

همچنین آنالیز میکروبی CRM۰۰۷ و CRM۰۰۴ باکتری‌های از جنس‌های خانواده کلی فرم و اشرشیاکلی را ارائه نمود که از کشت خالص آن‌ها جهت انجام PCR استفاده به عمل آمد. انجام PCR روی تمام این باکتری‌ها به صورت جداگانه، باندهای bp۸۷۶ و bp۱۴۷ را نشان داد که اثبات کننده کاربردی بودن روش ارائه شده در تشخیص آلودگی آب شرب می‌باشد (شکل ۲).



شکل ۲: باندهای بدست آمده از انجام PCR روی باکتری‌های خالص: اشرشیاکلی باند bp۸۷۶ و bp۱۴۷، کلبسیلا باند bp۸۷۶ و کلبسیلا باند bp۱۴۷ که تولید کرده است.

برنامه آمپلیفیکاسیون با کاهش زمان به گونه‌ای تغییر یافت که زمان تکثیر از ۲ ساعت و ۱۵ دقیقه به یک ساعت و

جدول ۳) نتایج آزمایش‌های بیوشیمیایی جهت شناسایی باکتری‌های جدا شده از آب شرب

PCR Product (bp)	Indol	MR	VP	Citrate	Urea	motility	TSI	SH2	Test bacteria
۸۷۶	+	+	-	-	-	+	A/AG	-	اشرشیاکلی
۱۴۷									
۸۷۶	-	-	+	+	+	-	A/AG	-	کلبسیلا پنومونیه
۸۷۶	-	-	+	+	-	+	A/AG	-	انتروباکتر

انجام MPN و نیز PCR روی تمام نمونه‌ها در جدول ۴ نشان داده شده اند.

۳- نتایج بررسی روى نمونه‌های آب

همان‌گونه که در مواد و روش‌ها اشاره شد در این بررسی از ۳ نوع نمونه آب استفاده شده است. نتایج

جدول ۴) نتایج آزمایشات میکروبی MPN و PCR روی نمونه‌های شبکه توزیع، منابع و مخازن شهر اراک در

فاصله زمانی مهر ۱۳۹۰ تا اردیبهشت ماه ۱۳۹۱

نمونه های کنترل (N=۲۴)		(N=۳۶)		شبکه توزیع (N=۳۶)		مخازن (N=۳)		آزمایش	
مشیت	منفی	مشیت	منفی	مشیت	منفی	مشیت	منفی	مشیت	منفی
۱۲	۱۲	۲	۳۹	۰	۲۶	۰	۳	MPN	
۱۲	۱۲	۲	۳۹	۵	۳۱	۰	۳	PCR	

ترئم در سال ۲۰۰۹ از آمپلیفیکاسیون ژن lac Z (کدکنندهٔ بتاگالاكتوزیداز) برای اثبات وجود یا عدم وجود کلی فرم‌ها در آب آشامیدنی استفاده کرد. وی در این بررسی‌ها آزمایش PCR را تنها بر روی ۸ نمونه آب انجام داد در حالی‌که در مطالعه پیش رو از ۸۰ نمونه آب شرب شامل منابع، مخازن و شبکه توزیع و همچنین باکتری‌های خالص شده و CRMs استفاده شده است. تفاوت دیگر در نوع PCR مورد استفاده می‌باشد، در بررسی ترئم از PCR ساده و تنها از ژن lac Z به عنوان ژن هدف جهت شناسایی باکتری‌های کلی فرم استفاده شد در حالی‌که در بررسی کنونی از روش Multiplex PCR و ژن‌های lac Z و uidA جهت شناسایی باکتری‌های کلی فرم و همچنین اشرشیاکلی استفاده شده است. نتایج به دست آمده نشان دادند تکنیک PCR که به تشخیص مولکولی مادهٔ ژنتیکی ارگانیسم‌ها در آب می‌پردازد، دارای ویژگی‌های منحصر به فردی است که مزیت آن را نسبت به روش‌های متداول آزمایشگاهی نشان می‌دهد (۵).

روزینا گیرونز (RosinaGirone) در سال ۲۰۱۰ ضمن بررسی روش‌های تشخیص مولکولی پاتوژن‌های آب (مزایا و معایب تکنیک‌های مولکولی) (۶)، نقش خطرناک باکتری‌ها در آب جهت تشکیل biofilm، ایجاد بیماری و همچنین وجود باکتری‌های VBNC مورد مطالعه قرار داده است. نام بردۀ از ژن 16srRNA جهت شناسایی کلی فرم‌ها استفاده نمود، در حالی‌که با بررسی بانک‌های ژنی مشخص می‌شود که این ژن اختصاصیت صد درصد را در مورد باکتری‌های کلی فرم ندارد و می‌بایست از ژن‌های اختصاصی همانند lac Z استفاده شود (۵ و ۶).

روش‌های کشت و شناسایی کلی فرم‌ها دارای محدودیت‌هایی مانند دوره انکوباسیون طولانی، تداخل

همان‌گونه که در جدول ۴ مشاهده می‌شود از تعداد کل نمونه‌های شبکه توزیع آب ارسالی به آزمایشگاه باکتریولوژی آب و فاضلاب استان مرکزی، ۵ نمونه دارای نتیجه مثبت در PCR بوده‌اند در حالی که نتایج MPN منفی گزارش شده است.

سایر نمونه‌های شبکه در هر آزمایش PCR و MPN دارای نتایج یکسانی بوده و نتایج هر دو آزمایش منفی بودند. در مورد نمونه‌های چاه نتایج به این شرح می‌باشد: از تعداد ۴۱ نمونه، ۲ نمونه مثبت در هر دو آزمایش PCR و MPN می‌باشند و مابقی نتایج نمونه‌های چاه، در هر دو روش PCR و MPN منفی گزارش شده است. در هر دو هنده تطابق نتایج هر دو آزمایش با یکدیگر می‌باشد. همچنین در هر دو آزمایش PCR و MPN نتایج همه نمونه‌های آب مخازن منفی بوده است.

بحث

در بررسی کنونی، روش‌های متداول شناسایی کلی فرم‌ها با متدهای جدید مولکولی مقایسه و حساسیت و دقت این روش‌ها در کاربرد عملیاتی ارزیابی شده است. در این مطالعه، یک روش مولکولی برای کاهش حجم عملیات روتین در آزمایشگاه باکتریولوژی آب کشور، کاهش هزینه‌های آنالیز نمونه‌ها، افزایش دقت عملکرد و احتمال پوشش‌دهی باکتری‌های VBNC موجود در آب ارائه و به صورت عملیاتی اجرا گردید. هدف‌گذاری طرح بر مبنای استفاده روش PCR در غربالگری اولیه نمونه‌های پذیرش شده در روز می‌باشد. با توجه به اینکه بیشتر، درصد بالایی از نمونه‌های روزانه منفی می‌باشند، غربالگری اولیه با PCR، حذف نمونه‌های منفی و تمرکز آزمایش‌ها روی نمونه‌های مثبت، باعث کاهش مصرف محیط کشت و درگیری کارشناس در ساخت و حذف محیط‌ها خواهد شد.

از مزایای سیستم PCR، حساسیت روش (تشخیص باکتری‌های هدف در حداقل غلظت)، اختصاصی بودن روش برای میکروارگانیسم‌های هدف، سرعت انجام آزمایش از زمان جمع‌آوری نمونه‌ها تا اتمام آنالیز آنها (کمتر از ۴ ساعت) و توانایی شناسایی چند باکتری به‌طور همزمان شامل گونه‌های شاخص عمومی و تعدادی از پاتوژن‌های اختصاصی هدف) می‌باشد (۱۲). با عنایت به معرض نوپدید باکتری‌های زنده ولی غیرقابل کشت (VBNC) و نقش آنها در بهداشت عمومی، نتایج طرح این نکته را مشخص نمود که احتمالاً روش مولکولی ارائه شده قادر به تشخیص باکتری‌های VBNC نیز می‌باشد (۱۳). از سوی دیگر، از دیدگاه توجیه اقتصادی، با توجه به بررسی‌های صورت گرفته هزینه تمام شده بر مبنای روش‌های کشت بیشتر از روش PCR می‌باشد. در روش PCR ساخت محیط کشت حذف شده و هزینه استهلاک دستگاهی کاهش می‌یابد. زمان صرف شده توسط کارشناس و پیرو آن خطای کارکنان نیز به حداقل می‌رسد. روش PCR مورد بحث قادر است هر سه مرحله آزمایش MPN (شناسایی کلی فرم کل، کلی فرم مدفوعی و نیز اشرشیاکلی) را در حداقل زمان و با حساسیت بالا پوشش دهد، پس می‌توان از روش PCR حداقل جهت غربالگری اولیه نمونه‌های آب پذیرش شده در روز استفاده نمود.

نمونه‌هایی که PCR طی چند ساعت مثبت اعلام می‌کند، وارد مرحله کشت و شمارش می‌شوند. در این طرح، با هدف کاهش زمان عملیات، زمان اجرای PCR از ۲ ساعت و ۱۵ دقیقه به یک ساعت و چهل و پنج کاهش یافت. باندهای حاصل از این روش در اندازه‌ای می‌باشند که هیچ‌گونه نیازی به استفاده از پلی‌اکریل آمید برای الکتروفورز نبوده و بنابراین با

سایر میکروارگانیسم‌ها، نبود دقت و حساسیت لازم و شناسایی ضعیف باکتری‌های VBNC است (۸-۱۱). استفاده از روش‌های مولکولی برای شناسایی سریع کلی‌فرم‌ها به عنوان روشی با دقت و سریع پیشنهاد شده است (۱۰).

تکنیک‌های مولکولی ابزاری دقیق، سریع و حساس برای مطالعه باکتری‌های بیماری‌زای شاخص محسوب می‌شوند. این ابزارها می‌توانند جهت آنالیز دقیق آب آشامیدنی و کارایی حذف پاتوژن‌ها در آب آشامیدنی PCR و تصفیه آب مورد استفاده قرار گیرند (۱۲). lacZ می‌تواند باکتری‌های کلی‌فرم را با استفاده از ژن lacZ (ژن بتاگالاکتوزیداز) و باکتری اشرشیاکلی را با استفاده از ژن uid A (ژن بتا‌دی‌گلوکورونیداز) شناسایی کند (۴). در این تحقیق از ژن lacZ به عنوان مولکول هدف برای شناسایی باکتری‌های گروه کلی‌فرم با موفقیت مورد استفاده قرار گرفت. مشاهده قطعه ژن bp۸۷۶ شاخص وجود کلی‌فرم کل در نمونه تعیین گردید. علاوه‌بر این، ژن uidA که به‌طور اختصاصی در باکتری اشرشیاکلی (بین کلی‌فرم‌ها) وجود دارد به عنوان مولکول هدف برای شناسایی باکتری اشرشیاکلی استفاده شده است که با استفاده از pR174 پرایمرهای طراحی شده، قطعه ژنی حدود bp۱۷۴ به دست آمد. برای اثبات صحت عملکرد دو ژن نام برد، در ابتدا سویه استاندارد سپس (CRM) مورد بررسی قرار گرفته و رخداد باندها در الکتروفورز تأیید گردید. از MPN به عنوان استاندارد مرجع استفاده شد تا هر گونه خطأ در تفسیر نتایج به حداقل برسد. برای تأیید هرچه بیشتر نتایج، باکتری‌هایی جداسازی شده در آزمایش MPN تا حد گونه شناسایی شدند و سپس بر روی این باکتری‌ها، ارزیابی مولکولی با موفقیت صورت پذیرفت.

باند bp^{876} برای ژن lacZ برای همه گونه‌های *E. coli* ایجاد نمود.

در این بررسی سریع تشخیص همزمان کلی فرم کل و اشرشیاکلی در آب آشامیدنی با کمک PCR طراحی و در کار روتین مورد آزمایش قرار گرفت. اعتبار نتایج و مقایسه همزمان آن‌ها با روش معمول کشت، اجرای متدهای نمونه‌های استاندارد، باکتری‌های جدا شده از نمونه‌های MPN مثبت و CRM در نمونه‌های مختلف چاه، شبکه و مخزن مورد ارزیابی و تأیید قرار گرفت. با توجه به حجم نمونه ورودی به آزمایشگاه‌های آب و فاضلاب تلاش گردید زمان اجرای آزمایش به حداقل ممکن کاهش یابد. تلاش گردید بررسی کنونی به صورت جامع اجرا گردد به نحوی که محدودیت‌های بررسی‌های دیگران از جمله تعداد و تنوع نمونه‌ها، دقیقت در اجرای کار مولکولی به ویژه استفاده همزمان از دو ژن و استفاده از استانداردهای متنوع و مناسب را در برداشته باشد. بدیهی است اجرای کار مولکولی به صورت ضروری اجتناب ناپذیر مطرح است و می‌باید کاستی‌های آزمایشگاه‌ها از این دیدگاه به تدریج برطرف گردد. در این بررسی روش‌های مولکولی تا حد امکان ساده‌سازی گردید به گونه‌ایی که توسط کارشناسان، با حداقل اطلاعات مولکولی قابل اجرا باشد.

بدین ترتیب روش Multiplex PCR ارائه شده با توجه به حساسیت ویژه بر سلامت عمومی جامعه، دست کم به عنوان آزمایش غربالگری اولیه می‌تواند مورد استفاده قرار گرفته و نمونه‌های مثبت شده در این آزمایش می‌تواند به صورت تصادفی مورد آزمون PCR قرار گیرد.

افزایش ولتاژ هنگام استفاده از ژل آگارز، زمان الکتروفورز نیز کاهش یافت. علاوه بر انرژی بر بودن روش‌های روتین کشت آزمایشگاهی، در برخی موارد به علت کم بودن تعداد باکتری‌های بیماری‌زا در آب (کمتر از حد تشخیص توسط محیط کشت) احتمال منفی شدن MPN و یا عدم تشخیص اشرشیاکلی محتمل است (۱۴). در روش‌های مولکولی حد تشخیص بسیار کمتر از محیط کشت است و باکتری‌ها در تعداد اندک نیز شناسایی می‌شوند. ضمن اینکه اصولاً تنها روش موجود جهت شناسایی VBNC، روش‌های مولکولی می‌باشد (۱۵ و ۱۶). در این مطالعه با هدف کاهش پاسخ‌های احتمالی منفی کاذب MPN و شناسایی احتمالی VBNC، از فیلتراسیون نمونه‌ها با روش ارائه شده توسط WHO (۱) استفاده به عمل آمده است.

همان‌گونه که در جدول ۴ ذکر شده است، نتایج PCR و MPN در مورد ۵ نمونه آب شبکه‌های توزیع یکسان نیستند. این نتایج متفاوت را می‌توان به این صورت توجیه نمود که احتمالاً نتایج مثبت مربوط به وجود باکتری‌های VBNC می‌باشد. مطالعات انجام گرفته نشان می‌دهد که باکتری‌های گروه کلی فرم موجود در آب، در شرایط محیطی خاص می‌توانند تبدیل به فرم VBNC شوند که توسط محیط کشت غیرقابل تشخیص می‌باشند (۵ و ۶).

در این تحقیق با استفاده ژن‌های lacZ و uidA، شناسایی همزمان باکتری‌های کلی فرم کل برای اشرشیاکلی در آب آشامیدنی انجام شده است. شناسایی با استفاده از الکتروفورز ژل آگاروز یک باند bp^{876} برای ژن lacZ برای همه باکتری‌های کلی فرم و یک باند bp^{147} برای ژن uidA و یک

MPN اجرا گردید. علاوه بر این از سویه‌های متعدد استاندارد و جداسازی شده از آب نیز جهت تأیید نتایج استفاده شد. نتایج کارآمد بودن روش مولکولی ارائه شده را اثبات نمود.

نتیجه گیری

این تحقیق روشی سریع و با هزینه‌بری کمتر را جهت ارزیابی میکروبی آب شرب پیشنهاد نمود. روش پیشنهادی به صورت عملیاتی با تعداد گوناگونی از نمونه‌های شبکه، مخزن و چاه به صورت مقایسه‌ای با

References:

- Andrew D, Eaton S, Lenore S. Microbiological examination. In: Clesceri W, Rice M, Arnold E. standard methods for the examination of water and wastewater. 21st ed. America: America public health association,2005, 9.1- 9.168.
- Bej AK, Steffan RJ, DiCesare J, et al. Detection of coliform bacteria in water by polymerase chain reaction and gene probes. Appl Environ Microbiol 1990; 56:307-14.
- Aslani M, Panahi F. Drinking water. ISIR.2004; 35: 1-66.
- Tantawiwat S, Tansuphasiri U, Wongwit W, et al. Development of multiplex PCR for the detection of totalcoliformbacteria for Escherichiacoli and Clostridiumperfringens in drinkingwater. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2005; 36:162-9.
- Tharannum S, Sarah Sunitha S, Nithya, J. Molecular confirmation of the presence of coliforms in drinking water using polymerase chain reaction. kathmandu Univ J Sci Eng Technol 2009; 5: 130-6.
- Girones R, Ferrús MA, Alonso JL, et al. Molecular detection of pathogens in water--the pros and cons of molecular techniques. Water Res 2010; 44: 4325-39.
- Bej AK, Steffan RJ, DiCesare J, et al. Detection of coliformbacteria in water by polymerase chain reaction and geneprobes. Appl Environ Microbiol. 1990 Feb; 56: 307-14.
- Abo-Amer AE, Soltan el-SM, Abu-Gharbia MA. Molecular approach and bacterial quality of drinking water of urban and rural communities in Egypt. Acta Microbiol Immunol Hung 2008; 55: 311-26.
- Rompré A, Servais P, Baudart J, et al. Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches. J MicrobialMethods. 2002; 49: 31-54.
- Liu Y, Zhang C, Wang X. Simultaneous detection of enteric bacteria from surface waters by QPCR in comparison with conventional bacterial indicators. Environ. Monit Assess 2009; 158: 535-44.
- Bej AK, Dicesare JL, Haff L, et al. Detection of Escherichia coli and Shigella spp in water by using the polymerase chain reaction and gene probes for uid. Appl Environ Microbiol 1991; 57: 1013-7.
- Campbell GR, Prosser J, Glover A, et al. Detection of Escherichia coli O157:H7 in soil and water using multiplex PCR. J Appl Microbiol 2001; 91: 1004-10.
- Toze S. PCR and the detection of microbial pathogens in water and waste water. Wat Res 1999; 33: 3545- 56.
- Iqbal S, Robinson J, Deere D, et al. Efficiency of the polymerase chain reaction amplification of the gene for detection of Escherichia coli in contaminated water. Lett Appl Microbiol. 1997; 24: 498-502.
- Tani K, Kurokawa K, Nasu M. Development of a direct in situ PCR method for detection of specific bacteria in natural environments. Appl Environ Microbiol 1998; 64: 1536-40.
- El-Jakee J, Moussa E I, Mohamed KF, et al. Using Molecular Techniques for Characterization of Escherichia coli Isolated from Water Sources in Egypt. Global Veterinaria 2009; 3: 354-362.

Orginal Article

Comparison of PCR with Standard Method (MPN) for detection of bacterial contamination in drinking water

**F. Dehghan^{1,3}, MR. Zolfaghari¹, M. Arjomandzadegan^{2*}, S. Geravand²,
Gh R. Ahamri³, S. Kalantari³, AR. Kasravi⁴**

¹

¹ Department Of Microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, IRAN

²Tuberculosis and Pediatric Infectious Diseases Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, IRAN

³ Hygiene and Quality Control Office of Markazi Province, Water and Wastewater Company, IRAN

⁴Department of Microbiology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Arak, IRAN

(Received 27 May, 2013 Accepted 19 Jun, 2013)

Abstract

Background: Detection of bacterial contamination in drinking water by culture method is a time and cost consuming method and spends a few days depending on contamination degree. However, the people use the tap water during that time. Molecular methods are rapid and sensitive. In this study a rapid Multiplex PCR method was used for rapid analysis both coliform bacteria and E.coli, and probable detection of VBNC bacteria in drinking water, the experiments were performed in bacteriological lab of water and Wastewater Corporation in Markazi province.

Material and Methods: Amplification of a fragment from each of *lacZ* and *uidA* genes in a Multiplex PCR was used for detection of coliforms. Eight samples was taken from Arak drinking water system including 36 samples of wells, 41 samples of water distribution network and 3 samples from water storages were examined by amplification of *lacZ* and *uidA* genes in a Multiplex PCR. Equivalently, the MPN test was applied as a standard method for all samples for comparison of results. Standard bacteria, pure bacteria isolated from positive MPN and CRM were examined by PCR and MPN method.

Results: The result of most samples water network, water storages, and water well were same in both MPN and PCR method .The results of standard bacteria and pure cultures of bacteria isolated from positive MPN and CRM confirmed the PCR method. Five samples were positive in PCR but negative in MPN method. Duration time of PCR was decreased about 105 min by changing the PCR program and electrophoreses factors.

Conclusion: The Multiplex PCR can detect coliform bacteria and E.coli synchronous in drinking water.

Key words: Comparison, PCR method, Bacterial contamination, Drinking water, MPN method

Address for correspondence: Tuberculosis and Pediatric Infectious Research Center and Department of Microbiology, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran, mmatinam81@yahoo.com, arjomandzadegan@arakmu.ac.ir

Website: <http://bpums.ac.ir>

Journal Address: <http://ismj.bpums.ac.ir>