مجله سلامت و محیط، فصلنامه‌ی علمی پژوهشی
انجمن علمی بهداشت محیط ایران
دوره پنجم، شماره چهارم، پاییز ۱۳۹۱، صفحات ۳۹۵ تا ۴۰۴

مقایسه حساسیت پرایمرهای مختلف اختصاصی ناحیه 16s rDNA در شناسایی گونه‌های باکتری لژیونلا در نمونه‌های آبی

فرزانه بقال اصغری[۱]، مهناز نیک آئین[۲]
نویسنده مسئول: اصفهان، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده بهداشت، گروه بهداشت محیط، *nikaeen@hlth.mui.ac.ir*

دریافت: ۹۱/۰۱/۱۷ پذیرش: ۹۱/۰۴/۰۷

چکیده

زمینه و هدف: *لژیونلاها باکتری‌های گرم منفی هستند که درمنابع آبی طبیعی و ساخت انسان پراکنده‌اند. بعضی از گونه‌های این باکتری برای انسان بیماری‌زا بوده و می‌توانند منجر به عفونت‌های تنفسی شوند. روش کشت روشی روتین در شناسایی باکتری لژیونلا به شمار می‌رود اما به دلیل محدودیت‌های این روش از جمله حساسیت پایین و مدت زمان طولانی مورد نیاز برای دستیابی به نتایج، امروزه تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) جهت شناسایی باکتری لژیونلا مورد استفاده قرار می‌گیرد. مطالعه حاضر به منظور ارزیابی کاربرد روش PCR در شناسایی لژیونلا در نمونه‌های آبی با سه جفت پرایمر متفاوت انجام گرفت.*

روش بررسی: *در این مطالعه ۶۰ نمونه آب جهت حضور لژیونلا با استفاده از روش Nested PCR مورد بررسی قرار گرفت و حساسیت این روش با استفاده از سه جفت پرایمر مختلف شامل (LEG448-LEG858) ، (LEG225- LEG858) و (LEG448-JRP)جهت شناسایی لژیونلا ارزیابی گردید.*

یافته‌ها: *در این مطالعه۷۰٪ نمونه‌ها درصورت استفاده از جفت پرایمر LEG448-JRP آلوده به لژیونلا تشخیص داده شدند در صورتی که با استفاده از جفت پرایمرLEG858 -LEG225، ۵۰٪ نمونه‌ها وبا استفاده از جفت پرایمر LEG448-LEG858، ۴۵ ٪ نمونه‌ها آلوده به لژیونلا گزارش شدند.*

نتیجه گیری: *نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که آلودگی نمونه‌های آبی به گونه‌های لژیونلا می‌تواند به راحتی و به سرعت به وسیله روش Nested PCR تشخیص داده شود. بنابراین انتخاب روش مناسب جهت استخراج DNA و انتخاب پرایمرهای مناسب، عوامل مهم در کارایی و حساسیت روش تشخیص هستند.*

واژگان کلیدی: PCR، آب، شناسایی، لژیونلا

۱- کارشناس ارشد بهداشت محیط، مربی دانشکده پرستاری و بهداشت خوی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه
۲- دکترای بهداشت محیط، دانشیاردانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

مقدمه

لژیونلاها باکتری‌هایی گرم منفی هستند که در منابع آبی طبیعی و ساخت انسان به طور وسیعی پراکنده‌اند. این باکتری‌ها توانایی بقا درآب‌های با درجه حرارت و pH گوناگون، مواد مغذی و اکسیژن را دارند، و از آب موجود در سیستم‌های تهویه، آب شیر و برج‌های خنک‌کننده جداسازی شده اند(۱). بعضی از گونه‌های این باکتری برای انسان بیماری‌زا بوده و می‌توانند منجر به عفونت‌های تنفسی شوند. لژیونلاها دو نوع بیماری مستقل کلینیکی را ایجاد می‌نمایند یکی بیماری لژیونر که یک بیماری شدید با درگیری چند ارگان است و دیگری تب پونتیاک که نوعی بیماری خود به خود محدودشونده شبیه آنفولانزاست. لژیونلا پنوموفیلا عامل اصلی بیماری لژیونر و تب پونتیاک، اولین بار در سال ۱۹۹۷ به دنبال شیوع پنومونی حاد در فیلادلفیلا گزارش شد. انتقال میکروب از راه هوا عامل اصلی انتقال بیماری است. به این صورت که باکتری ازطریق استنشاق ذرات ریز آب حامل باکتری در دستگاه تنفسی انسان جایگزین شده و منجر به آلودگی می‌شود(۴-۲).

افراد پیر، سالخورده، معتاد و همچنین اشخاص مبتلا به نقص ایمنی و نیز بیمارانی که به هر دلیل سیستم دفاعی بدنشان تضعیف شده، مورد تهدید جدی این نوع عفونتند(۶-۵).

کشت باکتری هنوز روشی روتین در شناسایی باکتری لژیونلا به شمار می‌رود. اما، وجود برخی از فاکتورها و عوامل روش کشت را پیچیده نموده و در گزارش نتایج اختلال ایجاد می‌نمایند؛ از جمله این که برخی ارگانیسم‌ها ممکن هست زنده بوده ولی قابل کشت نباشد (Viable but non-culturable: VBNC) و یا در اثر وجود برخی ارگانیسم‌های دیگر، از رشدشان جلوگیری شود. مشکل مهم دیگر این که به خاطر غلظت کمتر باکتری در نمونه‌های محیطی، احتمال دارد شرایطی مناسب برای رشد باکتری فراهم نیاید. هم‌چنین برخی گونه‌های لژیونلا خیلی ضعیف در محیط های مصنوعی قادر به رشدند(۸-۷). حساسیت پایین روش کشت از دیگر محدودیت‌های این روش است. با توجه به عوامل فوق و با در نظر گرفتن این نکته که جهت جداسازی لژیونلا از نمونه ها مدت زمان طولانی (حداقل d ۷) نیاز است، امروزه روش‌های پیشرفته تری از جمله PCR با استفاده از تکثیر بخشی از ژن 5s rRNA و 16s rRNA جهت شناسایی باکتری لژیونلا مورد استفاده قرار گرفته است(۱۴-۹). PCR یکی از روش‌های پیشرفته‌ای است که تا حد زیادی محدودیت‌های روش کشت را برطرف می‌کند. زمانی که تست‌های تشخیص فنوتیپی برای باکتری لژیونلا مشکل باشد، آنالیزهای مولکولی مثل PCR جایگزین‌های خوب و مناسبی بوده و در صورتی که نتایج مثبت کاذب با استفاده از روش کشت گزارش شده باشد با استفاده از PCR به دلیل توانایی تشخیص گونه‌های خاص، نتایج دقیق تری اعلام می‌گردد(۱۵).

در مطالعات مختلفی سرعت زیاد تکنیک PCR نسبت به دیگر روش‌ها (۱۶) و همچنین حساسیت عمل این تکنیک با توجه به اینکه قادر به شناسایی غلظت‌های کم باکتری نسبت به روش‌های دیگر از جمله روش کشت، مشاهده شده است. در مقایسه با روش کشت، روش PCR با حساسیت و ویژگی زیاد، روش سریع و ساده‌ایست. مطالعات Wellinghausenو همکاران (۲۰۰۱) نشان داد که۹۸/۷٪ از نمونه‌های آبی بررسی شده از طریق روش PCR آلوده به لژیونلا تشخیص داده شده در حالی که در همین مطالعه لژیونلا فقط در ۷۰/۱٪ کشت‌ها مثبت بود(۱۲). در مطالعاتEdagawa و همکاران (۲۰۰۸) نیز از ۱۳۰ نمونه آبی مورد بررسی، ۴ نمونه توسط روش کشت آلوده به لژیونلا تشخیص داده شدند در حالی که با روش PCR کمی، ۲۳ نمونه آلوده به لژیونلا بودند(۱۷). البته روش PCR نیز به نوبه خود از محدودیت‌هایی برخوردار هست که از جمله این محدودیت‌ها می‌توان به احتمال وجود عوامل بازدارنده واکنش PCR در بررسی نمونه‌های محیطی اشاره نمود(۱۳و۱۵). با توجه به این که امروزه پرایمرهای مختلفی جهت بررسی لژیونلا به روش PCR طراحی شده و با توجه به وجود عوامل بازدارنده در بررسی نمونه‌های محیطی لازم است جهت ردیابی لژیونلا در نمونه‌های محیطی کاربرد و حساسیت فرایند PCR کاملا آشکار و مشخص گردد(۱۸). بنابراین مطالعه حاضر به منظور ارزیابی کاربرد روش PCR در شناسایی گونه‌های لژیونلا در نمونه‌های آبی با استفاده از سه جفت پرایمر اختصاصی طرح‌ریزی گردید.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و آماده سازی نمونه‌ها

در این مطالعه ۶۰ نمونه جهت بررسی وجود لژیونلا مورد آزمایش قرار گرفت. لازم به ذکر است که تعداد نمونه با توجه به رابطه $n=z^2s^2/d^2$ حداقل ۴۸ نمونه به دست آمد ولی با توجه به تعداد بیمارستان‌های تحت پوشش دانشگاه علوم پزشکی، تعداد نمونه بیشتری برداشت گردید. نمونه‌ها از آب برج‌های خنک‌کننده و آب گرم قسمت‌های مختلف ۱۱ بیمارستان جمع‌آوری گردید. جهت نمونه‌برداری mL ۵۰۰ آب از هر محل در ظروف استریل در شرایط استاندارد برداشت گردید و با حفظ درجه حرارت در ^0C ۴ به آزمایشگاه منتقل گردید. در ابتدا عمل فیلتراسیون با استفاده از صافی µ ۰/۲ بر روی نمونه ها انجام شد. فیلترها ابتدا در سه مرحله با نمک بافری فسفاته (PBS) شست‌وشو و شیک داده شده و سپس عمل اولتراسونیک با استفاده از حمام اولتراسونیک جهت پاک‌سازی بهتر فیلترها انجام می‌گرفت. پس از آن در چند مرحله عمل سانتریفوژ بر روی نمونه‌ها انجام گرفته و در نهایت پس از سوسپانسیون نمودن رسوب حاصل، عمل freez-thaw با استفاده از نیتروژن مایع و آب جوش برای آماده‌سازی نمونه‌ها جهت استخراج DNA صورت گرفت.

استخراج DNA با کیت promega ,Wizard® Genomic DNA Purification Kit, Madison, USA (Promega طبق دستورالعمل کارخانه سازنده انجام گرفت که در نهایت DNA به دست آمده، جهت شناسایی باکتری لژیونلا با روش PCR مورد استفاده قرار گرفت.

روش PCR

پس از استخراج DNA نمونه ها، در مرحله اول به منظور ارزیابی وجود عوامل بازدارنده و هم چنین تکثیر DNA برای افزایش حساسیت ردیابی باکتری لژیونلا، بخشی از ژن عمومی 16s rRNA باکتری‌ها، با بهره‌گیری از پرایمرهای Eubac27F و $1429R_1$ مورد تکثیر قرار گرفت (جدول ۱).

در مرحله بعد با استفاده از DNA تکثیر یافته در مرحله قبل، عمل Nested PCR با استفاده از سه جفت پرایمر با توالی ذکر شده در جدول ۱ جهت تشخیص باکتری لژیونلا انجام گرفت(۷و۱۹).

جهت تکثیر DNA در هر دو مرحله، از µL ۲۵ محلول PCR حاوی بافر با غلظت،dNTP 1X با غلظت µM ۰/۲، هر کدام از پرایمرها با غلظت µM۰/۲ ، ۱/۵ واحد Taq DNA polymeraseو µL ۱، DNA الگو استفاده شد. در کنار

جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده جهت بررسی لژیونلا

پرایمرها	توالی پرایمرها	ژن شناسایی	سایز محصولات(bp) PCR
Eubac27 F 1429 R1	5′-AGA-GTT-TGA-TCC-TGG-CTC-A-<G>-3′	16S rRNA	حدود ۱۴۲۰ bp
LEG 225 LEG 858	5′-AAG-ATT-AGC-CTG-CGT-CCG-A-<T> -3′	16S rRNA	۶۵۴ bp
LEG 448 LEG 858	5′- AGG-GGT-TGA-TAG-GTT-AAG-AG-<C> -3′	16S rRNA	۴۳۰bp
LEG 448 LEG JRP	5′- AGG-GGT-TGA-TAG-GTT-AAG-AG-<C> -3′	16S rRNA	۳۸۶bp

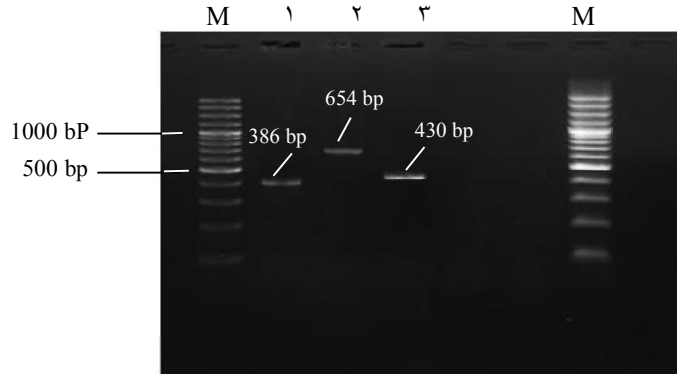
جدول ۲: برنامه PCR به منظور تشخیص باکتری‌های لژیونلا

تعداد مرحله وسیکل ها	تقسیمات فرعی هر مرحله	درجه حرارت	زمان
مرحله اول (۱ سیکل)	Pre- Denaturation	۹۵°C	۵min
	Denaturation	۹۴°C	۴۵s
مرحله دوم (۳۰ سیکل)	Annealing	۵۵°C	۱min
	Extention	۷۲°C	۱/ ۳۰min
مرحله سوم (۱ سیکل)	Final Extention	۷۲°C	۵min
مرحله چهارم (۱ سیکل)	Cooling	۴ °C	۳min

نمونه‌ها یک ویال به عنوان کنترل مثبت (DNA تهیه شده از سوش استاندارد) (FEPTU, for center HPA infections, NCTC 12821, United pneumophila.L Kingdom, London) و یک ویال دیگربه عنوان کنترل منفی (آب مقطر) در نظر گرفته شد.

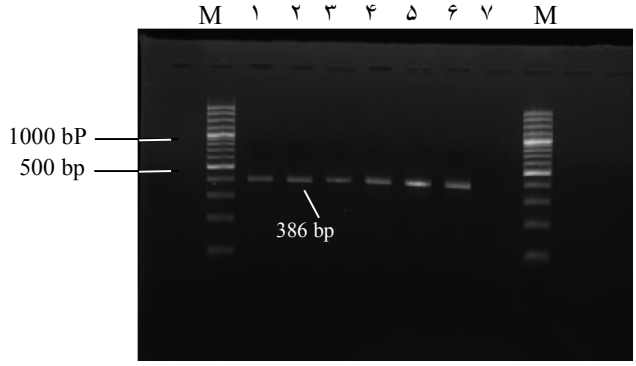
محلول آماده‌سازی شده برای واکنش PCR در داخل میکروتیوب‌ها با برنامه دمایی آمده در جدول ۲ داخل ترموسایکلر قرار گرفت.

جهت تشخیص و بررسی محصولات PCR، عمل الکتروفورز انجام می‌گرفت. برای این کار ژل آگارز ۱/۵٪و Loading Buffer مورد استفاده قرار گرفته و جهت رنگ‌آمیزی ژل خارج شده از الکتروفورز از اتیدیوم بروماید و برای مشاهده حرکت DNA روی ژل از دستگاه آشکارساز (UV Tech, France) استفاده شد. قبل از بررسی و شناسایی لژیونلا در نمونه‌های آبی، عمل Nested PCR با استفاده از DNA تهیه شده از سوش استاندارد انجام گرفت که بعد از بررسی و مشاهده باندهای تشکیل شده با هر سه نوع پرایمر، بررسی و تحقیق در مورد نمونه‌های آبی انجام گرفت.



M) شناساگر مولکولی (100bp) ۱) پرایمرهای LEG 448- JRP ۲ پرایمرهای LEG 858-LEG 225
۳) پرایمرهای LEG448-LEG858

شکل ۱: الکتروفورز محصولات PCRگونه استاندارد لژیونلا پنوموفیلا با استفاده از پرایمرهای مختلف



M) شناساگر مولکولی (100bp) ۱)غلظت ۱cfu در تیوب ۲) غلظت ۵cfu ۳) غلظت ۱۰ cfu ۴) غلظت $۱۰^{۲}$ cfu
۵)غلظت $۱۰^{۳}$cfu ۶)کنترل مثبت ۷)کنترل منفی

شکل ۲: نتایج الکتروفورز جهت تعیین حساسیت روش PCR با استفاده از پرایمر LEG 448-JRP

تعیین حساسیت روش PCR

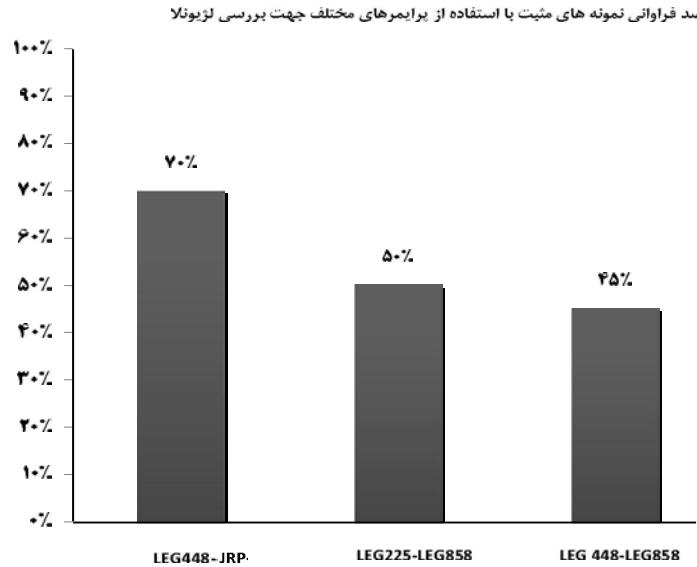
در این تحقیق هم چنین حساسیت عمل PCR با استفاده از سوش استاندارد مورد بررسی قرار گرفت. برای این کار مطابق با استاندارد مک فارلند سوسپانسیون باکتریایی با غلظت مشخص تهیه شد و با عمل رقیق‌سازی سریالی از غلظت $۱۰^{۳}$ cfu– ۱ از لژیونلا تهیه گردید. سپس عمل استخراج DNA و واکنش PCR بر روی رقت‌های باکتریایی مورد نظر انجام شد.

آزمون آماری

در این تحقیق از برنامه آماری SPSS جهت نتایج آنالیز استفاده گردید. از آزمون آماری McNemar جهت مقایسه انواع مختلف پرایمرها استفاده شد. برای مقادیر ($P<۰/۰۵$) نتایج معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در این مطالعه ۶۰ نمونه جهت بررسی وجود لژیونلا مورد آزمایش قرار گرفت. همان طور که ذکر شد قبل از بررسی نمونه‌های آبی مورد مطالعه، جهت مشاهده نوع و سایز باند تشکیل یافته با پرایمرهای مختلف، از سوش استاندارد برای این منظور استفاده گردید که بعد از بررسی و مشاهده باندهای تشکیل یافته، تحقیق و بررسی در مورد نمونه‌های آبی انجام گرفت. شکل ۱ بیان‌گر باندهای مشاهده شده محصولات PCR با استفاده از هر سه نوع پرایمر جهت سوش استاندارد لژیونلا است.در این تحقیق حساسیت عمل PCR نیز مورد بررسی قرار گرفت که در شکل ۲ نتایج الکتروفورز، جهت تعیین حساسیت روش PCR با استفاده از پرایمرهای LEG448 -JRP که



شکل ۳: درصد فراوانی نمونه های مثبت با استفاده از پرایمرهای مختلف جهت بررسی لژیونلا

www.SID.ir

بیشترین حساسیت ردیابی را در نمونه‌های محیطی نشان داد، ارایه شده است.

در شکل ۳، درصد فراوانی نمونه‌های مثبت با استفاده از پرایمرهای مختلف (LEG448–JRP)، (LEG225-LEG858) و (LEG448-LEG858)جهت بررسی لژیونلا ارایه شده است.

در شکل ۴ الکتروفورز محصولات PCR نمونه‌ها جهت تشخیص عمومی باکتری‌ها و در شکل ۵ نتایج الکتروفوز نمونه‌های مثبت باکتری لژیونلا با استفاده از پرایمرهای LEG448 و JRP ارایه شده است.

بحث

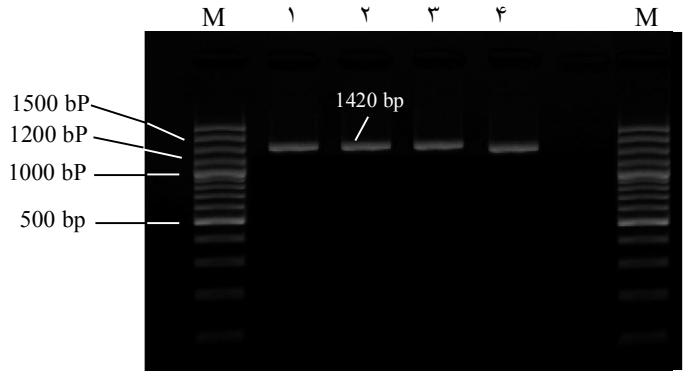
با توجه به مشکلات و بیماری‌های ناشی از لژیونلا پنوموفیلا و نظر به این که آلودگی آب بیمارستان‌ها به لژیونلا به عنوان یکی از انواع مشخص لژیونلوزیس بیمارستانی به شمار رفته و در زمره عفونت‌های بیمارستانی است، بنابراین روش‌های شناسایی دقیق و سریع این عوامل ضروریست(۲۰).

PCR یکی از روش‌های مناسب در شناسایی باکتری لژیونلاست. این روش نسبت به روش‌های دیگر از حساسیت بالایی برخوردار بوده و نتایج آن سریع قابل دستیابی است (۲۱)، هم چنین استفاده از این روش برای شناسایی باکتری لژیونلا در نمونه‌های محیطی در مقیاس وسیع‌تر مقرون به صرفه است(۲۲)؛ بنابراین در این مطالعه سعی شده با بهینه کردن شرایط انجام واکنش PCR از جمله انتخاب پرایمرهای مناسب، دقت نتایج آزمایش‌ها را مورد بررسی قرار داده و مناسب‌ترین پرایمر در خصوص شناسایی باکتری لژیونلا تشخیص داده شود.

در این مطالعه جهت شناسایی لژیونلا در نمونه‌های آبی با استفاده از روش PCR، سه نوع پرایمر مختلف مورد استفاده قرار گرفت. نتایج حاصله نشان داد که در صورت استفاده از پرایمرهای LEG448-LEG858، ۴۵٪ نمونه‌ها و در صورت استفاده از پرایمرهایLEG225-LEG858، ۵۰٪ نمونه‌ها، ولی در صورت استفاده از پرایمرهایJRP –LEG448–، درصد بیشتری از نمونه‌ها که حدود۷۰٪ بود، آلوده به لژیونلا گزارش شدند.

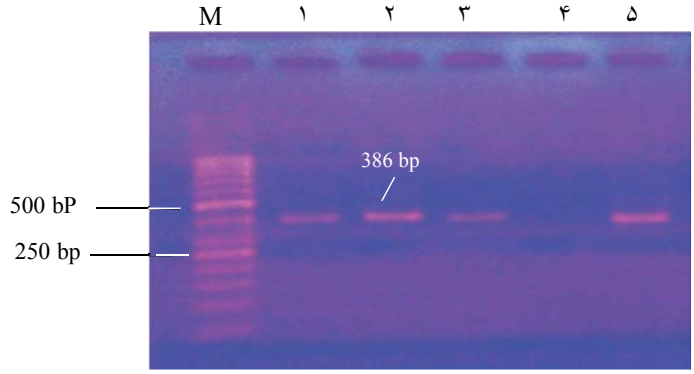
در مورد مقایسه انوع مختلف پرایمرها بر اساس آزمون آماری McNemar، اختلاف معنی‌داری در صورت استفاده از پرایمرهای LEG225-LEG858 وJRP –LEG448– و همچنین پرایمرهای LEG448- LEG858 وJRP –LEG448– مشاهده شد (P<۰/۰۰۱)، ولی اختلاف معنی‌داری در صورت استفاده از پرایمرهای LEG225-LEG858 وLEG448-LEG858 مشاهده نگردید (P=۰/۲۵).

بنابراین با توجه به نتایج آزمایش‌های انجام گرفته مشخص گردید که پرایمر JRP –LEG448– نسبت به دیگر پرایمرهای مورد استفاده (LEG225-LEG858 وLEG448-LEG858) پرایمری موثر در شناسایی باکتری لژیونلا در نمونه‌های آبی به شمار می‌رود.



M) شناساگر مولکولی (100bp) ، ۱ و ۲ و۳) محصولاتPCR،۴) کنترل مثبت، ۵)کنترل منفی

شکل ۴: الکترو فورز محصولات PCR نمونه‌ها جهت تشخیص عمومی باکتری‌ها بر روی ژل آگارز ۱/۵٪



M) شناساگر مولکولی (50bp)، ۱ و ۲ و۳) محصولاتPCR،۴) کنترل منفی، ۵)کنترل مثبت

شکل۵: الکترو فورز محصولات PCR نمونه‌ها جهت بررسی لژیونلا با پرایمرهای LEG448 و JRP بر روی ژل آگاروز۵ /۱٪

تعداد نمونه‌های مثبت آلوده به لژیونلا در صورت استفاده از پرایمر LEG448-JRP نسبت به دیگر پرایمرها خیلی بیشتر بوده که در واقع حساسیت زیاد این پرایمر در شناسایی باکتری لژیونلا در نمونه‌های آبی را بیان می‌کند. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۵ در بلژیک انجام گرفته نیز مشخص گردید که ۹۸٪ نمونه‌ها با روشNested PCR و با استفاده از پرایمرهای LEG448-JRP از نظر لژیونلا مثبت هستند، در حالی که با استفاده از پرایمرهایLEG858 - LEG225، ۵۶٪ نمونه‌ها مثبت گزارش شده بودند(۲۳).

این نتایج اهمیت مقایسه پرایمرهای مختلف را در زمان بررسی نمونه‌های آبی جهت اجتناب از تخمین کمتر نمونه‌های مثبت، مورد تاکید قرار می‌دهد. در مطالعاتی که جهت بررسی نمونه‌های محیطی با بهره‌گیری از روش PCR، یک نوع پرایمر مورد استفاده قرار می‌گیرد احتمال دارد به علت حساسیت پایین، نمونه‌های مثبت و آلوده شناسایی شده، کمتر از مقدار واقعی باشد. بنابراین استفاده از پرایمرهای مختلف، هم در نمونه‌های محیطی و هم نمونه‌های بالینی، منجر به شناسایی پرایمرهایی با حساسیت و ویژگی‌های زیاد خواهد شد که در این صورت تعداد نمونه‌های آلوده شناسایی شده دچار خطای زیادی نخواهد بود(۷).

در مطالعه انجام گرفته با توجه به این که شرایط یکسانی جهت انجام واکنش PCR در تمام مراحل حاکم بود، بعد از الکتروفورز محصولات PCR، باندهای مشاهده شده با استفاده از هر سه نوع جفت پرایمر از لحاظ مشخص بودن و وضوح (sharp ness) تفاوت بارزی نداشتند و هر سه نوع باند مشاهده شده باندهای مناسبی بودند؛ و در واقع تفاوت پرایمرهای مختلف در تشخیص و شناسایی نمونه آلوده، مربوط به حساسیت پرایمرهای مورد استفاده است که منجر به شناسایی و یا عدم شناسایی نمونه آلوده می‌گردد.

نتایج این مطالعه هم چنین نشان داد که روش به کار رفته جهت استخراج DNA روش مناسبی بوده به گونه‌ای که نتایج مربوط به PCR با پرایمرهای عمومی باکتری‌ها در تمام نمونه‌ها مثبت گزارش شد.

نتیجه گیری

نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که با انتخاب روش مناسب جهت استخراج DNA و انتخاب پرایمرهای مناسب می‌توان به سادگی آلودگی نمونه‌های محیطی به لژیونلا را به سرعت تشخیص داد. حساسیت، ویژگی و سرعت عمل بالا در دستیابی به نتایج، از مزایای PCR است که بر اساس آن می‌توان اقدامات کنترلی مناسب را جهت جلوگیری از عفونت‌های حاصل از این باکتری به ویژه در محیط‌های خاص بلافاصله اجرا نمود.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل از پایان نامه‌ای با عنوان "بررسی وجود باکتری لژیونلا در آب مصرفی وآب برج‌های خنک‌کننده بیمارستان‌های دانشگاه علوم پزشکی شهر اصفهان از طریق مقایسه دو روش کشت و PCR" در مقطع کارشناسی ارشد در سال ۱۳۸۹ با شماره ۳۸۷۳۴۶ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است که با حمایت مالی معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان انجام شده است.

منابع

1. Brooks GF, Butel JS, Morse SA. Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology. 23rd ed. Asia: McGraw-Hill; 2004.
2. Friedman H, Klein TW, Bendinelli M. Infectious Diseases andSubstance Abuse (Infectious Agents and Pathogenesis). 1st ed. New York: Springer; 2005.
3. O'Neill E, Humphreys H. Surveillance of hospital water and primary prevention of nosocomial legionellosis: what is the evidence?. Journal of Hospital Infection. 2005;59(4):273-9.
4. Ishimatsu S, Miyamoto H, Hori H, Tanaka I, Yoshida S. Sampling and detection of Legionella pneumophila aerosols generated from an industrial cooling tower. The Annals of Occupational Hygiene. 2001;45(6):421-7
5. Tello R, Hill T, Hartnell G, Costello P, Stokes K. Legionella infected thoractic aortic graft. Journal of Computerized Medical Imaging and Graphics. 1993;17(1):61-7.
6. Ahmadinejad M, Shakibaie MR, Shams K, Khalili M. Detection of Legionella pneumophila in cooling water systems of hospitals and nursing homes of Kerman city, Iran by Semi- Nested PCR. International Journal of Biological and Life Sciences. 2011;7(2):70-3.
7. Devos L, Clymans K, Boon N, Verstraete W. Evaluation of nested PCR assays for the detection of Legionella pneumophila in a wide range of aquatic samples. Journal of Applied Microbiology. 2005;99(4): 916-25.
8. Ng DL, Koh BB, Tay L, Heng BH. Comparison of polymerase chain reaction and conventional culture for the detection of Legionellae in cooling tower waters in Singapore. Letters in Applied Microbiology. 1997;24(3):214-6.
9. Joly P, Falconnet PA, Andre 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.
10. Pepper IL, Gerba CP. Environmental Microbiology: A Laboratory Manual. 2nd ed. Amesterdam: Elsevier Academic Press; 2005.
11. Yasmon A, Yusmaniar, Karuniawati A, Bela B. Simultaneous detection of Legionella species and

Legionella pneumophila by duplex PCR (dPCR) assay in cooling tower water samples from Jakarta, Indonesia. Medical Journal Indonesia. 2010;19(4):223-7.
12. Wellinghausen N, Frost C, Marre R. Detection of Legionellae in hospital water samples by Quantitative real-time LightCycler PCR. Applied and Environmental Microbiology. 2001;67(9):3985–93.
13. Declerck P, Verelst L, Duvivier L, Van Damme A, Ollevier F. PCR as a test for the presence or absence of Legionella in (cooling) water. Water Science and Technology. 2003;47(3):103-7.
14. Dusserre E, Ginevra C, Hallier-Soulier S, Vandenesch F, Festoc G, Etienne J, et al. A PCR-based method for monitoring Legionella pneumophila in water samples detects viable but noncultivable Legionellae That can recover their cultivability. Applied and Environmental Microbiology. 2008;74(15):4817-24.
15. Ko KS, Hong SK, Lee KH, Lee HK, Park MY, Miyamoto H, et al. Detection and identification of Legionella pneumophila by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the RNA polymerase gene. Journal of Microbiological Methods. 2003;54(3):325-37.
16. Delgado-Viscogliosi P, Solignac L, Delattre J-M. Viability PCR, a culture-independent method for rapid and selective quantification of viable Legionella pneumophila cells in environmental water samples. Applied and Environmental Microbiology. 2009;75(11):3502-12.
17. Edagawa A, Kimura A, Doi H, Tanaka H, Tomioka K, Sakabe K, et al. Detection of culturable and nonculturable Legionella species from hot water systems of public buildings in Japan. Journal of Applied Microbiology. 2008;105(6):2104-14.
18. Villari P, Motti E, Farullo C, Torre I. Comparison of conventional culture and PCR methods for the detection of Legionella pneumophila in water. Letters in Applied Microbiology. 1998;27(2):106–10.
19. Wullings BA, Kooij VD. Occurrence and genetic diversity of uncultured Legionella spp. in drinking water treated at temperatures below 15°C. Applied and Environmental Microbiology. 2006;72(1):157–66.
20. Lin YE, Stout JE, Yu VL. Prevention of hospital-acquired legionellosis. Current Opinion in Infectious Diseases. 2011;24(4):350-6.
21. Yáñez MA, Barberá VM, Catalán V. Validation of a new seminested PCR-based detection method pneumophila. Journal of Microbiological Methods. 2007;70(1):214-7
22. Fittipaldi M, Codony F, Morato J. Comparison of conventional culture and real-time quantitative PCR using SYBR Green for detection of Legionella pneumophila in water samples. Water Sanitation. 2010;36(4):417-24.
23. Perola O, Kauppinen J, Kusnetsov J, Kärkkäinen UM, Lück PC, Katila ML. Persistent Legionella pneumophila colonization of a hospital water supply: Efficacy of control methods and Amolecular epidemiological analysis. Acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica. 2005;113(1):45-53.

Sensitivity Comparison of Different 16s rDNA- Specific Primers for Detection of Legionella Species in Aquatic Samples

Farzaneh Baghal Asghari[1], *Mahnaz Nikaeen[2]

[1]Department of Environmental Health Engineering, Faculty of Nursing and Health, Urmie University of Medical Sciences, West Azarbaijan, Iran

[2]Department of Environmental Health Engineering, School of Health, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Received; 05 April 2012 Accepted; 27 July 2012

ABSTRACT

Background and Objectives: Legionella are gram-negative bacteria widely dispersed in natural and man-made water sources. Some Legionella species are pathogenic and could cause respiratory infections. Cultivation technique is the conventional method for the detection of Legionella spp. in aquatic samples. However, the method has low sensitivity and require prolonged incubation period. Therefore, Polymerase chain reaction (PCR) as a rapid method with extreme sensitivity is used. The present study was designed to evaluate the feasibility and sensitivity of PCR method for detection of Legionellas pp. in aquatic samples using three sets of primers.

Materials and Methods: In this study, 60 water samples were investigated for the presence of Legionella species using Nested- PCR technique. The sensitivity of this technique was evaluated for the detection of Legionella species in aquatic samples using three primer sets, including (LEG225-LEG858), (LEG448-LEG858), and (LEG448-JRP).

Results: The nested PCR assay revealed that detection percentage of Legionella in samples was 70 when LEG448-JRP primers were used, whereas this percentage reduced to 50 and 45 when we applied prime sets of LEG225-LEG858 and LEG448 - LEG858, respectively.

Conclusion: The results of the study showed that contamination of aquatic samples to the Legionella spp. could be easily and rapidly detected by nested PCR. However, selecting appropriate method for DNA extraction and choosing the primers are important factors in efficiency and sensitivity of detection method.

Keywords: PCR, Water, Detection, Legionella

***Corresponding Author**: *nikaeen@hlth.mui.ac.ir*
***Tel:** +98 311 7922660, **Fax:** +98 311 6682509*