

MOLEKULÁRIS MIKROBIOLÓGIAI VIZSGÁLATI MÓDSZEREK ALKALMAZHATÓSÁGA A VÍZIKÖZMŰVEK HACCP RENDSZERÉBEN: ELŐNYÖK ÉS LIMITÁCIÓK

KOVÁCS GÁBOR

ÁNTSZ Budapest Fővárosi Intézete,
Közegészségügyi Biológiai Laboratóriumi Osztály

Kulcsszavak: molekuláris diagnosztika, ivóvíz bakteriológia, PCR, in-situ hibridizáció

Bevezetés

A molekuláris biológiai vizsgáló módszerek idestova másfél évtizede állnak a mikrobiológiai alap- és alkalmazott kutatás homlokterében. Noha e módszerek javarészt már polgárjogot nyertek a klinikai mikrobiológiai rutin gyakorlatában is, a közegészségügyi ill. környezeti mikrobiológiai területén a molekuláris alapú módszerek bevezetésének csak csirái lehetők fel. Ennek hátterében a szabványosított módszerek hiánya mellett a szakma jelenlegi idegenkedése húzódik meg. A leggyakrabban felmerülő kritikai észrevételek a szabványosítás hiányán kívül a drága infrastruktúrát, eszközöket, a vizsgálati költségeket, illetve az ezirányú szakképzettséggel rendelkező szakemberek hiányát jelölik meg. Itt kell megjegyezni, hogy a fent felsorolt, részben jogos kifogások mellett számos érv szól a molekuláris gyorsdiagnosztikai eszközök bevezetése mellett. Amellett, hogy a környezeti mikrobiológiai területén számos új, többek között EU szabvány látott napvilágot, szemléletünkben ezek sem haladják meg a múlt század 70' éve mikrobiológiájának színvonalát! Figyelembe véve a környezetkémiaiban ugyanezen idő alatt bekövetkezett robbanásszerű metodikai fejlődést, ez a lemaradás mára már nem tartható. A jelenleg alkalmazott, főképp jogszabályban meghatározott módszerek viszonylagos lassúsága kritikus helyzetben (árvíz, vízjárványok, vízellátó rendszert érintő balesetek stb.) gyakran okoz komoly problémákat, melyeknek nem egyszer komoly költségvonzata is lelet. A klasszikus, tenyésztésen alapuló meghatározásoknak az időigényességén kívül számos más buktatója is van. A szelektív táptalajokon történő tenyésztés és ezt követő azonosítás sikere jelentősen függ a mikroba aktuális fiziológiai állapotától, amelyet pl. az ivóvíz klórozása is torzíthat. Ezért mindenképpen indokoltnak tűnik a molekuláris alapú vizsgáló módszerek legalább részbeni bevezetése.

A víziközművek által szolgáltatott ivóvíz minőségi követelményeit a nemzetközi gyakorlattal egyezően hazánkban is jogszabály rögzíti. E kormányrendelet írja elő többek között az alkalmazható mikrobiológiai vizsgálati módszerek pontos körét is. A rendelet azonban lehetőséget nyújt – az egyenértékűség meghatározott módon történő igazolása mellett – alternatív vizsgálati módszerek használatára is.

Jelen dolgozat az alkalmazható molekuláris vizsgálati módszerek körét, a teljesség igénye nélkül, előnyeiket és hátrányaikat kiemelve mutatja be.

Molekuláris módszerek az ivóvíz minősítésben

Molekuláris és PCR-alapú vizsgálati módszerek

Mára tagadhatatlan, hogy a molekuláris biológiai történetében a legnagyobb áttörést, a PCR (polimeráz láncreakció) felfedezése okozta. Alkalmazásával lehetővé vált, hogy a vizsgált genetikai állomány tetszőleges szakaszát több milliószorosára szaporíthassuk. A módszer bevezetésének hozadéka a mikrobiális taxonómia és identifikáció területén messze meghaladja a jelen dolgozat kereteit, ezért itt csak az ivóvíz-mikrobiológiai minősítése szempontjából releváns módszerek bemutatására szorítkozunk (**1 táblázat**).

1. táblázat. A víziközművek HACCP rendszerében alkalmazható molekuláris módszerek áttekintése (Simpson és msai., 2002 , valamint Scott és mtsai., 2002 nyomán)

Módszer	Leírás	Előnyök	Hátrányok
Ribotipizálás	A hasított genomiális DNS hibridizálása rRNS-specifikus próbákkal; elkülöníti	Kiváló reprodukálhatóság	Komplikált, drága és munkaigényes

Pulsed-field elektroforézis (PFGE)	a fajokat A genomi DNS „ujjlenyomat” vizsgálata ritkán hasító restriktációs enzimekkel történő kezelés utáni elektroforézissel	Rendkívül érzékeny a genetikai különbségekre Kiváló reprodukálhatóság	Esetenként túl érzékeny (faj alatti kategórák is elkülönülnek). Hosszú kivitelezési idő, adatbázis kiépítése szükséges
Denaturáló grádiens gélelektroforézis (DGGE)	A PCR termékek szétválasztása olvadáspontjuk alapján; a fajok elkülöníthetőek	Izolátumokkal dolgozhatunk	Viszonylag friss fejlesztés. Eszköz és munkaigényes. A szimultán vizsgálható minták száma csekélyebb.
Repetitív DNS szekvenciák (rep-PCR)	Palindromatikus DNS-szakaszok felszaporítása (PCR) és elektroforetikus elemzése; a fajok elkülöníthetőek	Egyszerű és gyors	Figyelembe kell venni a reprodukálhatóságot. Jelentős adatbázis kell kiépíteni. A variabilitás növeli az adatbázis nagyságát.
PCR hossz-heretogenitás (LH-PCR)	A PCR termék hossza alapján elkülöníti a gazdaspecifikus genetikai markereket	Nem igényel tenyésztést és adatbázist	Drága készülék, körülményes kivitelezhetőség.
Terminális – fragment-hossz polimorfizmus (T-RFLP)	A PCR termék specifikus hasítását követő elektroforézis. Csak a fluoreszcensen jelölt végű fragmentet detektálják	Nem igényel tenyésztést	Drága készülék, körülményes kivitelezhetőség.

Az *E. coli* és *Enterococcus*ok mint tradicionális higiéniai indikátorok kimutatása elengedhetetlen feltétele az ivóvíz minősítésnek. Az Európai Ivóvíz Irányelv (European Drinking Water Directive) e két mikrobat kiemelten kezeli. A jelenlegi szabványok szelektív táptalajon történő tenyésztést követően kevés, ún. „kulcs” biokémiai bélyeg azonosításán alapulnak, amely a részletesebb taxonómiai vizsgálatok tanúsága szerint gyakran okozhatnak téves identifikációt. A molekuláris módszerek előnye abban rejlik, hogy a kimutatás nem függ sem az alkalmazott szelektív táptalajok minőségétől, sem a mikroba adott fiziológiai állapotától. A kimutatás alapjául szolgáló célmolekula általában ún. „szematofor” (taxonómiai relevanciával rendelkező) molekula lehet, úgymint 16S és 23S rRNS ompA, gltA, stb. A vizsgálat alapelveit példaként Frahm és Obst (2003) nyomán mutatjuk be

A vízminta 100 ml-ét éjszakán át nem-szelektív pepton-levesben kell inkubálni. A sejttömeg lecentrifugálását követően proteináz K kezeléssel a sejtek feltárhatóak, majd a felülúszó használható a PCR reakcióhoz. A célmolekula 23S rRNS, amely nagyobb méreténél és variabilitásánál fogva jobban alkalmas fajra szelektív primerek és próbák tervezéséhez. A kimutatás specifitása és érzékenysége Real-Time PCR alkalmazásával növelhető. Az adott módszer a konvencionális vizsgálati módszerrel egybevetve 96% (*Enterococcus*) ill. 98% (*E. coli*) egyezést mutatott.

A módszer kétségtelen előnye a gyors – az éjszakai inkubációt követő 5 órán belüli – eredmény. Hátránya viszont hogy az eredmények nem kvantifikálhatóak. Figyelembe véve, hogy az említett mikrobák jelenléte esetén –számuktól függetlenül – az adott víz ivóvízként nem fogadható el, a módszer alkalmazható az ivóvízellátást érintő közegészségügyi veszélyhelyzet gyors feltárására és monitorozására. Real-time PCR hiányában dioxigenin-jelölt próbákat alkalmazva a módszer ELISA-leolvasóhoz is adaptálható (Frahm és msai. 2001).

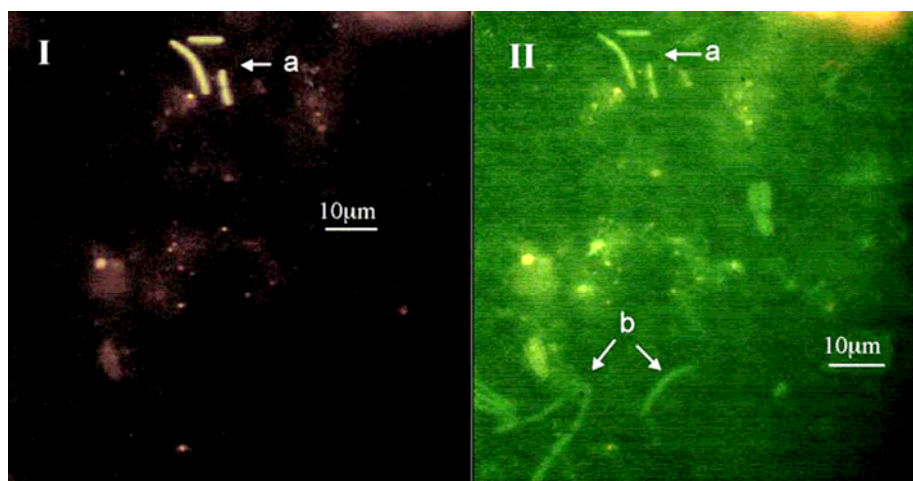
Sajátos a helyzet a coliform baktériumok kimutatása esetén. Először is tekintetbe kell vennünk, hogy a „coliform” kifejezés *nem taxonómiai kategória!* A tradicionális definíció szerint coliform csoportba tartozónak

kell tekinteni minden olyan mikrobát: amely aerob vagy fakultatív anaerob, gram-negatív, nem spóráképző, pálcá alakú baktérium, 48 órán belül 37 C°-on a laktózt sav és gázképzés mellett fermentálja. Jelenleg a definíciót kiterjesztették a β -D-galaktozidáz pozitivitásra ill. a citokróom-oxidáz negativitásra is. Ezek a bélyegek adták meg a molekuláris azonosítás célpontjait is. A PCR-alapú kimutatások a lacZ gén (β -galaktozidáz) kimutatásán alapultak. Ezt alkalmazva azonban néhány más faj nem volt kizárható. A későbbiekben a 16S rRNS *Enterobacteriaceae* specifikus szakaszának alkalmazása szerencsésebb választásnak bizonyult. Kétségtelen tény azonban hogy a szabvány szerint coliformként meghatározott baktériumok jelentékeny része taxonómiaailag igen távol áll az *Enterobacteriaceae* családtól ezért e kategóriát – noha a víz higiéniai minősítése szempontjából egy kényelmesen alkalmazható indikátor paraméter – a jövőben indokoltnak tűnne átértékelni.

A *Pseudomonas aeruginosa* kimutatása a víziközművek esetében szintén kitüntetett fontosságú. A felszíni vízre alapozott víztermelés és a vezetett vizek esetében a HACCP monitorozás során az egyike a leggyakrabban kimutatható mikrobáknak. Ez főképp annak köszönhető, hogy a vízelosztó rendszer számos pontján a *Pseudomonas*ok biofilm formájában kitapadva másodlagosan is szaporodnak. Emtiasi és mtsai. (2004) parti szűrőse kutak és a vízelosztó rendszer biofilmjeit molekuláris alapú DGGE módszerrel vizsgálva több *Pseudomonas* fajt mutattak ki. Figyelemre számot tartó megállapítás továbbá, hogy a molekuláris azonosítás az élőbevonatban több *Dechloromonas* nemzetségbe tartozó baktérium jelenlétét is igazolta. Ezek a szervezetek klórvegyületekkel respirálnak, így a biofilm más klórózásra érzékeny baktériumainak védelmet nyújthatnak. A *Pseudomonas aeruginosa* kimutatása a víziközművek HACCP pontjain így kitüntetett fontosságú lehet. Sajátos tény emellett hogy a *Ps. aeruginosa* kimutatására hivatott szabvány által leírtakat követve több, a *Pseudomonas fluorescens* – *putida* csoportba tartozó baktérium is *aeruginosa*ként határozható meg, ugyanis a szabványban leírt elkülönítő bélyegek nem diszkriminálnak kellőképpen. A *Pseudomonas aeruginosa* fajspecifikus kimutatását 23S RNS-re célzott próbákkal Real-time PCR segítségével detektálhatjuk. Megfelelően tervezett és jelölt próbákkal az *E. coli* *Enterococcus* és *Pseudomonas aeruginosa* egy mintából szimultán kimutatható.

In-situ hibridizáció

A baktériumok kimutatására szolgáló ún. fluoreszcens in-situ hibridizáció (FISH) elsősorban Rudolf Amman munkásságának köszönhetően egy évtizede került igazán az érdeklődés homlokterébe. Az eljárás kezdeti nehézségei miatt (jelentős szakértelem és munkaigényesség, számos metodikai buktató.) úgy tűnt, hogy a módszer megmarad az alap és alkalmazott kutatás szintjén. Az utóbbi 2-3 évben azonban a módszer tökéletesítése és egyszerűsítése után talán a rutin vízmikrobiológiai vizsgálatok egyik legperspektivikusabb eszköze lehet. Az eljárás lényege hogy a fluoreszcensen jelölt, fajspecifikus oligonukleotid próbát tárgylemezre fixált (vagy akár a szűrőmembránon kifejlődött) baktériumokkal reagáltatjuk. Hibridizációs termosztátba helyezve a próba csak az adott faj nukleinsavához fog specifikusan kötődni, így a felesleges próba elmosása után a sejtek a megkötött próba következtében adott színű fluoreszcenciát mutatnak. Armisen és Sevalis (2004) 16S rRNS „Colinsitu” próbával megbízhatóan mutattak ki *E. coli*-t felszíni vízből (1. ábra).



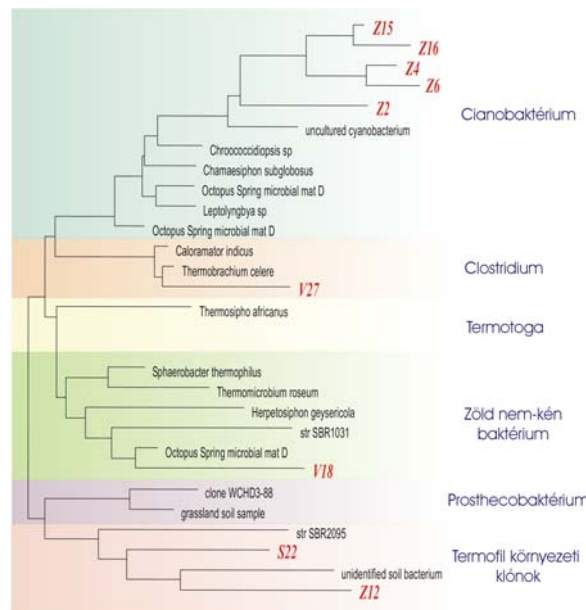
1 ábra. I. *Escherichia coli* kimutatás FISH eljárással (a) II. eubaktérium specifikus próbával az *E. coli* (a) mellett más nem *E. coli* baktériumok is láthatóak (b) Armisen és Sevalis (2004) nyomán

Jelenleg már több, kereskedelmi forgalomban is hozzáférhető, számos baktérium kimutatására alkalmas FISH kit áll rendelkezésre. A módszer jelenlegi fejlettsége mellett egy adott baktérium pontos azonosítása csak

néhány óra, a kivitelezés egyszerű, és egy fluoreszcens mikroszkópon és termosztáton kívül egyéb speciális eszközt, műszert nem igényel.

Baktériumok tenyésztés nélküli kimutatása

Az eredendően Norman Pace által kidolgozott módszer a minta nukleinsav kivonásán alapul. Ez követően a baktérium eredetű nukleinsav taxonómiai relevanciával rendelkező szakaszait pl. 16S rRNS PCR-rel szelektíven felszaporítják és azonosítják. Így keresett mikroba tenyésztés nélkül is kimutatható. A módszer kétségtelenül elegáns és lehetőséget nyújt a tenyésztésbe nem vonható ill. élő, de aktuálisan nem tenyészthető ún. „dormans” állapotban lévő baktériumok kimutatására. Kovács és Zenke (2005) a módszer segítségével az egerszalóki hévforrás mikrobaközösségét térképezte fel (**2. ábra**).



2. ábra. Az egerszalóki hévforrás vizéből származó DNS izolálásból nyert 16S rDNS szekvenciák filogenetikai pozícióját bemutató dendrogram.

Jelentős hátrány azonban, hogy alacsony abundancia mellett – márpedig az ivóvizet zömében ez jellemzi – a módszer nem megbízható illetve a keresett mikroba csak nagyobb mennyiségű (10–20 l) víz leszűrésével „fogható meg”. Ezen felül pl. a DNS jelenléte nem egyértelmű bizonyíték, hogy az egy élő baktériumból származott.

Újabb kihívások: a vírusok és az ivóvizek

A víz közvetítette vírusbetegségek köre a virológiai diagnosztika fejlődésével párhuzamosan bővül. Ezzel párhuzamosan egyre nő az igény, hogy a víziközművek HACCP rendszerében a vírusokat is figyelme vevő veszélyelemzés kidolgozásra kerüljön. Ivóvizek esetében az Enterovírusok, Rotavírusok, és újabban a Calicivírusok (Norovírus) jelentősége a kiemelendő. Figyelembe véve hogy a régebben tisztázatlan háttérűnek tartott enteritiszek 45–50%-a e két utóbbi vírus számlájára írható a fent említett igény nem meglepő. A hazai szabályozás csak a természetes fürdők esetében ír elő – opcionálisan – vírusra határértéket (enterovírusok), ezt azonban legjobb tudomásunk szerint senki nem vizsgálja. Figyelembe véve, hogy a vizsgálat kivitelezése még mindig elég körülményes, ez nem is túl meglepő. Ehlers, Garbov és Pavlov (2005) üvegyapoton történő adszorpción alapuló módszer szövettényezet közbeiktatásával RT-PCR segítségével mutattak ki kezelt és kezeletlen ivóvízből Enterovírusokat. Figyelembe véve, hogy a felszíni vizek 23-25%-ban tartalmazhatnak Enterovírusokat, ill. akár a felsőbb szakaszokon bevezetett kommunális szennyvíz esetében nagy valószínűséggel Rotavírusokat is, a vírusokra irányuló vizsgálatokat HACCP rendszer vízkivételi területre irányuló pontjain volna célszerű alkalmazni. Ennek sajnálatos módon még mindig gátat szab a kimutatásra irányuló módszerek viszonylagos kiforratlansága, bár az utóbbi években számos kereskedelmi forgalomban elérhető kit jelent meg.

Összefoglalás

A molekuláris diagnosztikai módszerek bevezetése a ivóvíz minősítés és higiéné, valamint a víziközművek HACCP rendszereibe integrálása terén a közeljövőben nagy áttörés várható. Ennek alapját az alkalmazható módszerek kiforrottsága, a jelenlegi módszerek viszonylagos avultsága, a felgyorsult szabványosítási folyamatok, és végül de nem utolsósorban az ezek mögött meghúzódó piaci törekvések képzik. A teljesség igénye nélkül felvonultatott molekuláris diagnosztikai módszerek közül egyesek, mint pl. a Real-Time PCR-en alapuló módszerek és in-situ hibridizáció más most bevezethetőek, míg mások, példának okáért a DGGE mint mindennapi rutin vizsgálatok jelenleg nehezen képzelhetők el. Mindazonáltal ez utóbbi jól alkalmazható a víziközművek kitermelési pontjainak, valamint vízelosztó hálózatának esetenkénti állapotfelmérésére, különös tekintettel a biofilmekre.

Kétségtelen tény hogy a klasszikus mikrobiológián alapuló vizsgálatokhoz képest a molekuláris kimutatási módszerek jelentősebb költségnyárral járnak, és az eredmények nem, vagy csak nehezen kvantifikálhatók. Ennek ellenére az eredmények megbízhatósága és gyorsasága mindenképpen mellettük szól. Ez az előny elsősorban a gyors reagálást igénylő veszélyhelyzetek feltárásában és nyomon követésében kamatoztatható, így jól kiegészítheti a jelenlegi bevett módszereket.

IRODALOM

- Ehlers, M.M., Grabow, W.O.K., Pavlov, D.N. (2005): Detection of enteroviruses in untreated and treated drinking water supplies in South Africa, *Water Research* 39: 2253–2258
- Emtiazi, F., Schwartz, T., Marten, S.M., Krolla-Sidenstein, P., Obst, U. (2004): Investigation of natural biofilms formed during the production of drinking water from surface water embankment filtration, *Water Research* 38: 1197–1206
- Frahm, E., Obst, E. (2003): Application of the fluorogenic probe technique (TaqMan PCR) to the detection of *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* in water samples, *Journal of Microbiological Methods* 52: 123–131
- Frahm, E., Heiber, I., Ludwig, W., Obst, U. (2001): Rapid Parallel Detection of Hygienically Relevant Microorganisms in Water Samples by PCR and Specific Hybridization in Microtiter Plates, *System. Appl. Microbiol.* 24: 423–429
- Garcia-Armisen, T., Servais, P. (2004): Enumeration of viable *E. coli* in rivers and wastewaters by fluorescent in situ hybridization, *Journal of Microbiological Methods* 58: 269–279
- Kovács, G., Zenke, P. (2005): Az egerszalóki hévforrás autochton termofil mikroba-közösségének csoport-specifikus meghatározása molekuláris módszerekkel, *Budapesti Népegészségügy XXXVI. (4):* 311–323
- Meays, C.L., Broersma, K., Nordin, R., Mazumder, A. (2004): Source tracking fecal bacteria in water: a critical review of current methods, *Journal of Environmental Management* 73: 71–79
- Romppe, A., Servais, P., Baudart, J., de-Roubin M-R., Laurent, P. (2002): Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches, *Journal of Microbiological Methods* 49: 31–54
- Stender, H., Oliveira, K., Rigby, S., Bargoot, F., Coull, J. (2001): Rapid detection, identification, and enumeration of *Escherichia coli* by fluorescence in situ hybridization using an array scanner, *Journal of Microbiological Methods* 45: 31–39