پاتوتایپینگ و بررسی شیوع *اشریشیا کلی*‌های بیماری‌زای روده‌ای در نمونه‌های آب ورودی به تصفیه‌خانه‌های شهر تهران

مریم اصغری[۱]، عباس اخوان سپهی[۲]، سید رضا حسینی دوست[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشکده فناوری‌های نوین، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم دارویی، تهران
۲- دانشیار دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران
(نویسنده مسئول) ۲۲۹۵۰۹۵۵ (۰۲۱) akhavansepahy@gmail.com
۳- استاد، دانشکده فناوری‌های نوین، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم دارویی، تهران

(دریافت ۹۳/۵/۱ پذیرش ۹۴/۳/۱۰)

چکیده

آب‌های آلوده و نقش آنها در انتقال پاتوژن‌ها که باعث عفونت‌های روده‌ای در انسان می‌شوند، حائز اهمیت بسیاری است. استفاده از روش‌های سنتی از جمله محیط کشت در تشخیص *اشریشیاکلی* علاوه بر این‌که به زمان زیادی نیاز دارد، قابلیت شناسایی برخی پاتوتایپ‌های آن را نیز فراهم نمی‌کند. این پژوهش با هدف ارائه راهکارهای مولکولی در شناسایی سریع و اختصاصی پاتوتایپ‌های *اشریشیاکلی* انجام شد. به این منظور به‌مدت یک‌سال از مهر ماه سال ۱۳۹۱ تا مهر ماه سال ۱۳۹۲ از بین ۹۷۸ نمونه آب، طی فرایندهای غربالگری اعم از فنوتیپی و مولکولی (سه‌گانه ژن‌های اختصاصی)، ۱۰۶ سویه *اشریشیاکلی* جدا شد. نتایج حاصل از این پژوهش بیانگر پتانسیل بالای آب در انتقال میکروارگانیسم‌های پاتوژن بود. طی این پژوهش مشخص شد ۱۰ سویه، دارای ژن‌های *est* و *elt*، ٦ سویه دارای ژن *eaeA*، ٥ سویه دارای ژن *bfpA*، ٤ سویه دارای ژن‌های *pCVD* و *ipaH*، ۳ سویه دارای ژن‌های *VT1* و *VT2* و ۱ سویه دارای ژن‌های *cnf1* و *cnf2* می‌باشند. نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهد که استفاده از روش‌های مولکولی بر پایه پرایمرهای طراحی شده در این پژوهش می‌تواند روشی مناسب، سریع و اختصاصی در شناسایی پاتوتایپ‌های *اشریشیاکلی* باشد.

واژه‌های کلیدی: *اشریشیاکلی*، باکتری‌های کلیفرم، پاتوتایپ، تهران، تصفیه‌خانه آب

۱- مقدمه

از دیدگاه بیولوژیکی، ویژگی‌های میکربی آب آشامیدنی مبنای قضاوت در مورد قابلیت شرب آب‌هاست.

ارگانیسم‌های بیماری‌زایی که توسط آب منتقل می‌شوند، شامل باکتری‌ها، ویروس‌ها، انگل‌ها و بسیاری از عوامل ناشناخته دیگر هستند.

اشریشیاکلی یک باکتری میله‌ای گرم منفی از خانواده انتروباکتریاسه است که به‌طور شایع در روده جانوران خونگرم و برخی از پرندگان وجود دارد. این باکتری از طریق مسیر و یا از طریق آب و غذای آلوده از یک فرد به فرد دیگر منتقل می‌شود. با توجه به نقش غیر قابل انکار آب در شرب و بهداشت جوامع، شناسایی و ویرولوتایپینگ این باکتری نقش مهمی در حفظ و پایش بهداشت و سلامت جوامع بشری دارد. از سوی استانداردهای ملی و بین‌المللی وجود این باکتری در آب و مواد غذایی ممنوع اعلام شده است. حضور *اشریشیاکلی* در محصولات غذایی می‌تواند بیانگر آن باشد که سایر میکروارگانیسم‌های انتروباکتریاسه با منشأ گوارشی روده‌ای در غذا یا آب وجود دارد[۱ و ۲].

استفاده از روش MPN یکی از ساده‌ترین روش‌های مرسوم شمارش کلیفرم‌ها در آزمایشگاه‌های آب است. از جمله نقایص این روش صحت ۹۵ درصدی نتایج آزمون است. علاوه بر MPN، روش‌های دیگری نظیر فیلتراسیون غشایی و پورپلیت نیز برای شناسایی کلیفرم‌ها درآب مورد استفاده قرار می‌گیرند [۱].

بر اساس ظهور علائم کلینیکی، *اشریشیاکلی*‌های پاتوژن به گروه‌های مختلف تقسیم‌بندی می‌شوند:

۱-*اشریشیاکلی*‌های عامل اسهال؛ ۲-*اشریشیاکلی*‌های پاتوژن مجاری ادراری و ۳-*اشریشیاکلی*‌های عامل مننژیت و سپتی‌سمی.

اشریشیاکلی‌های عامل اسهال خود به شش گروه تقسیم می‌شوند. بر اساس خصوصیت ویرولانس، مکانیسم بیماری‌زایی و علائم کلینیکی، در اکثر موارد به سروگروه و سروتایپ‌های خاصی تعلق می‌گیرند.

اشریشیاکلی انتروپاتوژنیک (EPEC): علت عمده اسهال کودکان در کشورهای در حال توسعه است.

اشریشیاکلی سم‌زدای روده‌ای (ETEC): عامل اسهال کودکان زیر ۵ سال و اسهال مسافران در کشورهای در حال توسعه است. سویه‌های سم‌زدای روده‌ای می‌توانند گاستروانتریت همراه با اسهال آبکی، تهوع، استفراغ و دردهای شکمی ایجاد نمایند. حدود ۲ تا ۸ درصد *اشریشیاکلی* موجود در آب، سویه انتروپاتوژنیک است که عامل بیماری اسهال مسافران است. آب و غذای آلوده در انتقال این پاتوژن نقش بسزایی دارند هر چند که دز عفونی این باکتری نسبتاً بالا است و حدود 10^{6} تا 10^{9} ارگانیسم است.

اشریشیاکلی مهاجم روده‌ای (EIEC): سویه‌های آن از نظر خصوصیات ظاهری و بیماری‌زایی شباهت زیادی به شیگلا دارند و باعث ایجاد اسهال شبه شیگلایی می‌شوند.

اشریشیاکلی انترواگریگیتیو (EAEC): این سویه یک پاتوژن نوظهور با شیوع روزافزون شناخته شده است.

اشریشیاکلی انتروهموراژیک (EHEC): یکی ازعوامل اسهال‌های ناشی از آلودگی آب و مواد غذایی در کشورهای توسعه یافته است.

اشریشیاکلی با چسبندگی پراکنده (DAEC): اسهال غیرخونی در کودکان ۱ تا ۵ ساله ایجاد می‌کند[۳].

روش‌های معمولی که برای شناسایی و شمارش این باکتری استفاده می‌شود، عموماً روش‌های بیوشیمیایی و استفاده از محیط‌های کشت است که با توجه به معایبی همچون زمانبر بودن، نیاز به محیط‌های کشت خاص، هزینه بالا و تغییرپذیری یا عدم بیان ژن در شرایط مختلف محیطی با عدم مقبولیت روزافزونی مواجه شده‌اند [۱].

با نگاهی به نتایج به‌دست آمده توسط سایر محققان می‌توان به نقش غیرقابل انکارآب در انتقال پاتوژن‌ها پی برد.

پینا و همکاران در سال ۲۰۱۰ توانستند با طراحی یک چندگانه PCR، عامل عفونی موجود در نمونه‌های آب و سایر مواد غذایی مانند شیر و کاهو را شناسایی نمایند. بر اساس نتایج این پژوهش مشخص شد که عامل عفونی *اشریشیاکلی* سویه O157:H7 بوده است[۴]. ژن‌هایی که در این پژوهش مورد شناسایی قرار گرفتند عبارت بودند از *Stx1*، *Stx2*، *wzyO157* و *eae* [۳ و ۵].

در پژوهشی که در سال ۲۰۱۳ توسط جاتیندر و همکاران در استرالیا انجام شد، ۱۱ ژن ویرولانس در ۳۰۰ ایزوله *اشریشیاکلی* جدا شده از نمونه‌های آب سطحی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که ژن‌های *eaeA*، *stx1*، *stx2* و *ehxA* به‌عنوان شاخص‌های پاتوتایپ انتروهموراژیک به‌ترتیب در ۵۶، ۶، ۱۰ و ۱۳درصد موارد قابل شناسایی بوده است. به‌منظور بررسی پاتوتایپ انترواگریگیتیو، ژن‌های *astA* و *aggR* مورد شناسایی قرار گرفت که نتایج مؤید حضور این ژن‌ها به‌ترتیب در ۶۹ و ۲۹درصد سویه‌ها بوده است. علاوه بر این ژن bfp به‌عنوان شاخص بیماری‌زای روده‌ای در ۲۴درصد از سویه‌ها شناسایی شد درحالی که ژن ipaH به‌عنوان شاخص مهاجم روده‌ای در ۱۴درصد از سویه‌ها قابل ردیابی بود.

در پژوهشی که در سال ۲۰۱۳ توسط اکتر و همکاران در بنگلادش و نروژ انجام شد، ۹ ژن ویرولانت در *اشریشیاکلی*های جدا شده از نمونه‌های آب مورد شناسایی و بررسی قرار گرفت. در این تحقیق به‌منظور شناسایی ETEC از ژن‌های *eltB* و *estA*، EPEC از ژن‌های *bfpA* و *eaeA*، شناسایی EIEC از ژن *ial* و *ipaH* شناسایی EHEC از ژن‌های *vt1* و *vt2* و شناسایی EAEC از ژن pCVD استفاده شده بود. بر اساس نتایج حاصل از نظر این پژوهشگران، فراوان‌ترین پاتوتایپ در نمونه‌های مورد آزمایش، ETEC و EPEC بوده‌اند.

در سال ۲۰۰۱ کمبل و همکاران پروتکل شناسایی سویه پاتوژن O157:H7/*اشریشیاکلی* را در نمونه‌های آب و خاک به‌صورت چندگانه PCR ارائه نمودند[۶]. این پژوهشگران پروتکل پیشنهادی خود را که براساس شناسایی ژن‌های ویرولانس و ساختاری بود، بسیار حساس و با ویژگی بالا معرفی کردند[۷].

با نگاهی به پژوهش‌هایی که توسط پژوهشگران داخلی و خارجی انجام شده، مشخص است که این اولین پژوهشی است که طی آن کلیه پاتوتایپ‌های بیماری‌زای *اشریشیاکلی* که از آب جدا شده‌اند، مورد ارزیابی و شناسایی قرار گرفته‌اند.

هدف از انجام این پژوهش راه‌اندازی روش‌های شناسایی میکروارگانیسم‌ها با استفاده از روش‌های مولکولی، پاتوتایپینگ ایزوله‌های *اشریشیاکلی* جداشده از آب سطحی شهر تهران و همچنین ژن و تایپینگ ایزوله‌های *اشریشیاکلی* بر اساس تشخیص عناصر تکراری ژنی بود.

۲- مواد و روش‌ها

تعداد ۱۰۶ ایزوله *اشریشیاکلی* از منابع آب شهر تهران تهیه شد.

۲-۱- محل‌های نمونه‌برداری

- ورودی آب تصفیه‌خانه جلالیه (شماره ۱)

تصفیه‌خانه جلالیه در ضلع جنوب شرقی تقاطع خیابان دکتر فاطمی و خیابان حجاب قرار دارد. منبع تأمین آب این تصفیه‌خانه رودخانه کرج از ایستگاه آبگیر بیلقان و سد طالقان است. لازم به ذکر است

که آب ورودی به این تصفیه‌خانه به‌دلیل انجام کلرزنی مقدماتی در آب‌گیر بیلقان، دارای کلر آزاد باقیمانده است و تنها یک نمونه از کل نمونه‌های برداشت شده در طی مدت نمونه‌برداری دارای باکتری *اشریشیاکلی* بود.

- ورودی آب تصفیه‌خانه کَن (شماره ۲)

تصفیه‌خانه کن بزرگ‌ترین تصفیه‌خانه تهران واقع در منطقه غرب تهران است و منبع تأمین آب آن، رودخانه کرج و سد طالقان است که پس از عبور از محل آبگیر بیلقان و حذف ذرات معلق درشت و پیش‌کلرزنی به محل تصفیه‌خانه وارد می‌شود. تنها یک نمونه از کل نمونه‌های برداشت شده در طی مدت نمونه‌برداری دارای باکتری *اشریشیاکلی* بود.

- ورودی تصفیه‌خانه شماره ۳ و ۴

این تصفیه‌خانه در شمال شرقی تهران در بلوار شهید عباسپور، در ابتدای شهرک حکیمیه واقع شده‌اند. آب خام ورودی از سد لتیان تأمین می‌شود. تعداد ۴۸ عدد از ایزوله‌های جمع‌آوری شده از این محل بود.

- ورودی تصفیه‌خانه شماره ۵

این تصفیه‌خانه در شمال شرق شهر تهران قرار دارد و منبع تأمین آب این تصفیه‌خانه، سد لار است. تعداد ۴۲ عدد از ایزوله‌ها از این محل جمع‌آوری شد.

- آبگیر بیلقان

آبگیر بیلقان در فاصله ۲۳ کیلومتری از سد امیرکبیر کرج واقع در کیلومتر ۴ جاده چالوس، مهم‌ترین نقطه تأمین و انتقال آب شرب شهر تهران است. تعداد ۱ عدد از ایزوله‌های جمع‌آوری شده از این محل بود.

۲-۲- روش

نمونه‌برداری مطابق با روش استاندارد ملی شماره ۴۲۰۸ (۱) در بطری‌های استریل و حاوی تیوسولفات سدیم انجام شد [۸].

در این پژوهش از مواد شیمیایی با درصد خلوص بسیار بالا و ساخته شده در کارخانه‌های مرک[1] و سیگما[2] استفاده شد.

به منظور نگهداری ایزوله‌های *اشریشیاکلی* تا زمان نهایی انجام پژوهش، کلیه ایزوله‌ها در محیط کشت BHI حاوی گلیسرول ۲۵ درصد در دمای ۷۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

روش جمع‌آوری نمونه‌های محیطی مطابق با روش شماره ۹۲۲۱A - از کتاب روش‌های استاندارد انجام شد. مطالعه روش، کلیه نمونه‌های آب به محیط کشت لوریل‌سولفات‌براث تلقیح شد [۸]. ترکیبات این محیط کشت به شرح جدول ۱ است. در این محیط کشت منبع کربن قند لاکتوز و مهارکننده رشد باکتری‌های گرم مثبت سدیم‌لوریل‌سولفات براث است. با تلقیح نمونه‌های آب به داخل این محیط کشت و طی ۴۸ ساعت قرار دادن آن‌ها در گرمخانه، وجود گاز در لوله‌های دورهام و ایجاد pH اسیدی، می‌تواند دلیل بر حضور کلیفرم‌ها در نمونه باشد.

جدول ۱- ترکیبات محیط کشت لوریل‌سولفات‌براث

ماده	واحد	مقدار
Pancreatic digest of casein	گرم	۲۰
Lactose	گرم	۲
NaCl	گرم	۵
K_2HPO_4	گرم	۲/۷۵
KH_2PO_4	گرم	۲/۷
Sodium lauryl sufate	گرم	۰/۱
pH 6.8± 0.2 at 25 °C		

از کلیه نمونه‌هایی که در مرحله احتمالی مثبت شده‌اند در آزمون تأییدی، به میزان یک سی‌سی به محیط کشت EC براث تلقیح شد و به مدت ۲۴ساعت در بن‌ماری انکوبه شد. در دمای انکوباسیون ۴۴/۵ درجه سلسیوس تنها کلیفرم‌های گرماپای قابلیت رشد در این شرایط را داشته و ایجاد گاز می‌نمایند. برای جداسازی و افتراق کلیفرم‌های گرماپای اعم از *سیتروباکتر فروندی*، *کلبسیلا پنومونیه*، *انتروباکتر ائروجنز* و *اشریشیاکلی*، لوله‌های EC مثبت بر روی محیط EMB آگار کشت خطی داد شد و سپس کلنی‌های تک با جلای فلزی جدا شدند. برای اطمینان در افتراق *اشریشیاکلی* از سایر باکتری‌های گروه انتروباکتریاسه از آزمون بیوشیمیایی IMVIC استفاده شد.

با توجه به اینکه ایجاد جلای فلزی بر روی محیط EMB آگار علاوه بر *اشریشیاکلی* می‌تواند توسط سایر کلیفرم‌ها و حتی برخی سویه‌های شیگلا سونه‌ای روی دهد بنابراین لازم است که علاوه بر غربالگری اولیه و شناسایی با استفاده از محیط‌های کشت میکربی، غربالگری ثانویه و شناسایی با استفاده از روش‌های مولکولی نیز صورت گیرد تا از *اشریشیاکلی* بودن نمونه‌ها اطمینان خاطر حاصل شود. در این پژوهش، غربالگری به‌صورت مولکولی و با استفاده از یک *چندگانه* PCR بر اساس ۴ ژن اختصاصی *اشریشیاکلی* و یک ژن اختصاصی شیگلا انجام شد.

[1] Merck
[2] Sigma

جدول ۲- مشخصات پرایمرهای طراحی شده به‌منظور غربالگری *اشریشیاکلی*

نام باکتری	نام ژن	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')	Size (bp)
اشریشیاکلی	gadA/B	GCAACGCTCGTCAGAA	CACAGATCGGCAACCAT	163
	UspA	GCAGAAACGCATCTC	GAACAATCAGCATATCAAC	239
	PhoE	AGCACTCTGGCATTA	ATTGGCATCGTATTTCA	711
	UidA	GTGAAGGTTATCTCTAT	GCGGTGATACATATC	872
شیگلا	Put int	GCTGGATGAACGATGT	TGGCGGCTATGAGAT	353

جدول ۳- مشخصات توالی پرایمرهای شناسایی ژن‌های بیماری‌زای *اشریشیاکلی*

ژن	Forward	Reverse	Size
pCVD	CTCACCTGATGTTGATGCTCG	TCAGCAGCCTTAATCTTGAGTTTT	313
eaeA	TTCTCATTCTAACTCATTGTG	ATTGCCATTACGGTCATA	1645
BfpA	CCAGGCCAACAATTATTTCC	TTCTTGGTGCTTGCGTGTCTTTT	367
TpaJ	CAGAAGAGCAGAAGTATGAG	ATTGTTAGCGTTGATGGAA	1148
cnf1	CACAGAGGAAGAGGTAAGC	GCCATACAGAACAGCATTATATC	399
Cnf2	TGATGCGAGGAACAACTGAAG	AGCGAGGATGCGTCTGATA	655
VT2	TTGCCCACAGATACAACGGATAGT	GCTCCAGCAGTACCATCTCTAACC	500
VT1	AGATACTGATGCGTGATA	ATTACTGTCGGATATTATTCG	2558
Est	CGTGAAACAACATGACGGGAGGTA	GGAGCACAGGCAGGATTACAACAA	235
elt	GGCAGAGGATGGTTACAGATTA	TTGGTCTCGGTCAGATATGTG	554

مراحل طراحی پرایمرهای اختصاصی غربالگری به ترتیب زیر انجام شد

- شناسایی ژن‌های اختصاصی *اشریشیاکلی* و شیگلا؛
- دریافت واریته‌های مختلف این ژن‌ها از طریق سایت NCBI؛
- وارد نمودن توالی‌ها به نرم‌افزار Allele ID 7.6 Biosoft به منظور تراز نمودن توالی‌ها و شناسایی توالی‌های مشترک؛
- انتخاب پرایمرهای اختصاصی؛
- بلاست نمودن و بررسی صحت و اختصاصیت پرایمرها؛
- بررسی کارایی پرایمرها در محیط مجازی PCR؛
- بررسی بر هم‌کنش بین پرایمرها به‌منظور SET UP چندگانه PCR با استفاده از نرم افزار Oligo Analyzer؛
- سفارش دادن سنتز توالی‌ها به شرکت Bioneer کشور کره؛

به‌منظور بررسی کارایی پرایمرها، کلیه توالی‌های طراحی شده در محیط مجاز In silico PCR مورد آزمون و بررسی قرار گرفت.

به‌منظور SET UP چندگانه PCR و بررسی بر هم‌کنش بین پرایمرها، کلیه پرایمرهای طراحی شده وارد نرم افزار In silico PCR شد و برهمکنش و پایداری اتصالات بین آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

جدول ۲ مشخصات پرایمرهای طراحی شده به منظور غربالگری *اشریشیاکلی* و جدول ۳ مشخصات توالی پرایمرهای ژن‌های بیماری‌زای اشریشیاکی را نشان می‌دهد.

استخراج DNA از ایزوله‌ها، با استفاده از کیت استخراج AccuPrep® Genomic DNA Extraction ساخت شرکت Bioneer کره جنوبی به شرح زیر انجام گرفته است.

- یک میلی‌لیتر از محیط کشت حاوی باکتری به داخل یک میکروتیوب ۱۰۰۰ میکرولیتری استریل ریخته شد و به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۲۰gX سانتریفوژ شد.
- محلول رویی دور ریخته شده و بیومس با یک میلی‌لیتر PBS استریل شستشو شد و مجدداً سانتریوفوژ انجام گرفت.
- محلول رویی دور ریخته شده و به بیومس ۲۰ میکرولیتر پروتئیناز K افزوده شد.
- در مرحله بعد به این محلول تامپون اتصالات[1] افزوده شده و بعد از ورتکس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سلسیوس انکوبه شد.
- بعد از اتمام انکوباسیون، به محلول ۱۰۰ میکرولیتر، ایزوپروپانول افزوده شد و پیپتاژ صورت گرفت.
- سپس محتویات لوله‌ها به تیوب‌های واجد فیلتر ستونی انتقال یافت و در دور ۸۰۰۰rpm سانتریفوژ شد.
- مرحله بعد شستشوی ستون با بافر شستشوی یک است. متعاقباً سانتریفوژ در دور ۸۰۰۰rpm صورت گرفت، سپس شستشوی ستون با بافر شستشوی ۲ و سانتریفوژ در دور ۱۰۰۰rpm انجام شد.

[1] Buffer Binding

– مرحله پایانی شامل انتقال ستون‌ها به میکروتیوب‌های استریل و افزودن ۲۰۰ میکرولیتر بافر TE و حل‌شدن DNA نمونه‌ها در این بافر بود. محلول نهایی به کمک سانتریفوژ در میکروتیوب‌ها جمع‌آوری شد و به‌عنوان محلول DNA در PCR مورد استفاده قرار گرفت. محلول‌های DNA پس از استفاده، در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

بعد از اتمام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و تکثیر ژن، محصولات PCR به شرح‌زیر مورد الکتروفورز قرار گرفتند.

در این پژوهش از ژل آگاروز یک درصد محصول شرکت بایونیر[1] استفاده شد.

به منظور رنگ‌آمیزی محصولات PCR از رنگ بی‌خطر[2] DNA استفاده شد.

تانک الکتروفوز و منبع انرژی[3] مورد استفاده در این پژوهش محصول شرکت بایو رد[4] بودند.

بافر تانک الکتروفوز، TBE با غلظت نرمال بود.

مقایسه اندازه محصولات PCR با استفاده از DNA مارکر ۱۰۰-bp محصول شرکت فرمنتاز انجام گرفت.

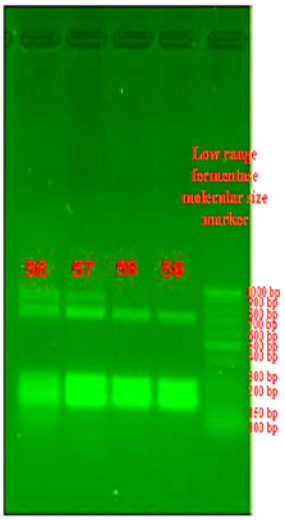
حجم محصولات PCR که به داخل چاهک‌های آگاروز ریخته شده بود، بعد از میکس کامل با یک میکرولیتر لودینگ بافر، ۵ میکرولیتر بود.

بعد از اتمام فرایند ژل الکتروفورز، تصویربرداری از باندهای تشکیل شده با استفاده از دستگاه ژل داک مدل BioRad XR+ و نرم‌افزار Image lab 4.0 صورت گرفت.

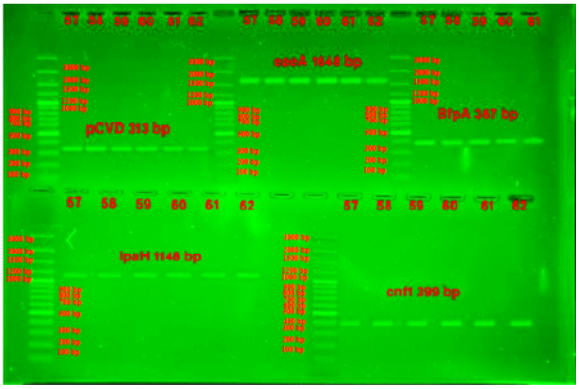
شکل ۱ تصاویر حاصل از گرادیان دمایی سه‌گانه PCR، به‌منظور شناسایی همزمان ژن‌های *phoE* و *uidA* و *uspA* و *gadA/B* در دمای ۵۶ تا ۵۹ درجه سلسیوس و همچنین شکل‌های ۲ و ۳، تصاویر حاصل از شیب دمایی پرایمرهای استفاده شده در پاتوتایپینگ در همان بازه دمایی را نشان می‌دهند. با توجه به وضوح باندها دمای ۵۷ درجه سلسیوس به‌عنوان بهترین دما برای انجام واکنش انتخاب شد.

۳- نتایج و بحث

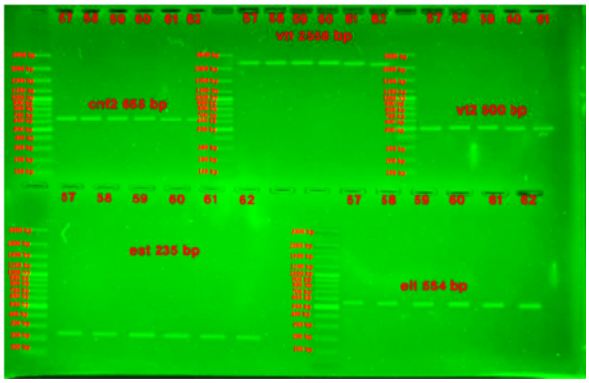
سال‌هاست که *اشریشیاکلی* به‌عنوان شاخص آلودگی آب در نظر گرفته شده است [۹]. با توجه به سرعت، دقت، حساسیت فوق‌العاده و نتایج بسیار قابل توجه، روش‌های مولکولی در رشته‌های مختلف زیستی که به شدت مورد توجه میکروبیولوژیست‌ها و اپیدمیولوژیست‌ها قرار گرفته‌اند، می‌توان گفت این روش‌ها در تقابل با روش‌های بیوشیمیایی قرار دارند[۷].



شکل ۱- تصویر گرادیان دمایی سه‌گانه PCR به‌منظور شناسایی همزمان ژن‌های *phoE*، *uidA*، *uspA* و *gadA/B* در بازه دمایی ۵۶ تا ۵۹ درجه سلسیوس



شکل ۲- تصویر گرادیان دمایی پرایمرهای *pcvD*، *eaeA*، *bfpA*، *ipaH*، *cnf1*



شکل ۳- تصویر گرادیان دمایی پرایمرهای *cnf2*، *vt1*، *vt2*، *est*، *el*

[1] Bioneer
[2] Safe Stain
[3] Power Supply
[4] Bio-Rad

علاوه بر مواردی که در بالا ذکر شد، این نکته بسیار مهم و حائز اهمیت است که برخی از سویه‌های بیماری‌زای روده‌ای *اشریشیاکلی* با روش‌های مبتنی بر کشت قابل شناسایی نیستند، برای مثال مشخص شده است که تعدادی از سویه‌های پاتوژن به‌ویژه انتروهموراژیک، فاقد فعالیت بتاگلوکورونیدازی بوده و قابلیت متابولیسم سوربیتول را ندارند. از این‌رو برای شناسایی آن‌ها نمی‌توان از محیط‌های کشت حاوی سوبسترای MUG استفاده نمود[۱]. این در حالی است که محیط‌های کشت حاوی سوبسترای MUG کاربردی‌ترین و سریع‌ترین محیط‌های کشت در شناسایی *اشریشیاکلی* موجود در نمونه‌های آب است [۲].

تهران به‌عنوان یکی از بزرگ‌ترین کلان‌شهرهای دنیا، جمعیتی بیش از ۷ میلیون نفر را در خود جای داده است و این در حالی است که آب شرب ساکنان این کلان‌شهر عموماً از منابع آب سطحی تأمین می‌شود. اگرچه آب‌های سطحی طی چند مرحله تصفیه می‌شوند، با این حال پتانسیل آلوده شدن آن‌ها بسیار بالا است و در نتیجه هر گونه غفلت، ممکن است فجایع انسانی به بار آورد. روش PCR مزایای بسیاری دارد که از آن جمله می‌توان به بررسی یک روزه نمونه‌ها، ارزان بودن نسبی، خصوصیات فوق‌العاده و سهولت انجام آن اشاره کرد. این روش، انقلابی در تشخیص‌های میکرب‌شناختی و بسیاری از صنایع ایجاد کرده است. با کمک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز می‌توان یک ژن را به اندازه‌ای تکثیر کرد که بتوان با استفاده از روش‌هایی مانند الکتروفورز آن را مشاهده کرد.

در این پژوهش طی یک فرایند یک‌ساله از مهر سال ۱۳۹۱ تا مهر سال ۱۳۹۲ به‌طور تقریبی روزانه نمونه‌ها از منابع آب سطحی جمع آوری شدند. در مدت نمونه‌برداری تعداد قابل توجهی میکروارگانیسم جدا شد و پس از طی مراحل غربال‌گری، ۱۰۶ ایزوله *اشریشیاکلی* به‌منظور بررسی کارایی روش‌های تایپینگ وابسته به PCR انتخاب شد. جدول ۴ محل و تعداد سویه‌های *اشریشیاکلی* جدا شده را نشان می‌دهد.

در مراحل غربالگری ایزوله‌های *اشریشیاکلی*، علاوه بر استفاده از روش‌های سنتی هم‌چون IMVIC، یک سه‌گانه اختصاصی بر اساس ژن‌های اختصاصی *اشریشیاکلی* طراحی شد. بر اساس این سه‌گانه ژن‌های *phoE*، *uidA*، *uspA*، *gadA/B* و همچنین ژن *put int* که مختص شیگلا است، مورد ارزیابی قرار گرفت و بر اساس نتایج حاصله، ۱۰۶ ایزوله *اشریشیاکلی* وارد فاز اصلی پژوهش شد. نتیجه حاصل از این پژوهش بیانگر پتانسیل بالای آب در انتقال میکروارگانیسم‌های پاتوژن بود. طی این پژوهش مشخص

جدول ۴- محل جداسازی و تعداد سویه‌های *اشریشیاکلی*

محل نمونه‌برداری	تعداد کل نمونه	تعداد نمونه کل کلیفرم مثبت	تعداد نمونه کلیفرم گرماپای مثبت	تعداد نمونه *اشریشیاکلی* مثبت
ورودی آب تصفیه‌خانه جلالیه	۲۳۲	۸	۳	۱
ورودی آب به تصفیه‌خانه کن	۲۱۳	۱۴	۵	۲
ورودی تصفیه‌خانه شماره ۳ و ۴	۲۴۰	۱۳۶	۱۲۵	۴۸
ورودی تصفیه‌خانه شماره ۵	۲۷۵	۱۸۳	۱۵۰	۴۲
آبگیر بیلقان	۱۷	۱۷	۱۷	۱۳
مجموع	۹۷۸	۳۵۸	۳۰۳	۳۰۰

جدول ۵- تعداد سویه‌های واجد ژن‌های بیماری‌زا به تفکیک محل نمونه‌برداری

		تصفیه‌خانه کن	تصفیه‌خانه سوهانک	تصفیه‌خانه تهران پارس	تصفیه‌خانه جلالیه	آبگیر بیلقان
تعداد سویه‌های	واحد ژن *est*	۱	۳	۴	-	۲
تعداد سویه‌های	واحد *elt*	۱	۳	۲	-	۲
تعداد سویه‌های	واحد *pCVD*	-	۱	۳	-	۱
تعداد سویه‌های	واحد *eae*	-	۳	۳	-	-
تعداد سویه‌های	واحد *bfpA*	-	۲	۳	-	-
تعداد سویه‌های	واحد *ipaH*	-	-	-	-	۱
تعداد سویه‌های	واحد *cnf1*	-	۱	۱	-	-
تعداد سویه‌های	واحد *cnf2*	-	-	-	-	-
تعداد سویه‌های	واحد *VT1*	-	۲		-	۱
تعداد سویه‌های	واحد *VT2*	-	۲	-	-	۱

شد ۱۰ سویه واجد ژن‌های *est* و *elt*، ۶ سویه واجد ژن *eaeA*، ۵ سویه واجد ژن *bfpA*، ۴ سویه واجد ژن‌های *Pcvd* و *ipaH*، سه سویه واجد ژن‌های *VT1* و *VT2* و یک سویه واجد ژن *cnf1* و *cnf2* می‌باشند. جدول ۵ سویه‌های واجد ژن‌های بیماری‌زا را به تفکیک محل نمونه‌برداری نشان می‌دهد.

ژن‌ها و پاتوتایپ‌های مورد شناسایی در این پژوهش به شرح زیر است:

ژن‌های *est* و *elt* مختص سویه‌های انتروتوکسینوژن هستند[۱]؛

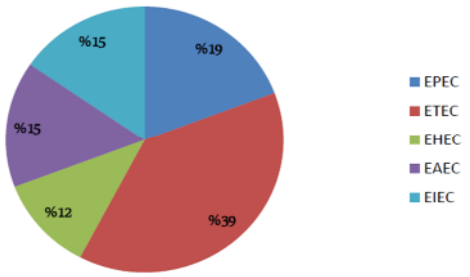
ژن‌های *bfpA* و *eaeA* مختص سویه‌های بیماری‌زای روده‌ای هستند[۹]؛

ژن *ipaH* مختص سویه‌های انترو اینوسیو است[۷]؛

ژن‌های *vt1* و *vt2* مختص سویه‌های انتروهموراژیک است [۲]؛

ژن *pcvD* مختص سویه‌های انترواگرگیتیو است[۵ و ۱۰].

شکل ۴ فراوانی پاتوتایپ‌های *اشریشیاکلی* جدا شده از منابع آب سطحی را نشان می‌دهد.



شکل ۴- فراوانی پاتوتایپ‌های *اشریشیاکلی* جدا شده از منابع آب سطحی

۴- نتیجه‌گیری

با توجه به وجود مشکلات فراوان در شناسایی پاتوتایپ‌های *اشریشیاکلی* و پتانسیل بیماری‌زایی آن‌ها و احتمال ورود به منابع آب و شیوع اپیدمی، این پاتوژن‌ها همواره به‌عنوان یک عامل نگران کننده در بین مسئولان و متولیان بهداشتی مطرح بوده‌اند و تشخیص به موقع و سریع عوامل آلوده کننده منابع آب و مواد غذایی یکی از اصول اساسی در کنترل بحران ناشی از این گونه حوادث است. لذا شناسایی سریع این عوامل می‌تواند سهم بسزایی در شناسایی، کنترل و جلوگیری از اپیدمی داشته باشد. استفاده از روش‌های بیوشیمیایی و کشت حداقل به چهار روز زمان نیاز دارد، در حالی‌که با استفاده از روش‌های مولکولی، می‌توان در مدت زمان کمتر از ۲۴ ساعت به نتایج دقیق‌تری دست یافت.

بررسی ۱۰۶ ایزوله *اشریشیاکلی* در فاز اصلی پژوهش بیانگر پتانسیل بالای آب در انتقال میکروارگانیسم‌های پاتوژن است. طی این پژوهش مشخص شد ۱۰ سویه واجد ژن‌های *est* و *elt* معادل ۳۹ درصد سویه‌های *ETEC*، ۶ سویه واجد ژن *eaeA* معادل ۱۹درصد سویه‌های *EPEC*، ۵ سویه واجد ژن *bfpA* معادل ۱۵ درصد سویه‌های *EAEC*، ۴ سویه واجد ژن‌های *Pcvd* و *ipaH* معادل ۱۵درصد سویه‌های *EIEC*، ۳ سویه واجد ژن‌های *VT1* و *VT2* معادل ۱۲درصد سویه‌های *EHEC* و یک سویه واجد ژن *cnf1* و *cnf2* می‌باشند.

۵- مراجع

1. Bernasconi C., Volponi, Gi., Picozzi, C., and Foschino, R. (2011). “Use of the tna operon as a new molecular target for *Escherichia coli* detection.” *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (19), 6321-6325.
2. Buchanan, R. L., and Edelson. S. G. (2008). “Culturing enterohemorrhagic *Escherichia coli* in the presence and absence of glucose as a simple means of evaluating the acid tolerance of stationary-phase cells.” *Appl. Environ. Microbiol*, 62, 4009-4013.
3. Gleeson C., and Gray, N. (1997). *The coliform index and waterborne disease*, E and FN SPON, Chapman and Hall, London.
4. Pina, M., Fratamico., and Chitrita, D., (2010). “Detection of *Escherichia coli O157:H7* in food using real-time multiplex PCR assays targeting the *stx1*, *stx2*, *wzyO157*, and the *fliCh7* or *eae* genes.” *Food Anal. Methods*, DOI 10.1007/s12161-010-9140-x.
5. Carpentier, B., and Cerf, O. (2009). “Biofilms and their consequences, withparticular reference to hygiene in the food industry.” *J. Appl. Bacteriol*, 75, 499-511.

6. Bekal, S., Brousseau, R., Masson, L., Prefontaine, G., Fairbrother, J., and Harel, J. (2007). "Rapid identification of Escherichia coli pathotypes by virulencegene detection with DNA microarrays." *J. Clin. Microbiol*., 41, 2113-2125 .

8. APHA. (2012). *Standard methods for the examination of water and wastewater*, 22th Ed., American Public Health Association, USA.

9. Anderson, J. D., MacNab, A. J., Gransden, W. R., Damm, S. M., Johnson, W. M., and Lior, H. (2006). "Gastroenteritis and encephalopathy associatedwith a strain of *Escherichia coli* O55:K59:H4 that produced a cytolethaldistending toxin." *Pediatr. Infect*, *Dis*. *J*., 6, 1135-1136.

7. Eyigor, A., Dawson, K. A., Langlois, B. E., and Pickett, C. L. (2011). "Cytolethal distending toxin genes in Campylobacter jejuni and Campylobacter coli isolates: Detection and analysis by PCR." *J. Clin. Microbiol*, 37, 1646-1650.

10. Campbell, G. R., Prosser, J., Glover, A., and Killham, A. (2011). "Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in soil and water using multiplex PCR." *Journal of Applied Microbiology*, 91, 1004-1010.