دوماهنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست- پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال هفدهم، شماره ۵، صفحه ۸۷۸ – ۸۶۷ (آذر و دی ۱۳۹۳)

ISMJ 2014;17(5): 867-878

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

فاطمه دهقان [۱ و ۳]، محمدرضا ذوالفقاری [۲]، محمد ارجمندزادگان [۲*]، سمیه گراوند [۲]، غلامرضا احمری [۳]، سالومه کلانتری [۳]، علیرضا کسروی [۴]

[۱] دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، گروه میکروبیولوژی، قم، ایران
[۲] مرکز تحقیقات سل و عفونی کودکان، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
[۳] دفتر کنترل کیفیت و بهداشت شرکت آب و فاضلاب استان مرکزی
[۴] گروه 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 بری، زمان‌بر بوده و بر حسب میزان آلودگی چند روز به‌طول می‌انجامد. این درحالی 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 آمپلی‌فیکاسیون ژن‌های **lacZ** و **uidA** مورد آزمایش **Multiplex PCR** قرار گرفتند. همچنین آزمایش **MPN** به‌عنوان روشی استاندارد و جهت مقایسه یافته‌ها، روی تمامی نمونه‌ها انجام شد. روش‌های **Multiplex PCR** و **MPN** روی باکتری استاندارد، باکتری‌های خالص شده از نمونه‌های **MPN** مثبت و نیز **CRM**(**Certificated Reference Material**)، (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.

نتیجه‌گیری: 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
Email:arjomandzadegan@arakmu.ac.ir, mmatinam81@yahoo.com

مقدمه

باکتری‌های کلیفرم مهم‌ترین شاخصی هستند که در آزمایشات باکتریولوژیکی آب‌ها مورد توجه قرار می‌گیرند. تعیین کلی‌فرم به‌عنوان شاخص آلودگی آب در استاندارد شماره ۱۰۱۱ (ویژگی‌های میکروبیولوژیکی آب) تبیین شده و همان‌گونه که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، استفاده از اشرشیاکلی، سایر کلی‌فرم‌های گرماپای و کلی‌فرم‌ها به‌عنوان باکتری‌های نشانگر در کنترل روزمره آب آشامیدنی توصیه شده است (۱).

جدول ۱) ویژگی‌های استاندارد میکروبیولوژی آب آشامیدنی

ردیف	نوع آب	نوع باکتری	حدمجاز در ۱۰۰ میلی‌لیتر
۱	کلیه آب‌های آشامیدنی	اشرشیاکلی یا کلی‌فرم‌های گرماپای	منفی
۲	آب تصفیه شده جهت استفاده در شبکه توزیع	اشرشیاکلی یا کلی‌فرم‌های گرماپای	منفی
۳	آب تصفیه شده موجود در سیستم توزیع	اشرشیاکلی یا کلی‌فرم‌های گرماپای	منفی

روش‌های معمول برای تشخیص آلودگی میکروبی آب شامل روش‌های مبتنی بر کشت نمونه آب و نیز تشخیص آنزیم بتاگالاکتوزیداز (به کمک ortho-nitrophenyl-β-Dgalactopyranoside) بوده است که دارای اشکالاتی مانند دوره انکوباسیون طولانی (۷۲-۴۸ ساعت)، امکان آلودگی با سایر باکتری‌ها، توانائی اندک در تشخیص باکتری‌های با رشد کند و عدم توانائی در تشخیص باکتری‌های "زنده غیرقابل کشت" (VBNC) که اخیراً در ایران بسیار مورد توجه قرار دارند، می‌باشد (۲ و ۳).

امروزه از روش‌های مولکولی برای بازبینی پاتوژن‌های ویروسی و باکتریایی استفاده می‌شود. PCR به‌عنوان روشی اختصاصی و قابل اعتماد برای تشخیص کلی‌فرم در آب آشامیدنی توصیه شده است (۴). در PCR از آمپلی‌فیکاسیون ژن (beta-galactosidase lacZ(gene برای تشخیص توتال کلی‌فرم و از ژن (beta-DuidA glucuronidase gene) برای تشخیص E. Coli به‌صورت اختصاصی استفاده می‌شود (۴). با توجه به معایب یاد شده روش‌های معمول کشت، حجم بالای نمونه‌های ورودی به آزمایشگاه و همچنین از نظر دیدگاه اقتصادی، در این بررسی روش مولکولی PCR جهت تشخیص سریع کلی‌فرم کل و مدفوعی در آب شرب مورد استفاده قرار گرفته است.

محققی به‌نام بژ (Bej) در سال ۱۹۹۰ از آمپلیفیکاسیون ژن lac Z (کدکننده‌ی بتاگالاکتوزیداز) و lam B برای اثبات وجود یا عدم وجود کلی‌فرم‌ها و اشرشیاکلی در آب آشامیدنی استفاده کرد. روش PCR مورد استفاده در این روش یک PCR ساده بوده است و نتایج به‌دست آمده از این بررسی مؤید برتری روش‌های مولکولی در شناسایی آلودگی باکتریایی در آب می‌باشد (۲).

از دیگر بررسی‌های انجام شده در این مورد می‌توان به پژوهش انجام شده توسط تانتاویوات (Tantawiwat) در سال ۲۰۰۵ تحت عنوان بررسی وجود اشرشیاکلی و کلستریدیوم پرفرنژنز با استفاده از روش Multiplex PCR اشاره کرد. نام برده از ژن lac Z و plc استفاده نمود و نتایج به‌دست آمده از بررسی نیز نشان دهنده دقت و اختصاصیت بالای روش مولکولی جهت شناسایی باکتری‌ها در آب می‌باشد (۴).

هدف این بررسی مقایسه و ارزیابی روش کشت (MPN) و روش PCR با کمک ژن‌های lac Z و uidA، در شناسایی باکتری‌های کلی‌فرم کل (سیتروباکتر، کلبسیلا، اشرشیاکلی و انتروباکتر) و همچنین روتین سازی آزمایش جهت اجرای عملیاتی در آزمایشگاه‌های میکروب‌شناسی آب می‌باشد.

مواد و روش‌ها

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

الف) اشرشیاکلی ATCC 25922 با کمک پرایمرهای 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 ۸۳/۰۰±۴ CFU/۱۰۰mL باکتری‌های گروه کلی‌فرم به غیر از اشرشیاکلی و CRM دیگر (CRM07) حاوی ۱۰۰±۲CFU/۱۰۰mLباکتری‌های گروه کلی‌فرم 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. بدین‌ترتیب 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 به‌دست آوردن کلنی خالص کشت داده شد (۶ و ۷). کلنی‌های خالص به دست آمده مستقیماً جهت انجام روش PCR استفاده گردید.

ج- جداسازی باکتری‌ها از آب آلوده: با هدف ارزیابی روش مورد استفاده باکتری‌های آلوده کننده آب که از 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 Nutrient agar، EMB، IMVIC، 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 مهر۱۳۹۰ 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 A TCC 25922 و دو نوع CRM بود.

پ- نمونه‌های ساختگی: نمونه‌های BGB مثبت بوده که آلودگی میکروبی آن‌ها به کلی فرم محرز شده بوده. این نمونه‌ها برای تنظیم PCR نگهداری و پاساژ 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 به‌روش کشت می‌باشد. برای اثبات آلودگی آب بر اساس استاندارد ۱۰۱۱ می‌باید وجود باکتری‌های کلی‌فرم کل (اشرشیاکلی، کلبسیلا، انتروباکتر و سیتروباکتر) و یا اشرشیاکلی اثبات گردد (۳).

آزمایش MPN به‌شرح ارائه شده در کتاب استاندارد اجرا گردید (۸). به‌طور خلاصه، در مرحله‌ی احتمالی از آزمایش تخمیر چند لوله‌ای، از محیط کشت لوریل تریپتوز برات استفاده شد. برای آب آشامیدنی، ده لوله حاوی ۱۰ میلی‌لیتر نمونه آماده گردید. بعد از ۲±۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۰/۵±۳۵، لوله‌ها از نظر رشد میکروبی و تولید گاز مورد بررسی قرار گرفتند. در صورتی که بعد از ۲۴ ساعت تمامی نمونه‌ها نتایج منفی را نشان دادند، جهت اطمینان از صحیح بودن نتایج منفی، ۲۴ ساعت دیگر نمونه‌ها در انکوباتور قرار داده می‌شوند. عدم واکنش اسیدی یا تولید گاز پس از ۳±۴۸ ساعت، بیانگر نتیجه منفی بود. ایجاد واکنش اسیدی یا تولید گاز پس از ۳±۴۸ 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 تولیدگاز نشان دادند، نیز به مرحله‌ی تأییدی منتقل شدند. در مرحله تأییدی، از لوله‌های تخمیری آبگوشت برلیانت گرین لاکتوز بایل (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 ۳ میلی‌متر قطر، یک یا بیشتر لوپ کامل از لوله تخمیری مرحله‌ی اول به لوله تخمیر حاوی آبگوشت برلیانت گرین لاکتوز بایل در مرحله‌ی تأییدی منتقل شد. لوله‌های مرحله‌ی تأییدی در دمای ۰/۵±۳۵C گرماگذاری شدند. تشکیل گاز به هر میزان در لوله‌های دورهام و در هر زمان تا پایان ۳±۴۸ 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 منتقل می‌شود. تشکیل گاز به هر میزان در لوله‌های دورهام و در هر زمان تا پایان ۳±۴۸ ساعت انکوباسیون، بیانگر پاسخ مثبت در این مرحله و وجود باکتری‌های کلی‌فرم مدفوعی است.

۳- فیلتراسیون و آماده‌سازی نمونه‌ها: در این آنالیز ۱۵۰ سی‌سی نمونه‌های مورد نظر از صافی با قطر ۰/۴۲ 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 ۵۰ سی‌سی قرار داده و در ابتدا حدود ۵ سی‌سی محلول ۰/۱ 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 ۵ سی‌سی دیگر از محلول ۰/۱ 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 گردید. در نهایت کاغذ صافی با ۳ سی‌سی از محلول دی‌اتیل پیروکربنات شستشو داده 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. ۱۳ سی‌سی حجم نهایی محلول حاصل از شستشو، با دور۱۴۰۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول رویی با دقت با سمپلر حذف

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

به‌منظور 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 تسریع در انجام آزمایش و ساده‌سازی روش در اجرای روتین، از روش PCR مستقیم توده سلولی استفاده شد. در این روش توده سلولی به‌دست آمده از نمونه‌های آب پس از فیلتراسیون و تغلیظ مورد استفاده قرار گرفت. بدین‌ترتیب که حجم نهایی PCR، ۲۵ میکرولیتر شامل ۲۰ میکرولیتر کل اجزا PCR به‌همراه ۵ میکرولیتر توده میکروبی در نظر گرفته شد.

برای انجام PCR روی باکتری‌های خالص نیز از کلنی PCR استفاده گردید. بدین‌ترتیب که کلنی‌های خالص 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 به‌عنوان ژن کدکننده بتا گالاکتوزیداز در تمام باکتری‌های یاد شده وجود داشته و دارای توالی نسبتاً مشابهی می‌باشد. با انجام Blast نوکلئوتیدی، وجود این ژن در باکتری‌های کلی‌فرم مورد نظر مانند اشرشیاکلی، سیتروباکتر، کلبسیلا 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 به‌صورت 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

مراحل Multiplex PCR

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای دو ژن lac Z و uid A به‌صورت مجزا و همزمان (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 به‌صورت همزمان (Multiplex

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

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

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

Primer set	Primer set	ژن هدف	برنامه PCR	برنامه اصلاح شده	برنامه Multiplex PCR
Coliform bacteria	LZL:ATGAAAGCTGGCTACAGGAAGGCC LZR:CACCATGCCGTGGGTTTCAATATT	*lacZ*	۹۴-۱ دقیقه ۵۵-۱ دقیقه ۷۲-۱ دقیقه Cycles:۲۵	۹۴ s-۴۰ ۵۵ s-۴۰ ۳۰ s-۷۲ Cycles:۲۳	۹۴-۱ دقیقه ۵۵-۱ دقیقه ۷۲ s ۵۰- Cycles:۲۳
Ecoli	UAL:TGGTAATTACCGACGAAAACGGC UAR:ACGCGTGGTTACAGTCTTGCG	*uidA*	۹۴ s-۴۵ ۴۵ s-۶۲ ۴۵ s-۷۲ Cycles:۳۰	۳۰ s-۴۹ ۳۰ s-۵۵ ۳۰ s-۷۲ Cycles:۲۳	

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

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 واحد آنزیم taq و ۲ میکرولیتر از هر دو نوع پرایمر اضافه شد. مراحل انجام واکنش PCR به این‌ترتیب بوده است: دمای واسرشتگی اولیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۹ دقیقه و در ادامه ۲۳ سیکل حرارتی برای تکثیر در واکنش PCR به‌صورت ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه، ۵۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت 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 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.

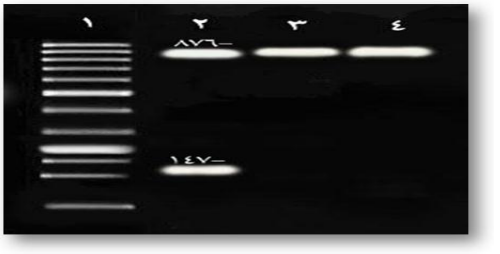
PCR

سویه‌های استاندارد

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

ب) CRMs انجام PCR روی CRM 04 جهت جستجوی ژن lacZ باند ۸۷۶bp را نشان داد که نشانگر وجود کلی فرم (به استثنای باکتری اشرشیاکلی) و طراحی صحیح تحقیق می‌باشد. علاوه‌بر این باند ۱۴۷bp به‌دست آمده از انجام PCR جهت بررسی وجود ژن uidA نیز نشانگر وجود باکتری اشرشیاکلی در CRM۰۷ است.

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



شکل۲: باندهای به‌دست آمده از انجام PCR روی باکتری‌های خالص: اشرشیاکلی باند bp۸۷۶ و bp۱۴۷، انتروباکتر باند۸۷۶ bp و کلبسیلا باند۸۷۶ bpتولید کرده است.

برنامه آمپلیفیکاسیون با کاهش زمان به‌گونه‌ای تغییر یافت که زمان تکثیر از ۲ ساعت و ۱۵ دقیقه به یک ساعت و نیم کاهش یافت. باندهای حاصل از این روش در اندازه‌ای می‌باشند 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 به‌صورت ایزوله تهیه و آزمایش‌های شناسایی منجر به تشخیص ۴ گونه باکتریایی اشرشیاکلی، کلبسیلا پنمونیه و انتروباکتر گردید. نتایج آزمایش‌های بیوشیمیایی برای شناسایی این باکتری‌ها در جدول ۳ قابل مشاهده می‌باشد (۹).

انجام PCR برای ژن‌های lacZ و uidA روی این نمونه‌ها، رخداد باندهای ۸۷۶ bp، و۱۴۷bp را اثبات نمود (جدول ۳). این مسئله مؤید روش بررسی مورد استفاده بود.

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

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

۳- نتایج بررسی روی نمونه‌های آب

همان‌گونه که در مواد و روش‌ها اشاره شد در این بررسی از ۳ نوع نمونه آب استفاده شده است. نتایج انجام MPN و نیز PCR روی تمام نمونه‌ها در جدول ۴ نشان داده شده اند.

جدول ۴) نتایج آزمایشات میکروبی MPN و PCR روی نمونه‌های شبکه توزیع، منابع و مخازن شهر اراک در فاصله زمانی مهر۱۳۹۰ تا اردیبهشت‌ماه ۱۳۹۱

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

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 MPN و PCR می‌باشند و مابقی نتایج نمونه‌های چاه، در هر دو روش PCR و MPN منفی گزارش شده است که نشان‌دهنده تطابق نتایج هر دو آزمایش با یکدیگر می‌باشد. همچنین در هر دو آزمایش MPN و PCR نتایج همه نمونه‌های آب مخازن منفی بوده است.

بحث

در بررسی کنونی، روش‌های متداول شناسایی کلی‌فرم‌ها 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 به‌صورت 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.

ترنّم در سال ۲۰۰۹ از آمپلیفیکاسیون ژن lac Z (کدکننده‌ی بتاگالاکتوزیداز) 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 ترنّم از PCR ساده و تنها از ژن lac Z به‌عنوان 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 به‌دست آمده نشان دادند تکنیک PCR که به تشخیص مولکولی ماده‌ی 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 برده از ژن ۱۶srRNAجهت شناسایی کلی‌فرم‌ها استفاده نمود، در حالی‌که با بررسی بانک‌های ژنی مشخص می‌شود که این ژن اختصاصیت صد در صد را در مورد باکتری‌های کلی‌فرم ندارد و می‌بایست از ژن‌های اختصاصی همانند lac Z استفاده شود (۵ و ۶).

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

سایر میکروارگانیسم‌ها، نبود دقت و حساسیت لازم و شناسایی ضعیف باکتری‌های VBNC است (۱۱-۸). استفاده از روش‌های مولکولی برای شناسایی سریع کلی‌فرم‌ها به‌عنوان 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 و تصفیه آب مورد استفاده قرار گیرند (۱۲). PCR می‌تواند باکتری‌های کلی‌فرم را با استفاده از ژن lacZ (ژن بتاگالاکوزیداز) و باکتری اشرشیاکلی را با استفاده از ژن uid A (ژن بتادی گلوکورونیداز) شناسایی کند (۴). در این تحقیق از ژن lacz به‌عنوان 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 به‌عنوان مولکول هدف برای شناسایی باکتری اشرشیاکلی استفاده شده است که با استفاده از پرایمرهای طراحی شده، قطعه ژنی حدود bp۱۷۴ به‌دست آمد. برای اثبات صحت عملکرد دو ژن نام برده، در ابتدا سویه استاندارد سپس (CRM) مورد بررسی قرار گرفته و رخداد باندها در الکتروفورز تأیید گردید. از MPN به‌عنوان استاندارد مرجع استفاده شد تا هر گونه خطا 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.

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 معضل 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 می‌باشند (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 کلی‌فرم کل، کلی‌فرم 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 پلی‌آکریل آمید برای الکتروفورز نبوده و بنابراین با

افزایش ولتاژ هنگام استفاده از ژل آگارز، زمان الکتروفورز نیز کاهش یافت. علاوه‌بر انرژی بر بودن روش‌های روتین کشت آزمایشگاهی، در برخی موارد به‌علت 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 MPNو شناسائی احتمالی VBNC، از فیلتراسیون نمونه‌ها با روش ارائه شده توسط WHO (۱) استفاده به‌عمل 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 کلی‌فرم 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 کلی‌فرم کل برای اشرشیاکلی در آب آشامیدنی انجام شده است. شناسایی با استفاده از الکتروفورز ژل اگاروز یک باند bp۸۷۶ برای ژن lacZ برای همه باکتری‌های کلی‌فرم و یک باند bp۱۴۷ برای ژن uidA و یک باند bp۸۷۶ برای ژن lacz برای همه گونه‌های E. coli ایجاد نمود.

در این بررسی روش سریع تشخیص همزمان کلی‌فرم 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 متد روی 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 به‌صورت جامع اجرا گردد به نحوی که محدودیت های بررسی های دیگران از جمله تعداد و تنوع نمونه‌ها، دقت در اجرای کار مولکولی به‌ویژه استفاده همزمان از دو ژن و استفاده از استانداردهای متنوع و مناسب را در برداشته باشد. بدیهی است اجرای کار مولکولی به‌صورت ضرورتی 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.

بدین‌ترتیب روش Multiplex PCR ارائه شده با توجه به حساسیت ویژه بر سلامت عمومی جامعه، دست کم به‌عنوان آزمایش غربالگری اولیه می‌تواند مورد استفاده قرار گرفته و نمونه‌های مثبت شده در ابن آزمایش می‌تواند به‌صورت تصادفی مورد آزمون MPN قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

این تحقیق روشی سریع و با هزینه‌بری کمتر را جهت ارزیابی میکروبی آب شرب پیشنهاد نمود. روش پیشنهادی به‌صورت عملیاتی با تعداد گوناگونی از نمونه‌های شبکه، مخزن و چاه به‌صورت مقایسه‌ایی با MPN اجرا گردید. علاوه‌بر این از سویه‌های متنوع استاندارد و جداسازی شده از آب نیز جهت تأیید نتایج استفاده شد. نتایج کارآمد بودن روش مولکولی ارائه شده را اثبات نمود.

References:

1.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.
2.Bej AK, Steffan RJ, DiCesare J, et al. Detection of coliform bacteria in water by polymerase chain reaction and gene probes. Apple Environ Microbial 1990; 56:307-14.
3.3.Aslani M, Panahi F. Drinking water. ISIR.2004; 35: 1-66.
4.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.
5.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.
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.
7.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.
8.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.
9.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.
10.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.
11.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.
12.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.
13.Toze S. PCR and the detection of microbial pathogens in water and waste water. Wat Res 1999; 33: 3545- 56.
14.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.
15.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.
16.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.

ISMJ 2014; 17(5): 867-878

Orginal Article

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

F. Dehghan [1,3] ,MR. Zolfaghari [1], M. Arjomandzadegan [2*], S.Geravand [2], Gh R. Ahamri [3], S. Kalantari [3], AR. Kasravi [4]
[1]

[1] Department Of Microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, IRAN
[2]Tuberculosis 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
[4] Department 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**