Journal of Arak University of Medical Sciences

February & March 2021. Vol 23. Issue 6

Research Paper

Enrichment and Rapid Detection of Vibrio Cholerae From Water by Non-culture Method

Abolfazl Moradi[1], ***Mehdi Zeinoddini**[1]

1. Department of Biology, Faculty of Chemical Engineering, Malek-e-Ashtar University of Technology, Shahin Shahr, Iran.

Use your device to scan and read the article online

Citation: Moradi A, Zeinoddini M. [Enrichment and Rapid Detection of Vibrio Cholerae From Water by Non-culture Method (Persian)]. Journal of Arak University of Medical Sciences (JAMS). 2021; 23(6):902-911. https://doi.org/10.32598/JAMS.23.6.4124.3

https://doi.org/10.32598/JAMS.23.6.4124.3

CC BY NC

Article Info:

Received: 29 Dec 2019

Accepted: 11 Aug 2020

Available Online: 01 Feb 2021

Keywords:

Vibrio cholerae, Bacterial enrichment, Filtration, Detection

ABSTRACT

Background and Aim In the microbial contamination of food and water, identifying the trace amounts of contaminating bacteria has always been of researchers' interest and concern. The most frequent approach to resolve this problem is using culture-based methods to increase and enrich bacteria samples; accordingly, it extends the bacterial detection process to several hours or days. One of the smart strategies to solve this problem is the concentration of bacteria using physical methods. The present study aimed to enrich Vibrio cholerae as the most essential water-polluting germs. Accordingly, we used the filtration method and evaluated its function by culture method and two detection approaches of Adenosine Triphosphate (ATP) and PCR assay.

Methods & Materials A certain concentration of V. Cholerae was artificially added to a specified volume of sterile water. Then, the bacteria were extracted from the medium and filtered using 0.450 µm separable filters. Finally, the performance of the pre- and post-filtration processes was compared using bacterial cell culture (CFU), ATP, and PCR assay with the specific primers for the ompW gene of V. cholerae.

Ethical Considerations This article is a meta-analysis with no human or animal sample.

Results The present research results indicated that the applied method presented high efficiency and recovery performance. In other words, samples provided no positive response before filtration in both methods; however, after filtration in isolated and recovered samples, the presence of bacteria was detected in the ATP and PCR methods.

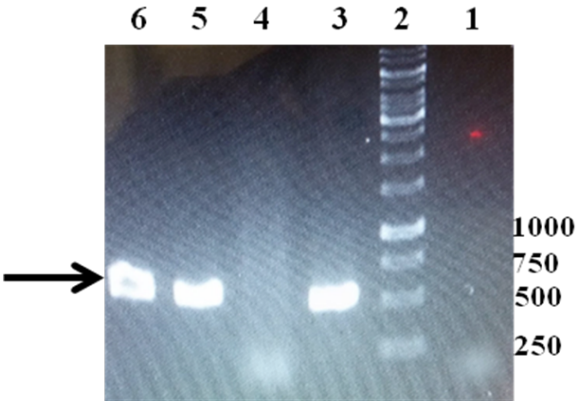
Conclusion In conclusion, the employed strategy can detect V. cholerae in non-culture and in the shortest time in contaminated water samples.

Extended Abstract

1. Introduction

In the microbial contamination of water and food, identifying small amounts of contaminating bacteria has always been a concern of researchers [4-7]. Accordingly, it is necessary to concentrate the bacteria and increase its number. The most prevalent approach to solve this problem is to grow bacteria to elevate their number, which increases the time of bacterial detection to several hours or even days [8, 9]. An effective and smart solution to solve this problem is to concentrate bacteria by physical and non-cultured methods [17-19]. The present study aimed to enrich Vibrio cholerae (V. cholerae), as the most crucial microbial

* *Corresponding Author:*
Mehdi Zeinoddini, PhD.
Address: Department of Biology, Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, Malek-e-Ashtar University of Technology, Shahin Shahr, Iran.
Tel: +98 (21) 22974604
E-mail: zeinoddini52@mut.ac.ir



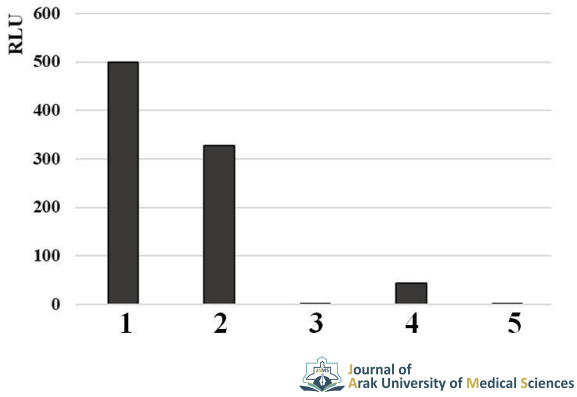
Journal of Arak University of Medical Sciences

Figure 1. Evaluating filtration method using PCR and comparing pre-filtered sample (row 4) and filtered sample (row 3)

contaminant in water; thus, we used physical filtration and evaluated this yield by culture method and the diagnostic methods of ATP and PCR.

2. Materials and Methods

V. cholerae bacterium obtained from the reference laboratory (Bouali Hospital) was initially confirmed using specific tests (specific culture medium & molecular PCR methods). Then, a certain concentration of bacteria was artificially transferred in a certain volume of sterile water. Next, with the help of Watman's 0.45-micron filters, which contain detachable preservatives, bacteria were extracted from the environment and concentrated on the filter. Finally, the performance of the method after and before filtration using cell culture (determining & counting colony, CFU), ATP assay (using the leading Nuragen company kit & Hygina luminometer), and molecular PCR method (with specific primers of Vibrio cholerae ompW gene) were compared.



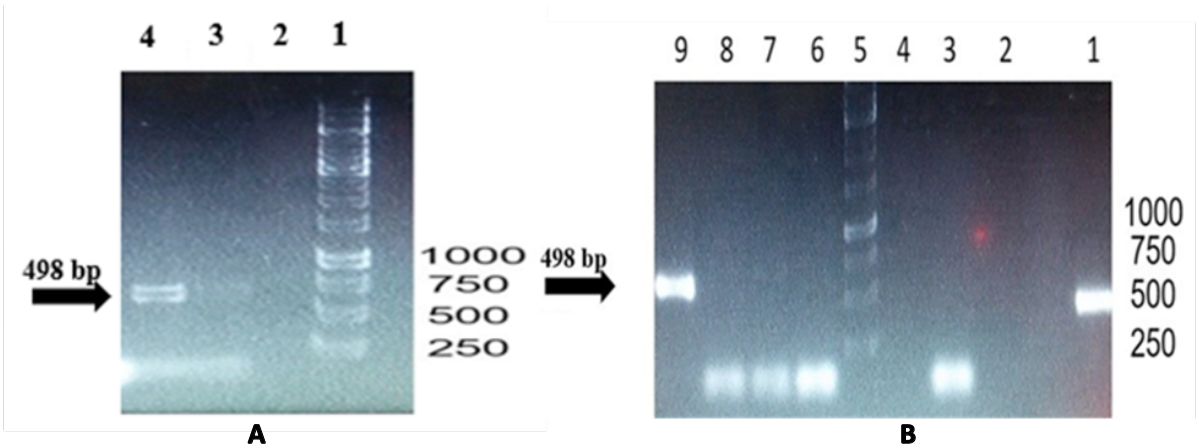
Journal of Arak University of Medical Sciences

Figure 2. Determining filter method sensitivity using ATP test

Sample 1=10^6 CFU, sample 2=10^5CFU, sample 3=10^4 CFU, sample 4=10^3 CFU, sample 5=10^2CFU.

3. Results

To confirm the filtration method, V. cholerae was filtered 3 times with different concentrations. The present research results indicated that the physical filtration method in concentrating V. cholerae bacteria presents high efficiency and recycling performance. The sample, before filtration, provided no positive result in the ATP and PCR assay methods; however, after filtration, the presence of bacteria in both methods was observed and proven in isolated and recycled samples (Figures 1 & 2). The sensitivity of the filter method was also evaluated by PCR test, i.e. estimated according to Figure 3 and by comparing Figures 3A and B; accordingly, by revealing the PCR reaction results of concentrated



Journal of Arak University of Medical Sciences

Figure 3. Determining the sensitivity of the filter method using ATP test for samples

A: After; and B: Before the filtration of contaminated samples.

and non-concentrated samples, the sensitivity of CFU 10^1 filter technique was estimated.

4. Discussion and Conclusion

According to the obtained data, the filtration method in concentrating V. cholerae can be introduced as reliable and practical in removing contaminants, concentrating, and isolating bacteria. The main problem of the filter-based concentration method is the recycling of bacteria from the filter. With the method used, the bacterial recycling efficiency reached 100% (Figure 1). The same efficiency was observed in previous investigations. For example, in 1996, Hug et al. used the filter method to remove V. cholerae contamination from contaminated water, which also achieved 100% filtration separation efficiency [17]. Other methods of concentrating bacteria include the adsorption approach using magnetic nanoparticles Immunomagnetic Separation (IMS). Accordingly, in 2001, Hudson et al. could use this method to separate Listeria bacteria from meat samples and in <24 hours, the bacteria were isolated and identified by PCR [23].

The current research findings suggested that using a physical concentration strategy with filtration, V. cholerae can be detected in contaminated water samples in the shortest time without the need for culture.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

This article is a meta-analysis with no human or animal sample.

Funding

This study was extracted from MSc. thesis of the first author at the Department of Biology, Faculty of Chemical Engineering, Malek-e-Ashtar University of Technology, Shahin Shahr. Also, this study was supported by the Research Institute of Biological Sciences and Technology of the Malek Ashtar University of Technology.

Authors' contributions

Conceptualization, methodology, writing – original draft, and writing – review & editing: Mehdi Zeinoddini; Investigation: Abolfazl Moradi.

Conflicts of interest

The authors disclosed no conflicts of interest.

Acknowledgements

We would like to thank the Research Institute of Biological Sciences and Technology of the Malek Ashtar University of Technology for their support.

مقاله پژوهشی

تغلیظ و تشخیص سریع باکتری ویبریو کلرا از آب با استفاده از روش‌های غیروابسته به کشت

ابوالفضل مرادی[۱]، *مهدی زین‌الدینی[۱]

۱. گروه علوم زیستی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، شاهین‌شهر، ایران.

اطلاعات مقاله:
تاریخ دریافت: ۸ دی ۱۳۹۸
تاریخ پذیرش: ۲۱ مرداد ۱۳۹۹
تاریخ انتشار: ۱۳ بهمن ۱۳۹۹

چکیده

زمینه و هدف شناسایی مقادیر ناچیز باکتری آلاینده در آلودگی‌های میکروبی آب و مواد غذایی همواره از دغدغه‌های محققان بوده و هست. مرسوم‌ترین راهکار برای رفع این مشکل کشت باکتری برای افزایش تعداد باکتری‌هاست که این روش زمان تشخیص باکتری را به چندین ساعت یا چند روز افزایش می‌دهد. یکی از استراتژی‌های هوشمند برای رفع این مشکل، تغلیظ باکتری با روش‌های فیزیکی است. هدف از تحقیق حاضر غنی‌سازی باکتری ویبریو کلرا به عنوان مهم‌ترین میکروب آلوده‌کننده آب، با استفاده از روش فیلتراسیون و ارزیابی این عملکرد به کمک روش کشت و دو روش تشخیصی سنجش ATP و PCR است.

مواد و روش‌ها غلظت معینی از باکتری ویبریو کلرا در حجم مشخصی از آب استریل به صورت مصنوعی انتقال داده شد؛ سپس با کمک فیلترهای ۰/۴۵ قابل جداسازی، باکتری از محیط استخراج و تغلیظ شد. درنهایت عملکرد روش بعد و قبل از فیلتراسیون با استفاده از کشت سلولی، سنجش ATP و روش ملکولی PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن ompW باکتری ویبریو کلرا، مقایسه شد.

ملاحظات اخلاقی با توجه به اینکه در این پژوهش آزمون‌های انسانی یا حیوانی انجام نشده است، دارای کد اخلاق و کد IRCT نیست.

یافته‌ها نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که این روش کارایی و عملکرد بازیافتی بالایی را نشان می‌دهد. به طوری که نمونه قبل از فیلتراسیون فاقد جواب مثبت در هر دو روش مذکور بوده است، حال آنکه پس از فیلتراسیون، در نمونه‌های جدا و بازیافت‌شده، حضور باکتری در هر دو روش سنجش ATP و PCR رؤیت و اثبات شد.

نتیجه‌گیری در نتیجه با استفاده از این استراتژی می‌توان باکتری ویبریو کلرا را بدون نیاز به کشت، در کمترین زمان در نمونه‌های آب آلوده شناسایی کرد.

کلیدواژه‌ها:
ویبریو کلرا، تغلیظ باکتری، فیلتراسیون، تشخیص

مقدمه

ویبریوکلرا یکی از مهم‌ترین باکتری‌های آلوده‌کننده آب و از پاتوژن‌های بسیار مهمی است که سالانه باعث مرگ تعداد زیادی از افراد در نقاط مختلف جهان می‌شود. مهم‌ترین عامل آلوده‌کنندگی این باکتری، توکسین کلرا است که سبب بروز بیماری حاد گوارشی می‌شود [۳-۱]. از سوی دیگر یکی از بزرگ‌ترین نگرانی‌های سازمان بهداشت جهانی و محققان این حوزه شناسایی غلظت‌های بسیار کم این باکتری است. در کنار شناسایی غلظت‌های کم پاتوژن‌ها، سرعت تشخیص نیز امری بسیار مهم تلقی می‌شود؛ به همین منظور روش‌های متنوعی برای شناسایی این باکتری ابداع شده و توسعه یافته است. روش‌هایی از قبیل کشت باکتری (روش استاندارد) و تشخیص مولکولی که امروزه نیز کاربرد زیادی دارد [۷-۴]. با این حال روش معمول و سنتی شناسایی باکتری‌ها استفاده از محیط‌های کشت آگار است اما این روش بسیار وقت‌گیر و زمان‌بر بوده و نیاز به تشخیص چند مرحله‌ای دارد؛ دست‌یابی به نتایج اولیه در این روش سه تا چهار روز زمان می‌برد. علاوه بر این ممکن است به دلیل وجود باکتری‌های زنده غیرقابل کشت، نتایج منفی کاذب نیز مشاهده شود [۹، ۸]. به همین دلیل روش‌های تشخیصی دیگری جایگزین کشت این باکتری شده که امروزه با نام روش‌های تشخیص مولکولی شناخته می‌شوند.

از روش‌های مولکولی می‌توان واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ساده[۱]، مولتی پلکس پی‌سی‌آر[۲]، واکنش پلیمراز کمّی، تکثیر نوکلئیک

1. PCR
2. Multiplex PCR

* نویسنده مسئول:
دکتر مهدی زین‌الدینی
نشانی: شاهین‌شهر، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، دانشکده مهندسی شیمی، گروه علوم زیستی.
تلفن: ۲۲۹۷۴۶۰۴ (۲۱) ۹۸+
پست الکترونیکی: zeinoddini52@mut.ac.ir

اسید بر اساس توالی، تکثیر هم‌دمای وابسته به حلقه[3] و تکنولوژی میکرواری (تراشه زیستی) را نام برد [۱۰-۱۴]. همچنین در این خصوص از سلول‌های هیبریدومای دستکاری‌شده ژنتیکی حاوی پروتئین‌های بیولومیسنانس نیز در قالب حسگرهای زیستی استفاده شده است که کارایی و حد تشخیص این باکتری را افزایش داده است [۱۵، ۱۶]. با این حال روش‌های اشاره‌شده در بالا دارای معایب خاصی نیز هستند. برای مثال تشخیص باکتری ویبریو در نمونه‌های آب و غذای آلوده، به دلیل وجود ذرات همراه آن‌ها باعث مهار عملکرد آنزیم مولکولی خواهد شد. از سویی دیگر غلظت کم باکتری در آب و غذای آلوده نیز یک محدودیت برای روش‌های ذکرشده محسوب خواهد شد، به طوری که رسیدن به حد تشخیصی CFU ۱۰۲ - ۱۰۳ کار بسیار دشواری بوده و اغلب روش‌های استفاده‌شده به این حد تشخیصی نمی‌رسند.

برای رفع این مشکل لازم است غلظت باکتری را افزایش داده تا با روش‌های مذکور امکان شناسایی آن مهیا شود. افزایش غلظت باکتری اغلب وابسته به کشت است، ولی می‌توان از روش‌های غیروابسته به کشت نیز استفاده کرد. تاکنون گزارش‌های متعددی در خصوص تغلیظ باکتری‌ها به صورت غیروابسته به کشت ارائه شده است. جداسازی باکتری‌های ویبریو کلرا از پلانکتون‌ها به منظور تصفیه آب شرب در کشور ما نیز توسعه یافته است. جداسازی با کمک فیلتر [۱۷]، جداسازی باکتری Alicyclobacillus acidoterrestris از آب سیب [۱۸] و جداسازی سویه‌های کرونو باکتر با استفاده از روش جداسازی ایمنی مغناطیسی[4] از جمله این تحقیقات هستند [۱۹] که همگی بیانگر مزیت روش‌های تغلیظ فیزیکی است. بنابراین هدف تحقیق حاضر تغلیظ باکتری ویبریوکلرا O1 با استفاده از روش فیزیکی و سریع فیلتراسیون و بررسی عملکرد این روش تغلیظی با روش کشت باکتری، واکنش زنجیره‌ای پلی مراز و سنجش ATP است.

مواد و روش‌ها

سویه باکتری استفاده‌شده در این تحقیق

در این مطالعه پژوهشی و تجربی، ویبریوکلرا O1 از بانک سلولی آزمایشگاه مرجع ایران (بیمارستان بوعلی) تهیه شد [۱۲]. برای اطمینان از سالم بودن سویه باکتری دریافتی ابتدا در محیط LB تجاری (شرکت سیگما) کشت داده شد و سپس برای اطمینان نهایی از سویه باکتری، در محیط TCBS[5] شرکت سیگما کشت داده شد. تشکیل کلنی‌های زرد رنگ بیانگر صحت باکتری ویبریو کلرا است. همچنین با انجام واکنش PCR از کلنی‌های زرد رنگ به دست آمده، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و مشاهده محصول تکثیریافته، صحت باکتری دریافت‌شده تأیید شد.

3. LAMP
4. Immunomagnetic Separation (IMS)
5. Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose agar

آماده‌سازی نمونه برای فیلتراسیون

۸ میلی‌لیتر آب استریل به همراه ۲ میلی‌لیتر باکتری با غلظت CFU ۱۰۹ آلوده شد، سپس با کمک فیلترهای ۰/۴۵ میکرون شرکت واتمن (قابل جداسازی)، تمام ۱۰ میلی‌لیتر نمونه آلوده‌شده از فیلتر عبور داده شد. باکتری از محیط جداسازی و تغلیظ شد و درنهایت با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ویبریو کلرا PCR، (ompW) و عملکرد آن با روش سنجش ATP مقایسه شد.

جداسازی باکتری از فیلتر

با استفاده از پنس، فیلتر از نگه‌دارنده آن جدا شد و در پتری دیش حاوی یک میلی‌لیتر بافر نمکی فسفات[6] قرار داده شد. در ادامه با کمک قاشق پلاستیکی روی فیلتر به صورت رفت و برگشت خراش داده شد. درنهایت یک میلی‌لیتر PBS حاوی باکتری در دور rpm ۹۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب باکتری به‌دست‌آمده در ۲۰۰ میکرولیتر PBS حل شد تا از این مقدار برای انجام تست PCR، ATP و کشت باکتری استفاده شود.

طراحی پرایمر و آماده‌سازی نمونه برای انجام PCR

به منظور انجام واکنش PCR پرایمرها با استفاده از نرم‌افزار Gene Runner برای ژن ompW طراحی و برای سنتز به شرکت Bioneer سفارش داده شد (جدول شماره ۱) که محصولی با اندازه bp ۴۹۸ را به وجود می‌آورد.

از هرکدام از نمونه‌های قبل و بعد از فیلتر و نمونه اولیه ۵۰ میکرولیتر جدا شد. به مدت ۲۰ دقیقه در آب جوشانده شد و به دنبال آن در ۷۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. از محلول رویی یک میکرولیتر به عنوان الگو در مخلوط PCR استفاده شد (مخلوط PCR به صورت تجمیعی "میکس" از شرکت فرمانتاز تهیه شد). در این مرحله حجم نهایی برای هر واکنش PCR، ۵ میکرولیتر در نظرگرفته شد که شامل ۲/۵ میکرولیتر از مخلوط آنزیمی (Taq DNA polymerase)، ۰/۲۵ میکرولیتر (۲/۵ میکرومولار) از هرکدام از پرایمرها و یک میکرولیتر آب استریل است. در برنامه سیکل‌های دمایی نیز واسرشته شدن حرارتی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه شامل یک چرخه و در ادامه با سی چرخه واکنش و دمای واسرشته شدن در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، اتصال پرایمرها در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، گسترش و تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و درنهایت گسترش نهایی یک چرخه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. از ترموسایکلر

6. Phosphate-Buffered Saline (PBS)

جدول ۱. توالی پرایمرهای استفاده‌شده در این تحقیق

ژن هدف	ترادف	اندازه قطعه تکثیریافته (bp)
ompW	5'CTGTATTTGCTCACCAAGAAGG3' 5'TTGGCATACCACACAGAAGC3'	۴۹۸

اپندورف نیز برای انجام واکنش استفاده شد؛ سپس محصولات واکنش در ژل یک درصد آگارز بررسی شدند.

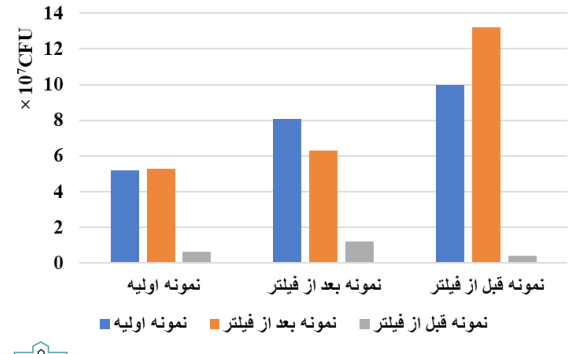
همچنین برای ارزیابی واکنش‌های PCR، در نمونه‌های کنترل مثبت از ژنوم استخراجی ویبریو کلرا با استفاده از کیت شرکت تجاری پیشگام (GeneAll) استفاده شد.

آزمون ATP و آماده‌سازی نمونه

۲۰ میکرولیتر از باکتری‌های جداشده از فیلتر را در لوله‌های پلاستیکی مخصوص دستگاه لومینومتر (اسنپ) ریخته و سپس با استفاده از کیت تشخیص ATP شرکت نوراژن پیشرو (حاوی چهار بافر) و دستگاه لومینومتر شرکت هایجینا مدل EnSURE™ میزان نشر نوری نمونه‌های قبل و بعد از فیلتر بررسی شد. روش کار به این شکل بود که ۲۰ میکرولیتر باکتری را با ۷ میکرولیتر از بافر شماره ۱، ۱۳ میکرولیتر بافر شماره ۲، ۳۵ میکرولیتر از بافر شماره ۳ و ۱۶۵ میکرولیتر از بافر شماره ۴ به ترتیب به اسنپ اضافه شد؛ سپس اسنپ به دستگاه انتقال داده شده و بعد از ۱۵ ثانیه میزان نشر نوری لومیسنانس حاصل آزاد شدن ATP از نمونه‌های لیزشده باکتری ثبت شد.

شرایط کشت باکتری برای تعیین CFU

برای تعیین غلظت باکتری از روش پور پلیت استفاده شد [۲۰]. باکتری بعد از کشت در محیط LB، قبل و بعد از فیلتر در محیط LB Agar شرکت سیگما به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد تا با اطمینان بیشتری بتوان نتایج و تفاوت بین نمونه قبل و بعد از فیلتر را نمایش داد. برای تأیید نهایی نتایج، تمامی آزمون‌ها سه‌بار تکرار شد.



تصویر ۱. آزمون کشت باکتری، تفاوت غلظت باکتری در نمونه اولیه (باکتری کشت داده شده)، قبل و بعد فیلتر در آزمایش‌های ۱ تا ۳

یافته‌ها

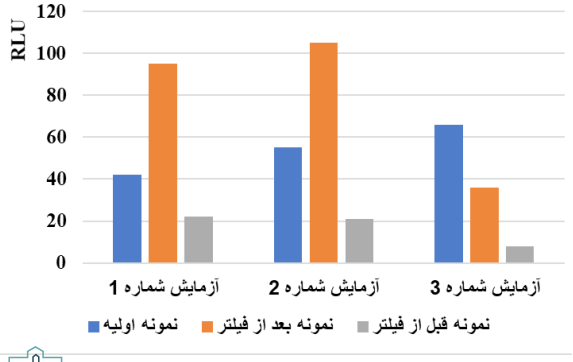
برای ارزیابی تأثیر فیلتر بر جداسازی و تغلیظ باکتری ۳ آزمایش انجام شد که با نام آزمایش ۱-۳ نام‌گذاری شد. در واقع آزمون‌های انجام‌شده هرکدام با شرایط و در روزهای متفاوت بودند ولی آزمون‌های PCR، ATP و کشت باکتریایی به طور جداگانه برای هر آزمون در یک زمان و یک روز انجام شده است؛ بنابراین نتایج آزمون‌های مشابه در کنار هم و در یک شکل نشان داده شده است.

ارزیابی عملکرد روش فیلتر با استفاده از کشت باکتریایی

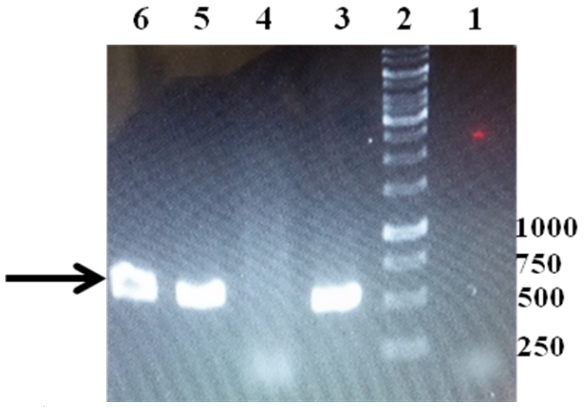
برای تأیید روش فیلتراسیون این کار سه‌بار با غلظت‌های متفاوت باکتری ویبریو کلرا انجام گرفت. نتایج مربوط به عملکرد قبل و بعد از روش فیلتراسیون با استفاده از آزمون کشت باکتری در تصویر شماره ۱ نشان داده شده است. مطابق تصویر در آزمایش شماره ۱، غلظت باکتری قبل از فیلتر برابر با CFU ۳×۱۰^۶ است اما با انجام فیلتراسیون میزان این غلظت به CFU $۵/۳\times۱۰^۷$ رسیده است.

ارزیابی عملکرد روش فیلتر با استفاده از آزمون ATP

طبق آزمایش‌های انجام‌شده و نتایج به دست آمده در تصویر شماره ۲، میزان نشر نوری در نمونه‌های بعد از فیلتر حدوداً چهار برابر



تصویر ۲. آزمون ATP، مقایسه آزمون ATP نمونه اولیه، قبل و بعد از فیلتر در آزمایش‌های ۱ تا ۳



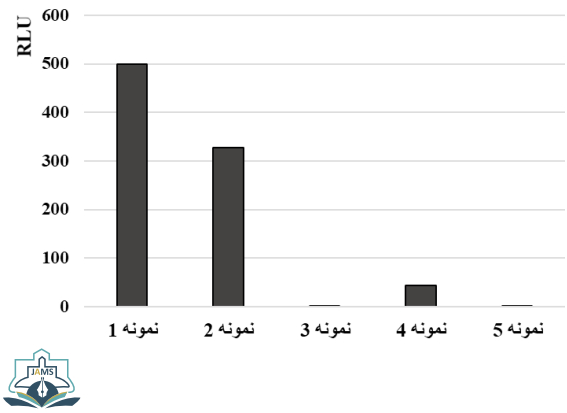
تصویر ۳. آنالیز محصول PCR با استفاده از ژل الکتروفورزآگارز یک درصد مربوط به آزمایش شماره ۲

چاهک شماره ۱: کنترل منفی (بدون ژنوم)، چاهک شماره ۲: مارکر وزنی یک کیلو جفت باز، چاهک شماره ۳: نمونه بعد از فیلتر، چاهک شماره ۴: نمونه قبل از فیلتر، چاهک شماره ۵: کلنی PCR (کنترل مثبت اول)، چاهک شماره ۶: محصول با استفاده از ژنوم استخراج شده باکتری (کنترل مثبت دوم).

نمونه‌های قبل از فیلتر به دست آمد. مطابق تصویر شماره ۲ اختلاف نشر نوری در نمونه‌های قبل و بعد از فیلتر با یکدیگر مقایسه شد.

ارزیابی عملکرد روش فیلتر با استفاده از PCR

علاوه بر آزمون‌های قبلی، روش PCR یکی دیگر از آزمایش‌های در نظر گرفته‌شده برای بررسی عملکرد و کارایی روش فیلتر در تغلیظ باکتری ویبریو کلرا بود. مطابق تصویر شماره ۳ آنالیز محصول PCR با استفاده از ژل آگاروز و الکتروفورز بررسی شد و مشاهده باند bp ۴۹۸ بیانگر تأیید آزمون مربوطه است.



تصویر ۴. تعیین حساسیت روش فیلتر با استفاده از آزمون ATP

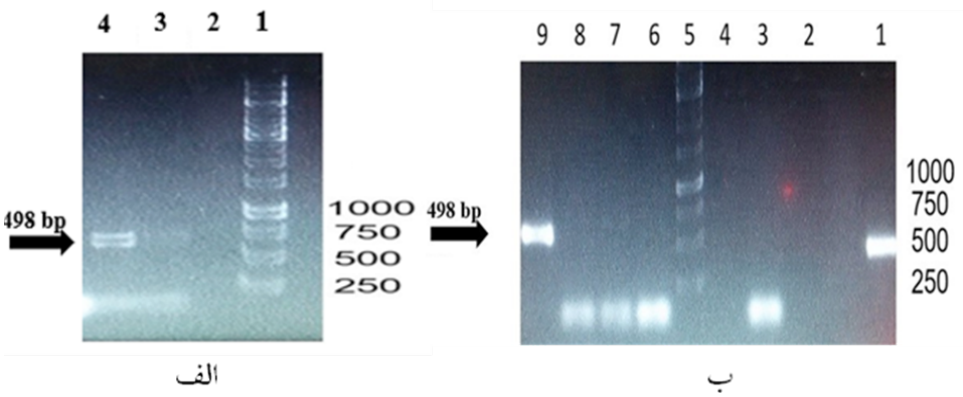
نمونه ۱=CFU ۶۰۱، نمونه ۲=CFU ۱۰۵، نمونه ۳=CFU ۱۰۴، نمونه ۴=CFU ۱۰۳، نمونه ۵=CFU ۱۰۲

تعیین حساسیت روش فیلتر با استفاده از آزمون ATP

در این آزمایش تلاش کردیم حد تشخیصی یا همان حساسیت روش فیلتر با استفاده از آزمون ATP را اندازه‌گیری کنیم. غلظت نمونه اولیه برابر با CFU ۱۰۷ بود که با ساخت سریال رقت از باکتری، به غلظت CFU ۱۰۲ رسید. بعد از انجام مراحل فیلتراسیون و آزمون ATP نتایج مطابق تصویر شماره ۴ به دست آمد. با این نتایج حساسیت تست ATP حدوداً برابر با CFU ۱۰۳ تخمین زده شد.

تعیین حساسیت روش فیلتر با استفاده از PCR

هدف این آزمایش تعیین حساسیت روش فیلتر با کمک واکنش PCR است. در تصویر شماره ۵ ژل آگاروز با واکنش‌های انجام‌شده



تصویر ۵. نتایج حاصل از PCR

الف: آنالیز محصول PCR با استفاده از ژل الکتروفورزآگارز یک درصد مربوط به نمونه‌های بعد از انجام فیلتر. چاهک شماره ۱: مارکر وزنی یک کیلو جفت بازی، چاهک شماره ۲: کنترل منفی (بدون ژنوم)، چاهک شماره ۳: محصول PCR با CFU ۱۰۱ از باکتری، چاهک شماره ۴: محصول PCR با CFU ۱۰۲ از باکتری؛ ب: آنالیز محصول PCR با استفاده از ژل الکتروفورز آگارز یک درصد مربوط به نمونه‌های فیلترنشده. چاهک شماره ۱: محصول RCP با استفاده از ژنوم استخراج‌شده باکتری (کنترل مثبت)، چاهک شماره ۲: محصول PCR با CFU ۱۰۱ از باکتری، چاهک شماره ۳: محصول RCP با UFC ۲۰۱ از باکتری، چاهک شماره ۴: محصول RCP با UFC ۳۰۱ از باکتری، چاهک شماره ۵: مارکر وزنی یک کیلو جفت بازی، چاهک شماره ۶: محصول RCP با UFC ۴۰۱ از باکتری، چاهک شماره ۷: محصول PCR با CFU ۱۰۵ از باکتری، چاهک شماره ۸: محصول RCP با UFC ۱۰۶ از باکتری، چاهک شماره ۹: محصول PCR با CFU ۱۰۷ از باکتری.

به نمایش گذاشته شده است. با مقایسه تصویرهای ۵ الف و ب که نتایج واکنش PCR نمونه‌های تغلیظ‌شده و بدون تغلیظ را نشان می‌دهند، حساسیت تکنیک فیلتر 10^1 CFU تخمین زده می‌شود.

بحث

روش‌های تغلیظ باکتری برای حذف مواد زاید و مهارکننده تست‌های تشخیصی و همچنین رفع مشکل تشخیص پاتوژن‌ها در نمونه‌های رقیق استفاده می‌شود. همان‌طور که بیان شد روش‌های تغلیظ و شناسایی مبتنی بر کشت بسیار زمان‌بر هستند. در این تحقیق از بین تمامی روش‌های تغلیظ موجود، از روش فیلتراسیون برای تغلیظ باکتری ویبریو کلرا استفاده شد. با توجه به نتایج به دست آمده در این تحقیق می‌توان روش فیلتر در تغلیظ باکتری ویبریو کلرا را روشی قابل اعتماد و کاربردی در حذف آلاینده‌ها، تغلیظ و جداسازی باکتری معرفی کرد. تأثیر فیلتر بر تغلیظ را به‌راحتی می‌توان با توجه به تصویر شماره ۱ متوجه شد. مطابق تصویر شماره ۱، در آزمایش شماره ۱ غلظت باکتری قبل از فیلتر برابر با 3×10^6 CFU است اما با انجام فیلتراسیون میزان این غلظت بیشتر شده و به $5/3\times10^7$ CFU رسیده است که خود تأییدی بر کارایی تکنیک فیلتر و تأثیر آن بر تغلیظ باکتری است. همچنین بر اساس نتایج به‌دست‌آمده مطابق با تصویر شماره ۲ میزان نشر نوری در نمونه‌های بعد از فیلتر حدوداً چهار برابر نمونه‌های قبل از فیلتر است که به‌راحتی اختلاف نشر نوری در نمونه‌های قبل و بعد از فیلتر تشخیص داده می‌شود.

در تصویر شماره ۳ نیز آنالیز محصول واکنش PCR با استفاده از ژل الکتروفورز، مرتبط با آزمایش شماره ۲ نشان داده شده است. بر این اساس در چاهک شماره ۴ که مربوط به نمونه قبل از فیلتر است، هیچ باندی مشاهده نشد اما بعد از فیلتر و انجام PCR درچاهک شماره ۳ باند ۴۹۸ bp به‌خوبی قابل مشاهده است. علاوه بر اینکه داده‌های کشت کارایی روش فیلتر را تأیید می‌کنند، نتایج حاصل از PCR نیز مکمل نتایج کشت باکتری است. تعیین حساسیت PCR هم تأیید دیگری بر این ادعاست. همان طور که در تصویر شماره ۵ مشهود است، مقادیر 10^1 CFU تا 10^2 در قبل از فیلتراسیون نمونه آلوده به باکتری توسط PCR غیرقابل تشخیص است، حال آنکه پس از فیلتراسیون و بازیافت باکتری‌ها از روی فیلتر به‌راحتی شناسایی می‌شوند.

لازم به ذکر است که مشکل اصلی روش تغلیظ با فیلتر بازیافت باکتری‌ها از فیلتر است؛ با روشی که استفاده شد، بازده بازیافت باکتری‌ها به ۱۰۰ درصد رسید (تصویر شماره ۱). در گزارش‌ها و تحقیقات قبلی نیز همین کارایی به دست آمده است. برای مثال در تحقیقی هوگ و همکارانش بر روی حذف آلودگی باکتری ویبریوکلرا از آب‌های آلوده از روش فیلتر استفاده کردند که این گروه نیز به بازده جداسازی ۱۰۰ درصد با فیلتر دست یافتند [۱۷]. در پژوهش دیگری که بورخ بر روی باکتری یرسینیا انجام داد، توانست باکتری را پس از فیلتر و انجام PCR در مدت‌زمان ۶ تا ۸ ساعت شناسایی کند [۲۱]. میساوا و همکارانش نیز برای شناسایی سویه‌های باکتری کامپیلوباکتر از نمونه مدفوع انسان، از روش فیلتراسیون به همراه روش کشت جهت تغلیظ باکتری استفاده کردند. در این تحقیق با اینکه در اثر استفاده از دو روش غنی‌سازی، حساسیت تشخیص افزایش یافته بود اما همچنان به روش کشت‌های جامد بستگی داشت و به همین دلیل در تشخیص نمونه‌ها به دو روز زمان نیاز بود [۲۲]. از دیگر روش‌های تغلیظ باکتری می‌توان به روش جذب سطحی با استفاده از نانوذرات مغناطیسی[7] اشاره کرد که هادسون و همکارانش توانسته‌اند برای جداسازی باکتری لیستریا از نمونه‌های گوشت از آن استفاده کنند و در کمتر از ۲۴ ساعت باکتری مذکور را جداسازی و با روش PCR شناسایی کنند [۲۳]. ژائو نیز از نانوذرات مغناطیسی برای جداسازی بیومس آلودگی میکروبی استفاده کرد، در این تحقیق همزمان از فیلترهای گلاس فایبر نیز استفاده شد تا کارایی جداسازی باکتری از نمونه‌های آلوده بالا رود. نتایج به‌دست‌آمده بیانگر کارایی بالای روش از هر دو جنبه حد تشخیصی و بازیافت باکتری است [۲۴]. ژانگ و همکارانش از یک روش اتوماتیکی با کارایی بالا برای تغلیظ و بازیافت باکتری ایشریشیا کولی با استفاده از روش فیلتر به کمک غشاهای سرامیک استفاده کردند و توانستند در زمان کمتر از یک ساعت به ۹۰ درصد بازیافت باکتری دست یابد [۲۵].

تمام روش‌هایی که بیان شد با هدف تغلیظ باکتری و فاصله گرفتن از محیط‌های کشت انجام شده است که می‌تواند بازدهی کار را تا حد بسیار زیادی بالا برد. در تحقیق حاضر ما با استفاده از روش فیلتراسیون و ارزیابی عملکرد آن با استفاده از سه روش شناسایی کشت باکتری، سنجش ATP و PCR توانسته‌ایم باکتری ویبریو کلرا را در مدت کمتر از سه ساعت شناسایی کنیم. همچنین حساسیت روش با استفاده از PCR در حدود ۱۰ CFU ارزیابی شد، حال آنکه با استفاده از روش سنجش ATP به حدود 10^3 CFU دست یافتیم که در مقایسه با فعالیت دیگر محققان مطلوب ارزیابی می‌شود. تورنر و همکارانش از روش سنجش ATP برای شناسایی چند باکتری آلوده‌کننده آب و مواد غذایی نظیر ایشریشیا کولی و استافیلوکوکوس اورئوس استفاده کردند و به حد تشخیصی حدود 10^2 CFU دست یافتند [۲۶]. با بررسی روش‌های جدیدتر مثل روش‌های شناسایی بر مبنای آنتی‌بادی و کیت‌هایی که بر این اساس فعالیت می‌کنند، می‌توان حساسیت کار را افزایش داد [۲۷] اما مسئله بسیار مهم ابداع و یافتن یک روش ساده است که بتوان با کمک آن با کمترین هزینه و ساده‌ترین روش حتی بدون وجود دانش در رشته زیست‌شناسی، اقدام به تغلیظ و تشخیص سریع پاتوژن‌ها کرد.

نتیجه‌گیری

در کل می‌توان نتیجه‌گیری کرد که کشت باکتری به منظور

7. Immunomagnetic Separation (IMS)

تشخیص و تغلیظ، با استفاده از روش فیلتر، حذف‌شدنی است، مخصوصاً زمانی که هدف باکتری ویبریوکلرا باشد؛ زیرا با استفاده از روشی که در این تحقیق استفاده شد، دُز عفونت‌زایی باکتری به‌راحتی قابل شناسایی است اما برای باکتری‌های حساس‌تر می‌توان از روش‌های جایگزین استفاده کرد [۲۸]. درنتیجه هدف از این تحقیق را می‌توان در دو جنبه خلاصه کرد: ۱. تغلیظ باکتری و کاهش زمان تشخیص باکتری، ۲. استفاده از روشی ساده، سریع و کم‌هزینه با حساسیت تشخیصی مناسب برای باکتری ویبریوکلرا. البته در این روش نوع فیلتر و همچنین روش‌های جداسازی باکتری از فیلتر می‌تواند تعیین‌کننده حساسیت نتایج بوده و همین نکته از مشکلات و محدودیت‌های کار نیز به حساب می‌آید. هرچند با انتخاب جنس فیلتر مناسب می‌توان تا حد بسیار بالایی این مشکل را برطرف کرد.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این مقاله از نوع فراتحلیل است و نمونه انسانی و حیوانی نداشته است.

حامی مالی

این مقاله از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نویسنده اول در گروه علوم زیستی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، شاهین‌شهر، استخراج شده است. همچنین این مطالعه توسط انستیتوی تحقیقات علوم و فناوری بیولوژیکی دانشگاه صنعتی مالک اشتر حمایت مالی شده است.

مشارکت نویسندگان

مفهوم سازی، روش‌شناسی ، نگارش - پیش‌نویس اصلی و ویرایش: مهدی زین‌الدینی؛ تحقیق: ابوالفضل مرادی.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان این مقاله تعارض منافع ندارد.

References

[1] Maheshwari M, Nelapati K, Kiranmayi B. Vibrio cholerae-a review. Vet world. 2011; 4(9):423-8. [DOI:10.5455/vetworld.2011.423-428]

[2] Faruque SM, Albert MJ, Mekalanos JJ. Epidemiology, genetics, and ecology of toxigenic Vibrio cholerae. Microbiol Mol Biol Rev. 1998; 62(4):1301-14. [DOI:10.1128/MMBR.62.4.1301-1314.1998] [PMID] [PMCID]

[3] Bharati K, Ganguly NK. Cholera toxin: A paradigm of a multifunctional protein. Indian J Med Res. 2011; 133(2):179-87. [PMID] [PMCID]

[4] Janda JM, Newton AE, Bopp CA. Vibriosis. Clin Lab Med. 2015; 35(2):273-88. [DOI:10.1016/j.cll.2015.02.007] [PMID]

[5] Page AL, Alberti KP, Mondonge V, Rauzier J, Quilici ML, Guerin PJ. Evaluation of a rapid test for the diagnosis of cholera in the absence of a gold standard. PLoS ONE. 2012; 7(5):e37360. [DOI:10.1371/journal.pone.0037360] [PMID] [PMCID]

[6] Vinothkumar K, Bhardwaj AK, Ramamurthy T, Niyogi SK. Triplex PCR assay for the rapid identification of 3 major Vibrio species, Vibrio cholerae, Vibrio parahaemolyticus, and Vibrio fluvialis. Diagn Microbiol Infect Dis. 2013; 76(4):526-8. [DOI:10.1016/j.diagmicrobio.2013.04.005] [PMID]

[7] Law JW, Ab Mutalib NS, Chan KG, Lee LH. Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens : Principles, applications, advantages and limitations. Front Microbiol. 2015; 5:770. [DOI:10.3389/fmicb.2014.00770] [PMID] [PMCID]

[8] Alam M, Sultana M, Nair GB, Siddique AK, Hasan NA, Sack RB, et al. Viable but nonculturable Vibrio cholerae O1 in biofilms in the aquatic environment and their role in cholera transmission. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007; 104(45):17801-6. [DOI:10.1073/pnas.0705599104] [PMID] [PMCID]

[9] Aulet O, Silva C, Fraga SG, Pichel M, Cangemi R, Gaudioso C, et al. Detection of viable and viable nonculturable Vibrio cholerae O1 through cultures and immunofluorescence in the Tucumán rivers, Argentina. Rev Soc Bras Med Trop. 2007; 40(4):385-90. [DOI:10.1590/S0037-86822007000400002] [PMID]

[10] Mousavi S M, Zeinoddini M, Azizi A, Saeedinia A, Monazah A. Molecular detection of zonula occludens toxin (zot) genes in Vibrio cholerae O1using PCR. Res Mol Med. 2017; 5(3):37-40. [DOI:10.29252/rmm.5.3.37]

[11] Zeinoddini M, Saeedinia AR, Sadeghi V. [Rapid Detection of Vibrio Cholerae Using Hexaplex PCR Assay (Persian)]. J Police Med. 2014; 3(2):77-84. http://jpmed.ir/article-1-216-fa.html

[12] Zeinoddini M, Saeedinia AR, Sadeghi V, Shamsara M, Hajia M, Rahbar M. Simple and accurate detection of Vibrio cholera using triplex dot blotting assay. Biomacromol J. 2015; 1(1):52-7. http://www.bmmj.org/article_12704.html

[13] Yamazaki W, Seto K, Taguchi M, Ishibashi M, Inoue K. Sensitive and rapid detection of cholera toxin-producing Vibrio cholera using a loop-mediated isothermal amplification. BMC Microbiol. 2008; 8(94):1-7. [DOI:10.1186/1471-2180-8-94]

[14] Shin HH, Seo JH, Kim CS, Hwang BH, Cha HJ. Hybrid microarray based on double biomolecular markers of DNA and carbohydrate for simultaneous genotypic and phenotypic detection of cholera toxin-producing Vibrio cholerae. Biosens Bioelectron. 2016; 79:398-405. [DOI:10.1016/j.bios.2015.12.073] [PMID]

[15] Zamani P, Sajedi RH, Hosseinkhani S, Zeinoddini M, Bakhshi B. A luminescent hybridoma-based biosensor for rapid detection of V. cholerae upon induction of calcium signaling pathway. Biosens Bioelectron. 2016; 79:213-9. [DOI:10.1016/j.bios.2015.12.018] [PMID]

[16] Zamani P, Sajedi RH, Hosseinkhani S, Zeinoddini M. Hybridoma as a specific, sensitive, and ready to use sensing element: A rapid fluorescence assay for detection of Vibrio cholerae O1. Anal Bioanal Chem. 2016; 408(23):6443-51. [DOI:10.1007/s00216-016-9762-y] [PMID]

[17] Huq A, Xu B, Chowdhury MA, Islam MS, Montilla R, Colwell RR. A simple filtration method to remove plankton-associated Vibrio cholerae in raw water supplies in developing countries. Appl Environ Microbiol. 1996; 62(7):2508-12. [DOI:10.1128/AEM.62.7.2508-2512.1996] [PMID]

[18] Wang Z, Wang J, Yue T, Yuan Y, Cai R, Niu C. Immunomagnetic separation combined with polymerase chain reaction for the detection of Alicyclobacillus acidoterrestris in apple juice. PLoS One. 2013; 8(12):e82376. [DOI:10.1371/journal.pone.0082376] [PMID] [PMCID]

[19] Chen Q, Li Y, Tao T, Bie X, Lu F, Lu Z. Development and application of a sensitive, rapid, and reliable immunomagnetic separation-PCR detection method for Cronobacter spp. J Dairy Sci. 2017; 100(2):961-9. [DOI:10.3168/jds.2016-11087] [PMID]

[20] Sanders ER. Aseptic laboratory techniques: Plating methods. J Vis Exp. 2012; (63):3064. [DOI:10.3791/3064] [PMID] [PMCID]

[21] Lantz PG, Knutsson R, Blixt Y, Al-Soud WA, Borch E, Rådström P. Detection of pathogenic Yersinia enterocolitica in enrichment media and pork by a multiplex PCR: A study of sample preparation and PCR-inhibitory components. Int J Food Microbiol. 1998; 45(2):93-105. [DOI:10.1016/S0168-1605(98)00152-4]

[22] Misawa N, Kawashima K, Kawamoto H, Kondo F. Development of a combined filtration-enrichment culture followed by a one-step duplex PCR technique for the rapid detection of Campylobacter jejuni and C. coli in human faecal samples. J Med Microbiol. 2002; 51(1):86-9. [DOI:10.1099/0022-1317-51-1-86] [PMID]

[23] Hudson JA, Lake RJ, Savill MG, Scholes P, McCormick RE. Rapid detection of Listeria monocytogenes in ham samples using immunomagnetic separation followed by polymerase chain reaction. J Appl Microbiol. 2001; 90(4):614-21. [DOI:10.1046/j.1365-2672.2001.01287.x] [PMID]

[24] Gao XL, Shao MF, Xu YS, Luo Y, Zhang K, Ouyang F, et al. Non-Selective separation of bacterial cells with magnetic nanoparticles facilitaed by varying surface charge. Front Microbiol. 2016; 7:1891. [DOI:10.3389/fmicb.2016.01891]

[25] Zhang Y, Xu CQ, Guo T, Hong L. An automated bacterial concentration and recovery system for pre-enrichment required in rapid Escherichia coli detection. Sci Rep. 2018; 8(1):17808. [DOI:10.1038/s41598-018-35970-8] [PMID] [PMCID]

[26] Turner DE, Daugherity EK, Altier C, Maurer KJ. Efficacy and limitations of an ATP-Based monitoring system. J Am Assoc Lab Anim Sci. 2010; 49(2):190-5. https://www.ingentaconnect.com/content/aalas/jaalas/2010/00000049/00000002/art00011#

[27] Noble RT, Weisberg SB. A review of technologies for rapid detection of bacteria in recreational waters. J Water Health. 2005; 3(4):381-92. [DOI:10.2166/wh.2005.051] [PMID]

[28] Schmid-Hempel P, Frank SA. Pathogenesis, virulence, and infective dose. PLoS Pathog. 2007; 3(10):1372-3. [DOI:10.1371/journal.ppat.0030147] [PMID] [PMCID]