کنگره علوم و مهندسی آب و فاضلاب ایران
دانشگاه تهران، تهران
۲۶ و ۲۷ بهمن‌ماه ۱۳۹۵

1322O-NWWCE

شناسایی مولکولی باکتری لژیونلا در منابع محیطی با استفاده از تکنیک Nested PCR

نگار درویش کسیان[۱]، رحیم عالی[۲*]، نازنین حبیبی[۳]، کامران رسولی نیا[٤]

۱-دانشجوی کارشناسی مهندسی بهداشت محیط، کمیته تحقیقات دانشجوئی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

۲-استادیار، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

۳-دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

٤-کارشناس، اداره آب و فاضلاب شهر اشنویه

* Aali@hlth.mui.ac.ir

خلاصه

منابع محیطی مانند فاضلاب و آب، عوامل عمده در تکثیر و انتشار باکتری لژیونلا می‌باشند. هدف از مطالعه حاضر بررسی فراوانی این باکتری در فاضلاب، چاه‌های تأمین آب شرب و شبکه توزیع بوده است. در این مطالعه ۳۰ نمونه از منابع محیطی شامل چاه (۲۴ نمونه)، آب شرب شهری (۶ نمونه) و فاضلاب شهری (۲ نمونه) طی سه مرحله برداشت شد. استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت (روش ستونی) انجام گرفت. در روش Nested PCR ابتدا جهت شناسایی عمومی باکتری‌ها بخشی از ژن 16s rRNA(1420 bp) تکثیر گردید. سپس با استفاده از پرایمر های اختصاصی Leg 448-JRP(386 bp)، باکتری لژیونلا مورد شناسایی واقع شد. محصولات PCR با استفاده از سیستم الکتروفورز مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج این مطالعه حضور باکتری لژیونلا در ۳۶,۶ درصد (۱۱ نمونه) از کل نمونه‌ها را نشان داد. چاه‌های مورد بررسی دارای بیشترین آلودگی (۹ نمونه) بودند. باکتری لژیونلا در نمونه‌های آب شرب یافت نشد. کلیه نمونه‌های برداشتی از فاضلاب از نظر حضور این باکتری مثبت بود. آلودگی چاه‌ها می‌تواند ناشی از تماس با فاضلاب انسانی باشد. این موضوع حفاظت بیشتر از حریم متعارف چاه‌ها جهت جلوگیری از آلودگی‌های ثانویه را می‌طلبد. اگر چه آب شرب آلودگی نشان نداد اما با توجه به حضور این عامل پاتوژن در فاضلاب و شناسایی آن در چاه‌های تأمین آب می‌تواند زنگ خطری جهت آلودگی شبکه توزیع نیز باشد.

کلمات کلیدی: باکتری لژیونلا، آب شرب، فاضلاب، روش زنجیره‌ای تکثیر پلیمراز

۱. مقدمه

باکتری لژیونلا، یک عامل پاتوژن بوده و از زمان شناسایی تاکنون مسبب بسیاری از عفونت‌های اولیه (در افراد سالم) و ثانویه (در افراد آسیب‌پذیر) شده است (۱, ۲). منابع محیطی مانند فاضلاب و آب، عوامل عمده در تکثیر و انتشار باکتری لژیونلا می‌باشند. این باکتری به‌راحتی در منابع آب و فاضلاب می‌تواند زنده بماند و تکثیر پیدا کند. (۳). محیط‌های عمومی، مسکونی و بیمارستانی از حیث ایجاد زمینه رشد، سیستم انتقال آئروسل و افراد در مرض خطر مکانی با پتانسیل بالا جهت ر شد و شیوع این عامل می‌باشد. پارامترهای مستعد کننده رشد لژیونلا در شبکه توزیع آب شرب و آب شرب مصرفی بزرگی و پیچیدگی 4)(شبکه توزیع آب (ایجاد زمان ماند و وجود نقاط کور) و وجود بیوفیلم میکروبی در سطوح داخلی لوله‌ها در شبکه توزیع (حفاظت از باکتری در مقابل عوامل گندزدا) می‌باشد. علاوه بر این وجود درجه حرارت مناسب در مخازن آب گرم و سیستم آب توزیع آب گرم رشد این باکتری را تشدید می‌کند (رشد بهینه این باکتری ۳۷ oC است و تا ۵۰ oC را نیز تحمل می‌کند)(۲, ۵). از طرفی با توجه به اینکه غلظت کلر در شبکه توزیع (به‌عنوان ماده گندزدا) ۰/۵ – ۳/ میلی‌گرم در لیتر می‌باشد و در صورتی که غلظت کلر در این سطح حفظ شود این غلظت بر باکتری لژیونلا مؤثر نیست و می‌تواند در این شرایط رشد کند. این در حالی است که غلظت کلر در نقطه مصرف در بسیاری از مطالعات صفر گزارش شده است. نکته مهم دیگر اینکه حتی استفاده از سیستم‌های تصفیه آب خانگی نیز مانع مناسبی برای کنترل و حذف این عامل نمی‌باشد گزارشات متفاوت از افزایش غلظت باکتریایی بعد از این سیستم‌ها نسبت به ورودی گزارش شده است. میکرو ارگانیزم‌های همزیست مانند تک‌یاخته‌ها از دیگر عوامل زمینه‌ساز رشد

هستند که در صورت ضعف فرایندهای تصفیه آب می‌تواند در شبکه توزیع حضور یابند و نقش حمایتی را در رشد این باکتری ایفاء نمایند. در واقع این باکتری، تک‌یاخته‌ها را به‌عنوان میزبان انتخاب کرده و در درون آن‌ها زندگی می کند، که این مزیت انتخابی باکتری را در مقابل شرایط نامساعد (عوامل گندزدا) محافظت می کند و زمینه رشد آن را فراهم می کند(۶). سیستم‌های سرمایش و گرمایش، تهویه هوا، دوش‌های آب، بخورها و پودر کننده های آب از عوامل ایجاد و انتشار آئروسل های آب(ذرات ریز آب در هوا) در محیط‌های مسکونی و بیمارستانی می باشند. این باکتری قادر است در آئروسلها تا فاصله ۲۰۰ متری زنده بماند7)(. مطالعه آئروس های هوابرد در اطراف تصفیه خانه‌ای در اصفهان نشان داد این عامل امکان انتشار از طریق آئروس های ناشی از حوض هوادهی می شود(۸).

در کشور مطالعات پراکنده ای با هدف شناسایی این عامل در منابع بصورت مجزا انجام شده است. تقریبا در همه مطالعات این عامل مورد شناسایی قرار گرفته است از این عامل به‌عنوان یک عامل خطر برای افراد مورد گزارش قرار گرفته است. دراین مطالعه بصورت همزمان در منابع محیطی مانند چاه های تأمین آب شرب، آب شرب شهری و همچنین فاضلاب شهری با هدف بررسی فراوانی این عامل مورد بررسی قرار گرفته است.

در این راستا شناسائی و تعیین وضعیت این باکتری می‌تواند مسئولین را در تدوین استراتژی مناسب جهت پیشگیری از رشد و کنترل شیوع آن یاری رساند.

۲. مواد و روش‌ها

در این مطالعه ۳۰ نمونه از منابع محیطی شامل چاه(۲۴ نمونه، سه چاه ۱، ۲ و ۳)، آب شرب شهری(۶ نمونه) و فاضلاب شهری(۲ نمونه) طی سه مرحله برداشت و با حفظ زنجیره سرما به آزمایشگاه مولکولی منتقل شدند .روش مورد استفاده در این مطالعه روش مولکولی تکثیر زنجیره‌ای پلیمراز بود. دلیل استفاده از این روش حساسیت و اختصاصیت بالای این روش نسبت به روش معمول کشت می‌باشد. بعلاوه اینکه روش مولکولی به‌عنوان یک روش پیشنهادی در کتاب مرجع روش های استاندارد برای آزمایشات آب و فاضلاب نیز پیشنهاد شده است. در این مطالعه از روش nested PCR که روشی حساس تر از روش PCR معمولی است استفاده شد. پس از آماده سازی، استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت (Dynobio,) انجام شد. برای انجام nested PCR در مرحله اول بخشی از ژن 16s rRNA (توالی در جدول ۱) مطابق برنامه واسرشت اولیه (۹۵oC ، ۵ min)، واسرشت (۹۴oC ، ۴۵ s)، اتصال(۵۵oC ، 1min)، طویل شدگی(۷۲oC ، ۱,۳۰ min) و طویل شدگی نهائی (۷۲oC ، ۵ min) تکثیر گردید. سپس با استفاده از پرایمر های اختصاصی لژیونلا (جدول شماره ۱) و مطابق برنامه واسرشت اولیه (۹۵oC ، 7 min)، واسرشت (۹۴oC ، ۳۰s)، اتصال(۵۴oC ، ۴۵s)، طویل شدگی(۷۲oC ، ۴۵s) و طویل شدگی نهائی (۷۲oC ، 5 min) این باکتری مورد ردیابی قرار گرفت. محصولات PCR در سیستم الکتروفورز مورد ارزیابی قرار گرفتند. در این سیستم الکتروفورز از بافر TAE 1x و ژل ۱,۵ ٪ استفاده شد. زمان مورد استفاده در الکتروفورز ۲۰-۲۵ دقیقه و اختلاف ولتاژ ۱۰۰ ولت در نظر گرفته شد. پس از الکتروفورز ژل با استفاده دستگاه آشکارساز ترانس لومیناتور (,Gel box) مورد ارزیابی قرار گرفتند.

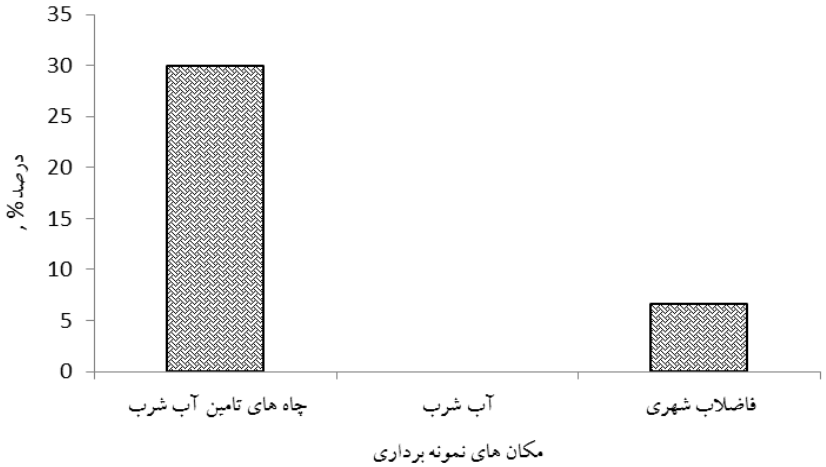
جدول ۱:مشخصات پرایمرها، توالی آن‌ها و نیز طول قطعه تکثیر شده

پرایمر	توالی (5' to 3')	اندازه محصول(bp)	منبع
Eubac27E 1429 R1	5`-AGA-GTT-TGA-TCC-TGG-CTC-A-G-`3 5`-TAC-GGY-TAC-CTT-GTT-ACG-ACT-T-`3	۱۴۲۰bp	(۹)
LEG 448 LEG JRP	5`-AGG-GGT-TGA-TAG-GTT-AAG-AG-C-`3 5`-CCA-ACA-GCT-AGT-TCA-CAT-CG-`3	۳۸۶bp	(۹)

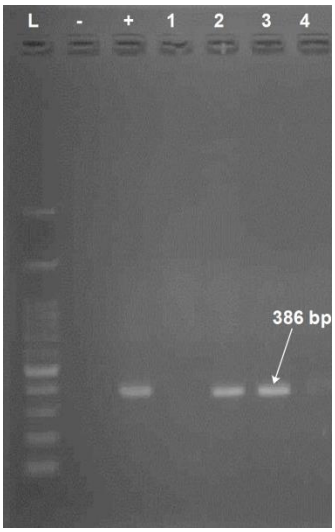
۳.نتایج

نتایج این مطالعه حضور باکتری لژیونلا در ۳۶,۶ درصد(۱۱ نمونه) از کل نمونه‌ها را نشان داد(شکل ۱). چاه‌های مورد بررسی دارای بیشترین آلودگی(۹ نمونه) بودند. باکتری لژیونلا در نمونه‌های آب شرب یافت نشد. کلیه نمونه‌های برداشتی از فاضلاب از نظر حضور این باکتری مثبت بود. سکانس

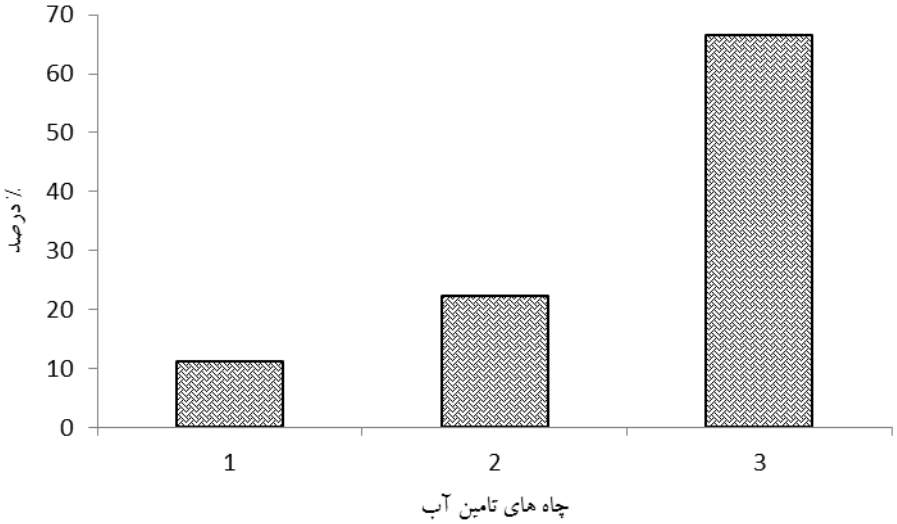
تکثیر شده مربوط به این باکتری در شکل ۲ نشان داده شده است. بررسی چاه‌های تأمین آب شرب نیز نشان می دهد همه چاه‌ها آلودگی داشتند اما درصد فراوانی آلودگی در چاه‌ها یکسان نبود(شکل ۳).



شکل ۱- درصد شناسایی باکتری لژیونلا در منابع محیطی



شکل۲- شناسایی لژیونلا در نمونه‌های مورد بررسی.



شکل ۳ - فراوانی باکتری لژیونلا در چاه‌های تأمین آب

۴.بحث

آلودگی منابع آبی به باکتری پاتوژن لژیونلا و متعاقب آن ایجاد عفونت در افراد بویژه افراد آسیب‌پذیر یک دغدغه جهانی است. مطالعات پراکنده در کشور نیز حکایت از وجود این عامل در منابع آبی نموده است(۱۰).

در مطالعه حاضر بیش از ۳۰ درصد نمونه‌های برداشتی دارای آلودگی بودند. در مطالعه ای که توسط Barti و همکاران(۲۰۰۳) بر روی نمونه‌های محیطی انجام شد ۵۶ درصد نمونه‌ها آلودگی به این عامل را نشان دادند(۱۱). مطالعات صورت گرفته در کشور نیز حاکی از فراوانی این عامل در منابع محیطی و بیمارستانی و همچنین آب شرب دارد. به‌عنوان نمونه طی تحقیقی در بیمارستانهای اهواز مشخص گردید ۶۵ درصد نمونه‌ها به لژیونلا پنوموفیلا آلوده هستند(۱۲). همچنین طی مطالعه ای که توسط Hossaini و همکاران(۲۰۱۵) بر روی نمونه‌های برداشتی از بخش پیوند اعضاء در بیمارستانهای تحت مطالعه انجام شد، مشخص گردید که ۲۲ درصد نمونه‌ها حداقل به یک گونه لژیونلا آلوده بودند[۴]. همچنین مطالعه با هدف ارزیابی برج های خنک کننده بیمارستانها توسط Baghal Asghari و همکاران(۲۰۱۲) در اصفهان نشان داد ۷۰ درصد نمونه‌های مورد بررسی به باکتری لژیونلا آلوده می‌باشند. و همچنین برج های خنک کننده منبع بالقوه ای برای انتشار این عوامل در محیط های بیمارستانی می‌باشند(۱۳). مرور نظام مطالعات صورت گرفته د راین زمینه در کشور نشان داد ۷۰-۵,۷ درصد نمونه‌های محیطی مورد بررسی در کشور آلوده به باکتری لژیونلا می‌باشند(۱۰). مطالعات شناسایی باکتری لژیونلا در منابع محیطی و سطح شهر انجام شده در ایران نشان داد به ترتیب ۶,۶ و 22.5 درصد نمونه‌ها به این باکتری آلوده اند(۱۰). لذا به نظر می رسد مشکل مربوط به حضور این باکتری در منابع متفاوت محیطی دارای گستره کشوری است . از طرفی با عنایت به اینکه علائم بیماریهای ایجاد شده توسط این باکتری با علائم بالینی سرماخوردگی و بیماری های ناشی از آنفلوآنزا تداخل دارد لذا برآورد می شود بسیاری از بیماریهای ایجاد شده با این عامل مورد شناسایی دقیق قرار نمی گیرند.

مطالعه حاضر نشان داد نمونه‌های آب شرب دارای آلودگی نمی‌باشند. با عنایت به اینکه چاه‌های تأمین آب دارای آلودگی بودند احتمالا دلیل این امر ناشی از کاهش غلظت این باکتری در طول شبکه ، قدمت بالای شبکه و ایجاد بیوفیلم و نهایتا حفاظت از این عامل باکتریایی و همچنین می‌تواند ناشی از سیستم گندزدائی شبکه شهری باشد. در این راستا پیشنهاد می شود علاوه بر استفاده از روش PCR روش های توسعه یافته تری مانند Real Time PCR که بصورت کمی می توانند اقدام به ردیابی این عامل بنمایند استفاده شود. همچنین بصورت تلفیقی از روش های مولکولی و کشت استفاده شود (۱۵ ,۱۴).

۵. نتیجه گیری

آلودگی چاه‌ها می‌تواند ناشی از تماس با فاضلاب انسانی باشد. این موضوع حفاظت بیشتر از حریم متعارف چاه‌ها جهت جلوگیری از آلودگی‌های ثانویه را می‌طلبد. اگر چه آب شرب آلودگی نشان نداد اما با توجه به حضور این عامل پاتوژن در فاضلاب و شناسایی آن در چاه‌های تأمین آب می‌تواند زنگ خطری جهت آلودگی شبکه توزیع نیز باشد.

۶.مراجع

1. Bitton G. Wastewater microbiology: John Wiley & Sons; 2005.
2. Uzel A, Ucar F, ESİN HAMEŞ- KOCABAŞ E. Prevalence of Legionella pneumophila serogroup 1 in water distribution systems in Izmir province of Turkey. Apmis. 2005;113(10):664-9.
3. Leoni E, Legnani P. Comparison of selective procedures for isolation and enumeration of Legionella species from hot water systems. Journal of Applied microbiology. 2001;90(1):27-33.
4. BÉDARD É. OPERATIONAL FACTORS INFLUENCING OCCURRENCE AND RISK EXPOSURE TO PSEUDOMONAS AERUGINOSA AND LEGIONELLA PNEUMOPHILA FROM HOSPITAL WATER SYSTEMS. 2015.
5. Hsu B-M, Chen C-H, Wan M-T, Cheng H-W. Legionella prevalence in hot spring recreation areas of Taiwan. Water research. 2006;40(17):3267-73.
6. Kim B, Anderson J, Mueller S, Gaines W, Kendall A. Literature review—efficacy of various disinfectants against Legionella in water systems. Water Research. 2002;36(18):4433-44.
7. Joklik WK, Willett HP, Amos D. Zinsser microbiology: Appleton and Lange; 1988.
8. Mirzaee SA, Nikaeen M, Hajizadeh Y, Nabavi BF, Hassanzadeh A. Detection of Legionella spp. by a nested-PCR assay in air samples of a wastewater treatment plant and downwind distances in Isfahan. Advanced biomedical research. 2015;4.
9. Asghari FB, Nikaeen M, Mirhendi H. Rapid monitoring of Pseudomonas aeruginosa in hospital water systems: a key priority in prevention of nosocomial infection. FEMS microbiology letters. 2013;343(1):77-81.
10. Ghanizadeh G, Mirmohammadlou A, Esmaeili D. Survey of legionella water resources contamination in Iran and foreign countries: A Systematic Review. Iranian Journal of Medical Microbiology. 2016;9(4):1-15.
11. Bartie C, Venter S, Nel L. Identification methods for Legionella from environmental samples. Water research. 2003;37(6):1362-70.
12. Moosavian S, Divan Khosro Shahi N. Survey of Legionnaires' Disease Agents in Therapeutic Equipments and Drinking Water Sources in Ahwaz, Iran. Journal of Guilan University of Medical Sciences. 2004;13(51):38-44.
13. Baghal Asghari F, Nikaeen M, Hatamzadeh M, Vahid Dastjerdi M, Hassanzadeh A. Detection of Legionella Spp. in Water from Cooling Towers. Journal of Isfahan Medical School. 2012;30(195.(
14. Joly P, Falconnet P-A, André J, Weill N, Reyrolle M, Vandenesch F, et al. Quantitative real-time Legionella PCR for environmental water samples: data interpretation. Applied and environmental microbiology. 2006;72(4):2801-8.
15. Nazarian EJ, Bopp DJ, Saylors A, Limberger RJ, Musser KA. Design and implementation of a protocol for the detection of Legionella in clinical and environmental samples. Diagnostic microbiology and infectious disease. 2008;62(2):125-32.