

تشخیص سریع و اختصاصی سالمونلا تیفی موریوم با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز-الایزا (PCR-ELISA)

حسن اردستانی^۱، سیدلطیف موسوی گرگوی^{۲*}، شهرام نظریان^۳، جعفر امانی^۳

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه سلوی و مولکولی، دانشگاه امام حسین(ع)، تهران، ایران

۲- دانشیار، گروه بیولوژی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

۳- کارشناس ارشد، گروه سلوی و مولکولی، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...تهران، ایران

پذیرش مقاله: ۸۶/۵/۱۰

دریافت مقاله: ۸۶/۴/۴

چکیده

هدف: سالمونلا تیفی موریوم یکی از بیماری‌ Zahای مهم غذایی است که باعث ایجاد گاستروانتریت می‌شود. در این تحقیق روش PCR-ELISA برای شناسایی سالمونلا تیفی موریوم به کار گرفته شده است.

مواد و روش‌ها: ژن *fumC* که مسئول بیوستز آنتیزن O از لیپولی‌ساکارید باکتری است، به عنوان توالی هدف انتخاب گردید. آغازگرهای تعیین شده منجر به تکثیر قطعه ۸۸۲ جفت بازی برای گونه سالمونلا تیفی موریوم شد. نمونه‌های غذایی آلوهه به باکتری سالمونلا تیفی موریوم و همچنین نمونه‌های بالینی و گونه‌های استاندارد مورد بررسی و آزمایش قرار گرفت. محصول PCR به طور تصادفی با دیگوکسیژنین نشان‌دار و به کف ظرف‌های دارای استرپتواویدین منتقل و به روش الایزا و با استفاده از آنتی‌بادی ضد دیگوکسیژنین مورد بررسی قرار گرفت. از کاوشگر داخلی نشان‌دار با بیوتین نیز برای تأیید محصول PCR استفاده گردید.

نتایج: اختصاصی بودن روش با بررسی ۲۰ نمونه سالمونلا و ۶ نمونه غیر سالمونلا ارزیابی شد که فقط نتایج گونه تیفی موریوم مثبت و بقیه گونه‌ها منفی بود. الایزا دقت و حساسیت روش PCR را تا حدود ۱۰۰۰ برابر افزایش داد.

نتیجه‌گیری: روش ارائه شده در این تحقیق با توجه به طولانی بودن روش‌های مرسوم کشت، برای تأیید وجود باکتری در نمونه‌های بالینی و غذایی می‌تواند یک شیوه تشخیصی حساس و کارآمدی برای شناسایی و غربالگری سالمونلا تیفی موریوم باشد. روش حاضر در غربالگری‌های وسیع با توجه به حساسیت بالا می‌تواند ضمن تشخیص اختصاصی‌تر، جایگزین خوبی برای PCR باشد.

کلید واژگان: سالمونلا تیفی موریوم، تشخیص سریع، PCR-ELISA

۱ - مقدمه

سالمونلا (*Salmonella typhimurium*) گونه‌ای است که باعث بروز سالمونلوز غیرحصبه‌ای یا همان مسمومیت غذایی می‌شود. از ویژگی‌های مهم این گونه توانایی آن در باقی ماندن به شکل قابل تکثیر و زنده به مدت طولانی در محیط و نمونه‌های

سالمونلا (*Salmonella*), یکی از بیماری‌ Zahای مهم غذایی برای انسان و حیوانات محسوب می‌گردد [۲، ۱] و در بسیاری از کشورها منجر به ایجاد فساد غذایی و عفونت می‌شود [۴، ۳]. در این میان، سالمونلا تیفی موریوم

ظرف‌های میکروتیتر (Microtiter plates) ایجاد کرده است. در این روش آغازگر (Primer) به همراه دیگوکسیژنین در واکنش PCR بکار رفته که منجر به ورود این ترکیبات به ساختار محصولات PCR می‌شود. محصولات تولید شده در ظرف‌های پوشیده از استرپتواویدین (Streptoavidin) (Riyxte) شده که بر اساس تمایل شدید اویدین (Avidin) و بیوتین (Biotin) به سطح ظرف می‌چسبند. در نهایت قطعه تکثیر یافته حاوی دیگوکسیژنین با کمک آنتی‌بادی ضد دیگوکسیژنین کونژوگه (Conjugated) (با آنزیم پراکسیداز (Peroxidase) شناسایی می‌شود. با توجه به اهمیت بیماری زایی سالمونلا تیفی موریوم و احتمال آلدگی مواد غذایی به این عامل ایجاد مسمومیت غذایی، در این تحقیق با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و به کمک روش PCR-ELISA تشخیص سریع باکتری سالمونلا تیفی موریوم مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که روش مذکور ابزار مهمی در تشخیص سریع نمونه‌های سالمونلا است و نسبت به شیوه‌های مرسوم، حساس‌تر می‌باشد.

۲- مواد و روش‌ها

۱-۱- تهیه گونه‌های باکتری

گونه‌های مختلف باکتری‌های استاندارد، از آزمایشگاه مرجع بیمارستان بوعلی سینا در شهر تهران تهیه شد. در این تحقیق سه گونه باکتری استاندارد از جنس سالمونلا شامل تیفی موریوم (ATCC 13311)، پاراتیفی A (ATCC 11511) و انتریتیدیس (ATCC 13076)، گونه‌های باکتری جدا شده از کشت مدفعی بیماران، شش گونه باکتری اشرشیاکلی (ATCC 25922)، شیگلا دیسانتری (ATCC 13313)، کلبسیلا پونومونیا (ATCC 75288)، پروتئوس ولگاریس (ATCC 27654) و انتروباکتر آترووجنز (ATCC 49469) مورد استفاده قرار گرفت. باکتری‌ها در محیط تریپتیکاز سوی براث (Trypticase Soy Broth: TSB) یا سوی آگار (Tripticase Soy Broth: TSB) در قالب

غذایی است [۵]. آلدگی‌های انسانی از خوردن غذاهای خام از جمله گوشت، مرغ، تخم مرغ و غذاهای روزانه بوجود می‌آید. باکتری سالمونلا تیفی موریوم از جمله گونه‌هایی است که علاوه بر انسان، میزبان‌های زیادی داشته و امکان شیوع آن بالا است [۶، ۷]. بنابراین برای سلامت غذایی، دسترسی سیستم‌های سریع، حساس و قابل اعتماد، که از لحاظ بین‌المللی قابل قبول باشد، برای تشخیص حضور یا عدم حضور بیماری‌زاها در صنعت غذایی و نیز برای نظارت‌های قانونی بسیار مهم است [۸-۱۰]. همچنین تشخیص سریع عامل بیماری‌زا در نمونه‌های بالینی و در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی نیز از دیگر مواردی است که اهمیت موضوع را مشخص می‌سازد [۱۰]. روش‌های استاندارد مبتنی بر کشت باکتری مثل ایزو ۶۵۷۹ برای تشخیص گونه‌های سالمونلا در مواد غذایی برخلاف حساس بودن، زمان بر است و نمونه‌ها بایستی ۴ تا ۵ روز در محیط غنی همچون بافر آب پیتونه (Buffered peptone water) داده شوند [۱۱-۱۳]. در سال‌های اخیر روش‌های مختلف PCR روش‌های بالقوه‌ای برای بهبود سرعت و حساسیت تشخیص گونه‌های مختلف سالمونلا، از جمله تیفی موریوم در نمونه‌های گوناگون فراهم کرده است که با تشخیص سریع تر ناقلين موجب ارتقای مدیریت محصولات غذایی شده است [۱۴، ۱۵، ۱۷-۲۰]. روش مرسوم برای شناسایی و بررسی محصولات PCR، استفاده از ژل الکتروفورز و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید (Ethidium bromide) و دورگه‌سازی (Hybridization) است که علاوه بر زمان بر بودن، از مواد سمی مانند اتیدیوم بروماید نیز در این روش استفاده می‌شود. روش (PCR-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) PCR-ELISA جایگزینی مناسب برای موارد یاد شده است؛ زیرا سرعت و حساسیت قابل قبولی را در تشخیص مقادیر اندک توالی‌های اختصاصی ژن بیماری‌زاها فراهم می‌آورد [۲۱-۲۳]. استفاده از دیگوکسیژنین (Digoxigenin)، روش تشخیصی مناسب و غیر رادیواکتیوی را برای تشخیص محصولات PCR در قالب

تشخیص مورد استفاده قرار گرفت. همچنین به روش مرسوم و متداول کشت، نمونه‌های مذکور مورد ارزیابی قرار گرفتند.

۴-۲- تخلیص DNA ژنومی از باکتری

۵ میلی‌لیتر از سلول‌های باکتری در محیط TSB را برداشته و پس از سانتریفیوژ در دور 3000 rpm رسوب حاصل با محلول لیزوزیم (Lysozyme) (Ethylene Dinitro Tetra acetic Acid) (Sodium dodecyl sulfate) SDS با استفاده از pH=۸ (pH=۸) حل و سلول‌ها با استفاده از Tris/HCl در دمای 60°C درجه سانتیگراد لیزیس (Lysis) شدند. سپس به نسبت $1/10$ حجم کل، استات سدیم 3 Molar اضافه و به مدت 20 دقیقه با دور 2500 rpm در دمای 4°C درجه سانتیگراد سانتریفیوژ گردید. اسید نوکلئیک موجود در نمونه با استفاده از محلول فنل/کلروفرم/ایزوآمیل الکل ($1/24/25$) استخراج و با ایزوپروپانول رسوب داده شد. رسوب حاوی DNA با اتانول 70% درصد شستشو و پس از خشک شدن در 20°C میکرولیتر برای TE (Tris-EDTA: Tris-HCl 10 mM , EDTA 1 mM , pH=۸) حل گردید. پس از اضافه نمودن $5 \text{ میکرولیتر آرناز (RNase A)}$ نمونه به مدت 30 دقیقه در دمای 37°C درجه سانتیگراد قرار داده شد.

۵-۲- رقت‌سازی از باکتری

از محیط کشت باکتری، 10 بار رقت‌سازی شد. سپس 100 میکرولیتر از هر رقت به مدت 10 دقیقه جوشانیده و به سرعت روی یخ سرد شد و برای مدت یک دقیقه در دور 13000 rpm سانتریفیوژ گردید. پس از آن 4 میکرولیتر از محلول رویی به عنوان الگو در واکنش PCR استفاده شد. شمارش تعداد باکتری با گسترش 100 میکرولیتر از رقت‌ها روی ظرف‌های حاوی LB آگار (Luria Bertani Agar) انجام گرفت.

(Tripticase Soy Agar) کشت داده شد (Difco). گونه‌های SPS (Difco) TSB (Difco) حاوی 0.02 درصد SPS (Sodium polyanethanol sulfonate) هارت اینفوژن براث (Brain heart infusion broth) (Difco) تلخیج و در دمای 37°C درجه سانتیگراد، به مدت 24 ساعت قرار داده شد. برای تأیید باکتری‌ها از روش‌های بیوشیمیایی و سرولوژیکی استفاده گردید.

۲-۲- آبوده‌سازی مواد غذایی

به 25 گرم از نمونه مواد غذایی (شیر)، یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون (Suspension) باکتری سالمونلا تیغی موریوم، (Colony Forming Unit/ml) CFU/ml 3×10^8 که حاوی سلول باکتری بود، اضافه و به مدت 15 دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. پس از آن 100 میکرولیتر محیط مغزی بافر آب پیتونه به هر نمونه اضافه و به مدت 2 دقیقه در یکنواخت سازنده (Homogenizer) یکنواخت گردید. سپس 100 میکرولیتر از نمونه حاصله به 5 میکرولیتر محیط برین هارت براث، تلخیج و 14 ساعت در دمای 37°C درجه سانتیگراد انکوبه شد. به رسوب حاصله از سانتریفیوژ $1/5$ میکرولیتر کشت مایع و 100 میکرولیتر ترتیون $x 100$ (Triton X100) یک درصد اضافه و به مدت 5 دقیقه جوشانده شد. نمونه حاصله پس از خنک شدن به عنوان الگو برای واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفت. همچنین از نمونه‌های غذایی بدون تلخیج جهت بررسی اختصاصیت واکنش استفاده گردید.

۳-۲- آماده‌سازی نمونه‌های مذکور

نمونه‌های مذکور جمع آوری شده از مراکز بالینی مورد استفاده قرار گرفت. بدین ترتیب که 100 میکرولیتر محیط آب پیتونه (Peptone) به هر نمونه اضافه و به مدت 12 ساعت در دمای 37°C درجه انکوبه شد. پس از آن با سانتریفیوژ دور پایین ذرات موجود در نمونه‌های مذکور جداسازی شد. سپس با سانتریفیوژ دور بالاتر سلول‌های باکتری جمع آوری و برای

PCR در ۸ و ۳۰ چرخه به طور مجزا انجام گرفت. ۵ میکرولیتر از محصول واکنش PCR درون چاهک‌های ژل ۲ درصد حاوی $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ اتیدیوم بروماید الکتروفورز شدند. به منظور تعیین اندازه محصول PCR از نشانگر $\text{bp} 100$ (ladder plus) ساخت شرکت Fermentas استفاده شد. محصول PCR بعد از الکتروفورز، زیر نور ماورای بنفش (Ultraviolet: UV) مشاهده شد و سپس تصویر ژل با استفاده از دستگاه ژل داکیومنت (Gel Document) (BioRad, Hercules) تهیه گردید.

۲-۸- شناسایی محصولات نشان‌دار شده PCR

شناسایی محصولات نشان‌دار شده با دیگوکسیژنین و با PCR-ELISA, DIG Detection استفاده از کیت شناسایی (Boehringer Mannheim, German) انجام گرفت. به این منظور، ۱۰ میکرولیتر از محصولات PCR نشان‌دار، با SSC ۹۰ میکرولیتر از محلول دورگه سازی $1X$ 0.6% (Sodium chloride-Sodium citrate Buffer) پیکومول از کاوشگر نشان‌دار مخلوط اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در 95°C درجه سانتیگراد قرار داده شد و با ایجاد رقت‌های مختلف در چاهک‌های میکروتیتر که قبلاً به وسیله استرپتواویدین پوشانده شده بود، منتقل گردید (۱۰۰ میکرولیتر از استرپتواویدین $2/5$ میکروگرم در میلی‌لیتر بافر $\text{pH}=7/4$ مولار با 0.01 (Phosphate Buffered Saline) PBS به هر چاهک اضافه گردید و در دمای 4°C درجه سانتیگراد انکوبه شد). سپس به مدت یک ساعت در دمای 65°C درجه سانتیگراد قرار گرفت تا خشک شوند. چاهک‌ها به وسیله PBS حاوی 0.05 درصد تویین (PBST) 20 (Tween) شستشو داده شدند. مقدار 100 میکرولیتر از آنتی‌بادی ضد دیگوکسیژنین نشان‌دار با پراکسیداز با رقت $1/2500$ در PBST به هر کدام از چاهک‌ها اضافه شد. پس از شستشوی مجدد، 100 میکرولیتر از محلول سوبسترا (Substrate) ($2\text{ میلی‌گرم O}-\text{فنیل دیامین (OPD)}$) در 5 میلی‌لیتر بافر سیترات فسفات با $\text{pH}=5$ به همراه

۶- ژن هدف، آغازگرها و کاوشگر مورد استفاده

ژن *rfb* که مسئول بیوسنتر آنتی‌ژن O باکتری سالمونلا است، به عنوان توالی هدف PCR انتخاب و با استفاده از نرم افزارهای 5 Oligo و DNAsis آغازگرها و کاوشگر مورد نظر طراحی و آنالیز گردید. آغازگر فرادست $(5'-\text{AGAATATGTAATTGTCAG-}3')$ و آغازگر $(5'-\text{TAACCGTTCACTAGTAGTTC-}3')$ در واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفت که منجر به تکثیر قطعه 882 جفت بازی شد. برای تأیید محصول PCR از کاوشگر طراحی شده $(5'-\text{AGTTATCAATTGATTCTGC-}3')$ استفاده گردید. این کاوشگر مکمل قسمتی از ژن *rfb* بوده و در انتهای $5'$ دارای نشان بیوتین می‌باشد. این الیگونوکلئوتیدها به وسیله شرکت Life Technologies ساخته شدند.

۷-۲- واکنش PCR

واکنش PCR برای حجم نهایی 50 میکرولیتر انجام گرفت. هر واکنش شامل 0.3 میکرومول از آغازگر، dGTP, dCTP, dATP ۱۹۰ میکرومول از یکی از نوکلئوتیدهای میکرومول از دیگوکسیژنین 10 میکرومول از dTTP، $1/5$ واحد از آنزیم Taq پلیمراز (Rosh Diagnostics)، 5 میکرولیتر از بافر $10X$ Cinnagen، $1/5$ میلی‌مolar از MgCl_2 و غلظت‌های متفاوت از DNA ژنومی بود (از 20 نانوگرم تا 0.2 پیکوگرم). در واکنشی دیگر به جای استفاده از DNA ژنومی، رقت‌های مختلفی از باکتری (از 1500 تا 1 سلول در هر واکنش) مورد استفاده قرار گرفت. نحوه اجرای هر چرخه PCR عبارت بود از: واسرشتگی (Denaturation) اولیه در دمای 94°C درجه سانتیگراد به مدت 3 دقیقه، سپس 5 تا 30 چرخه واسرشتگی در دمای 94°C درجه سانتیگراد، اتصال در دمای 60°C درجه سانتیگراد و تکثیر در دمای 72°C درجه سانتیگراد (هر یک به مدت 30 ثانیه) و نهایتاً تکثیر در دمای 72°C درجه سانتیگراد به مدت 5 دقیقه. واکنش

مورد بررسی قرار گرفت.

۳- نتایج

۱-۳- بررسی آغازگرها و کاوشگر

آنالیز ژن rfb باکتری سالمونلا تیفی موریوم نشان داد که نواحی خاصی از این ژن با سایر گونه‌های سالمونلا همخوانی ندارد؛ بنابراین آغازگرها و کاوشگر از روی این نواحی انتخاب شدند. توالی آغازگر فرادست و فرودست به ترتیب از موقعیت ۳۲-۱۵ و ۸۹۷-۸۸۰ ژن کدکننده آنتی ژن O منتج شده‌اند. کاوشگر طراحی شده در این تحقیق نیز برگرفته از توالی نوکلئوتیدی ۱۹۱-۲۰۹ ژن هدف می‌باشد. استفاده از آغازگرهای اختصاصی منجر به تکثیر قطعه ۸۸۲ جفت بازی از باکتری سالمونلا تیفی موریوم شد. برای بررسی اختصاصی بودن آغازگرهای طراحی شده از گونه‌های غیر سالمونلا و همچنین گونه‌های سالمونلای غیر تیفی موریوم استفاده شد که در نتیجه هیچ باندی بر روی ژل آگارز مشاهده نشد (شکل ۱).

حداقل DNA ژنومی سالمونلا تیفی موریوم مورد استفاده در PCR، که باند قابل رویتی روی ژل آگارز رنگ‌آمیزی شده با اتیدیوم بروماید ایجاد می‌نمود، ۲۰۰ pg بود. همچنین نتایج PCR با استفاده از حداقل ۲۵۰ سلول باکتری با ۳۰ چرخه PCR بر روی ژل آگارز قابل مشاهده بود. با اعمال ۸ چرخه PCR نیز هیچ باندی بر روی ژل آگارز مشخص نشد (شکل ۲).

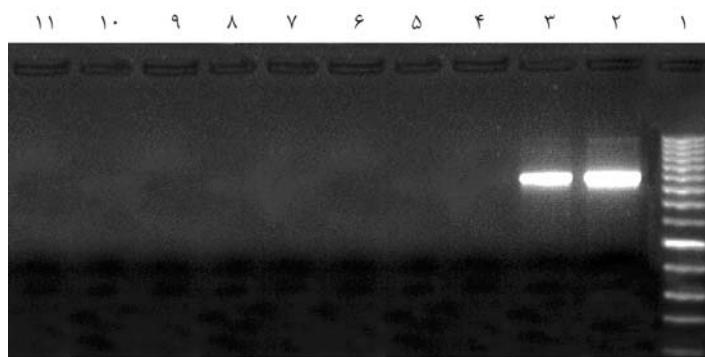
۲/۵ میکرولیتر از آب اکسیژنه (٪۳۰) به هر چاهک اضافه و به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه در اتفاق تاریک نگهداری شد. برای توقف واکنش از ۱۰۰ میکرولیتر اسید سولفوریک ۱/۵ مولار استفاده گردید. جذب نوری با استفاده از سنجش الایزا (DYNEX Technologies) (ELISA Reader) در ۴۹۰ نانومتر خوانده شد. سپس با استفاده از نتایج نورسنجی میزان سطح حداقل (cut off) تعیین گردید [۲۴].

۹-۲- بهینه‌سازی روش PCR و ELISA

برای بهینه‌سازی تکثیر قطعه ۸۸۲ جفت بازی، غلظت‌های مختلف $MgCl_2$ (۰/۵ تا ۳/۵ میلی مولار)، میزان dNTPs و همچنین دمای‌های مختلف اتصال آغازگرها (۵۸ تا ۶۲ درجه سانتیگراد) مورد بررسی قرار گرفت. در روش الایزا نیز مدت زمان انکوباسیون (Incubation) محصول PCR نشان‌دار در محلول دورگه‌سازی، میزان تویین مورد استفاده و همچنین رقت آنتی‌بادی ضد دیگوکسی‌ژنین نشان‌دار با پراکسیداز، به منظور دستیابی به بهترین نتایج آزمایش گردید.

۱۰-۲- بررسی تکرارپذیری آزمایش

آزمایش‌ها ۶ بار به طور جداگانه، در روزهای متفاوت و با شرایط یکسان انجام پذیرفت. همچنین در یک روز، آزمایش با ۶ ظرف جداگانه و مواد و شرایط یکسان انجام و نتایج



شکل ۱ بررسی اختصاصیت واکنش PCR جهت تشخیص سالمونلا تیفی موریوم

ردیف ۱: نشانگر اندازه DNA (bp) ۱۰۰ DNA ladder؛ ردیف ۲: محصول PCR ۸۸۲ جفت بازی از گونه استاندارد سالمونلا تیفی موریوم؛ ردیف ۳: محصول PCR ۸۸۲ جفت بازی از گونه جداسازی شده سالمونلا تیفی موریوم از نمونه بالینی؛ ردیف ۴-۱۱: استفاده از باکتری‌های سالمونلا پاراتیفی A، انتریتیدس، اشیرشیاکلی، شیگلا دیسانتری، کلبسیلا پونومونی، پروتوس؛ ولگاریس و انتروبیاکتر آنروجنز به عنوان الگوی PCR



شکل ۲ بررسی حساسیت واکنش PCR جهت تشخیص سالمونلا تیفی موریوم با استفاده از سلول باکتری
ردیف ۱: نشانگر اندازه DNA (bp)؛ ردیف ۷-۲: نتایج PCR رقت‌های مختلف
سلول باکتری (۱۲۵-۶۵-۲۵۰-۱۰۰۰-۵۰۰-۲۰۰۰ سلول) با اعمال ۳۰ چرخه PCR؛ ردیف ۸-۱۲: نتایج
Rقت‌های مختلف سلول باکتری (۱۲۵-۵۰۰-۲۵۰-۱۰۰۰-۲۰۰۰ سلول) با اعمال ۸ چرخه PCR

باکتری مشخص شده در مواد و روش‌ها مورد بررسی قرار گرفت. نتیجه نشان داد که میزان جذب نوری حاصل از نمونه‌های باکتری سالمونلا تیفی موریوم، بیش از حد مقادیر کنترل‌های واکنش بود؛ در حالی که جذب نوری باکتری‌های دیگر پایین‌تر از ۰٪ تعیین شد (نمودار ۴).

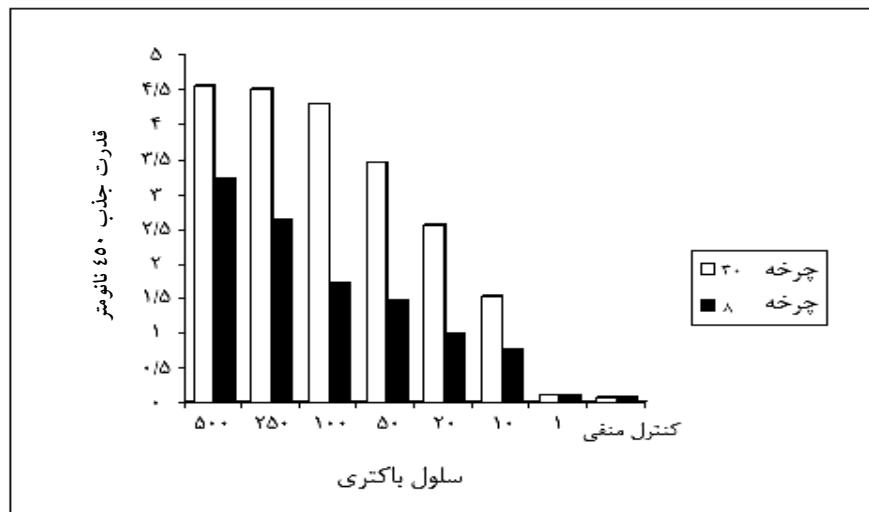
۳-۴- شناسایی سالمونلا تیفی موریوم در نمونه‌های غذایی
محصولات PCR به دست آمده از بررسی ۲۰ نمونه غذایی (شیر) آلوده شده به سالمونلا تیفی موریوم بر روی ژل آگارز و همچنین با روش دیگ-الایزا (DIG-ELISA) مورد بررسی قرار گرفت. با مقایسه نتایج به دست آمده از روش PCR-ELISA و روش تشخیص مرسوم مبتنی بر کشت میکروبی و روش‌های بیوشیمیایی، هیچ تفاوتی تشخیصی مشاهده نشد؛ اما آنچه مسلم است مدت زمان دستیابی به نتیجه روشن و دقیق در روش PCR-ELISA بکار رفته، به مراتب کمتر از روش دوم بود. همچنین نتایج PCR-ELISA نمونه‌های غذایی که، تلقیح باکتریایی در آنها صورت نگرفته بود، منفی بود (نمودار ۵).

۲-۳- حساسیت اندازه‌گیری PCR

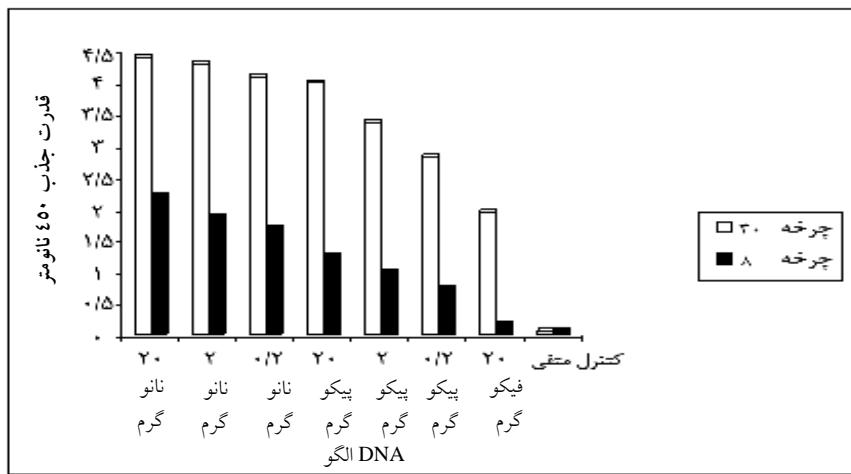
این آزمایش پایین‌ترین حد DNA ژنومی و آلودگی را، که می‌توان در محیط کشت خالص با PCR-ELISA شناسایی کرد، مشخص نمود. در این تحقیق ۱۲ رقت مختلف از DNA ژنومی و ۷ رقت از محیط کشت باکتری (از ۱ تا ۵۰۰ سلول) بررسی شد. نتایج حاصله نشان داد که حد تشخیص روش مورد استفاده برای شناسایی سالمونلا تیفی از fg ۲۰۰ از DNA ژنومی و ۱۰ سلول باکتری است. در این آزمایش میزان سطح حداقل ۰.۲٪ محاسبه گردید و در بررسی نتایج مورد استفاده قرار گفت. میزان جذب نوری (Optical Density) منتج از ۲۰۰ فیکوگرم و ۱۰ سلول باکتری، بالاتر از نقطه سطح حداقل می‌باشد. با بررسی آماری آزمون درون سنجش و بین سنجش تفاوت معنی‌داری در نتایج حاصله از تکرار آزمایش در شرایط مختلف دیده نشد (نمودارهای ۱ تا ۳).

۳-۳- اختصاصی بودن روش PCR-ELISA

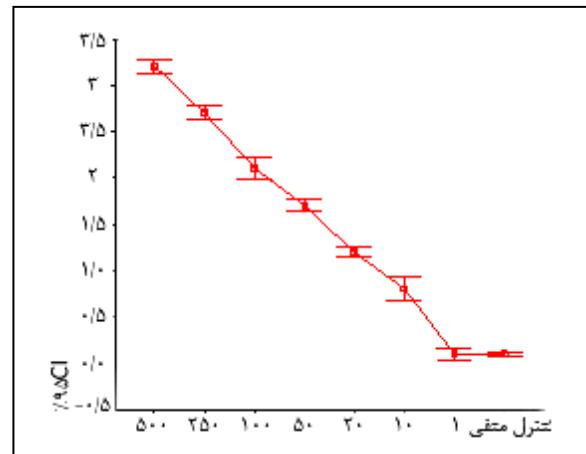
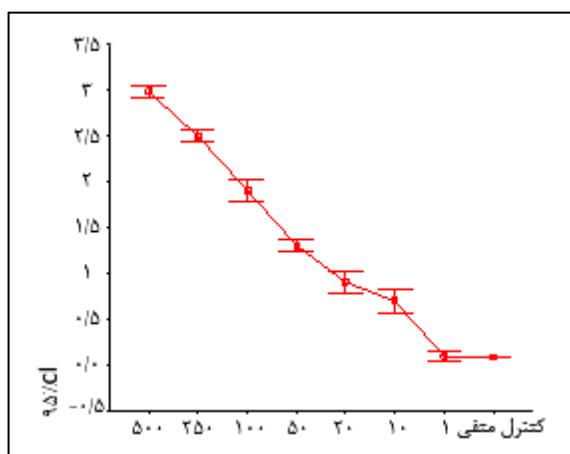
اختصاصی بودن روش تشخیصی با استفاده از گونه‌های



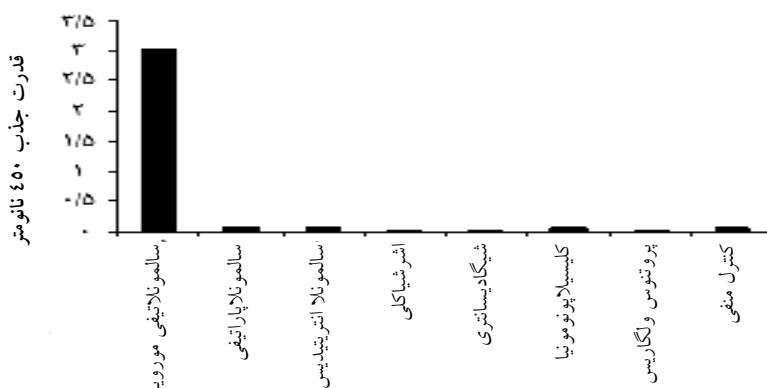
نمودار ۱ تعیین حساسیت روش PCR-ELISA با استفاده از نمونه سلول باکتری سالمونولا تیفی موریوم



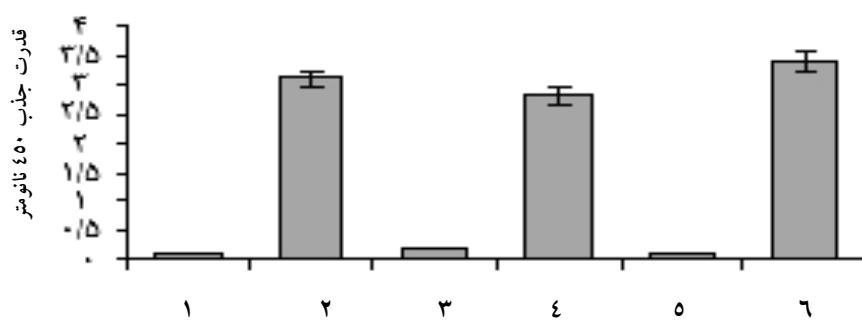
نمودار ۲ تعیین حساسیت روش PCR-ELISA با استفاده از نمونه DNA ژنومی باکتری سالمونولا تیفی موریوم



نمودار ۳ بررسی نتایج آزمون درون سنجش (۱) و برون سنجش (۲) واکنش PCR-ELISA جهت تشخیص سالمونولا تیفی موریوم بر حسب تعداد سلول باکتری با استفاده از نرم افزار SPSS 10



نمودار ۴ بررسی ویژگی روش PCR-ELISA جهت تشخیص سالمونولا تیفی موریوم



نمودار ۵ بررسی نمونه‌های مواد غذایی و نمونه بالینی جهت وجود سالمونولا تیفی موریوم به روش PCR-ELISA
 ۱- کنترل منفی واکنش؛ ۲- نتایج حاصله از بررسی نمونه‌های غذایی آلوده شده با سالمونولا تیفی موریوم؛ ۳- بررسی مواد غذایی بدون تلقیح باکتری سالمونولا تیفی موریوم؛ ۴- نمونه سالمونولا تیفی موریوم جدا شده از نمونه‌های بالینی؛ ۵- نمونه‌های بالینی سالمونولا غیر تیفی موریوم؛ ۶- کنترل مثبت (گونه استاندارد سالمونولا تیفی موریوم)

بیماری‌های دستگاه گوارشی می‌شود و اصلی‌ترین راه انتقال آن به وسیله آب، گوشت، تخم مرغ و غذاهای خام می‌باشد [۲۵-۲۷]. سالمونولوز از بیماری‌های عفونی مشترک بین انسان و دام می‌باشد و افزایش شیوع آن بین انسان و حیوان، مخصوصاً در دهه‌های اخیر، اهمیت بیماری را دو چندان می‌نماید. برای جلوگیری از آلودگی سالمونولا، برنامه‌های نظارتی و غربالی مورد نیاز است [۴-۲۰]. تشخیص باکتری سالمونولا تیفی موریوم در نمونه‌های بالینی افراد واجد گاستروانتریت (Gastroenteritis) و نمونه غذاهای مصرف شده به وسیله آنها می‌تواند کمک بزرگی در حفظ و کنترل شیوع این عامل باشد. شناسایی سالمونولاها، از جمله سالمونولا تیفی موریوم به روش‌های باکتری‌شناسی زمان‌بر بوده و به ۴ تا ۵ روز وقت

۳-۵- بررسی نمونه‌های جدا شده از کشت مدفوع
 تعداد ۲۰ نمونه کشت مدفوع آزمایشگاه‌های تشخیص طبی جمع آوری گردید و به کمک روش کشت و PCR-ELISA مورد بررسی قرار گرفتند. از این تعداد به روش کشت میکروبی، ۷ مورد مثبت گزارش شد. با بررسی نمونه‌ها به روش PCR-ELISA نیز مجموعاً ۷ مورد سالمونولا تیفی موریوم شناسایی و تأیید گردید (نمودار ۵).

۴- بحث

سالمونولا تیفی موریوم یکی از مهم‌ترین گونه‌های سالمونولا است که انگل درون سلولی اختیاری بوده و از راه غشاهای مخاطی به میزبان حمله می‌کند [۵]. این باکتری سبب ایجاد

کاهش یافته است. همچنین فرایند تشخیص با استفاده از روش آلوده‌سازی نمونه‌های مواد غذایی نیز موفقیت‌آمیز بود که گامی مؤثر در فرایند کاربردی نمودن روش تشخیص PCR-ELISA در صنایع غذایی و مراکز کنترل کیفی کشور می‌باشد. در تحقیق دیگری نیز که بر روی نمونه‌های مدفعه انجام گرفت، امکان استفاده از این روش در تشخیص مستقیم ویبریوکلرا (*Vibrio cholerae*) در نمونه‌های بالینی در ایران به اثبات رسید [۳۳].

مالورنی (Malorny) و همکاران نیز از نمونه‌های گوشتی که به روش مصنوعی با سالمونلا آلوده شده بود، برای بررسی تشخیص به روش PCR استفاده کردند [۱۰]. همچنین گیلبرت (Gilbert) و همکاران نیز چنین روشی را برای نمونه‌های غذایی شامل میوه، سبزی و محصولات لبنی بکار برdenد. در تحقیق آنها نیز نتایج حاصله از روش کشت باکتری از نمونه‌های آلوده شده و روش PCR همخوانی کاملی با هم داشت. ضمناً آنها نیز سرعت بیشتر روش PCR در مقایسه با کشت میکروبی را در چنین فرایندی تأیید کردند [۳۴].

پیرل (Perelle) و همکاران برای شناسایی نمونه‌های سالمونلا در شیر و گوشت از PCR-ELISA و Real time PCR استفاده نمودند. ژن *invA* که در جنس سالمونلا مشترک است، به عنوان توالی هدف انتخاب شده بود. وی و همکارانش توانستند حداقل ۱۰ باکتری از کشت خالص سالمونلا را در هر واکنش PCR شناسایی کنند [۲۰]. مالورنی و همکارانش با روش Real time PCR و استفاده از نمونه‌های غذایی آلوده شده در هر واکنش PCR، حداقل ۵ سلول باکتری سالمونلا را شناسایی کردند [۳۵]. اما باید توجه داشت که روش Real time PCR به علت استفاده از مواد فلورسنت در مقایسه با PCR-ELISA گرانتر و پرهزینه‌تر است؛ ضمن آنکه از لحاظ اختصاصی بودن و حساسیت نیز تفاوت آشکاری با روش PCR-ELISA ندارد.

در تحقیق لوك (Luck) و همکاران از ژن *rfbS* لیپوپلی‌ساکارید (Lipopolysaccharide) برای غربالگری نمونه‌های مدفعه و تشخیص سریع گروه D سالمونلا استفاده

نیاز دارد؛ مخصوصاً هنگامی که تعداد نمونه‌های مورد بررسی زیاد باشد، این نقاط ضعف بیشتر آشکار می‌شود [۲۸، ۱۵، ۲۹]. در سال‌های اخیر روش‌های تشخیص مولکولی برای شناسایی و بررسی گونه‌های باکتری‌ها، از جمله سالمونلا ابداع گردیده است که روش PCR از آن دسته می‌باشد [۳۰، ۱۴، ۳۱]. این گونه روش‌ها سریع و حساس بوده، بنابراین کمک بسیار زیادی در زمینه کنترل آلودگی محسوب می‌شوند. روش PCR با وجود متداول بودن آن، معایبی از جمله استفاده از اتیدیوم بروماید برای آشکارسازی محصولات تکثیر شده را دارد.

PCR-ELISA توانسته بسیاری از محدودیت‌های موجود و معایب روش‌های دیگر، از جمله PCR مرسوم و متداول را مرتفع سازد. این روش اختصاصی و سریع بوده و می‌تواند مدیریت کیفیت محصولات غذایی را در مقایسه با روش‌های باکتری‌شناسی بهبود بخشد. از ویژگی‌های بارز این روش تشخیصی می‌توان به امکان آنالیز هم‌زمان تعداد زیاد نمونه‌ها با استفاده از میکروظرف‌های ۹۶ خانه اشاره کرد که به خصوص در زمان شیوع همه‌گیری‌ها بسیار کاربرد خواهد داشت [۲۰-۲۲]. در این مقاله برای شناسایی سالمونلا تیغی موریوم، که یکی از عوامل ایجاد کننده مسمومیت‌های غذایی است، از روش PCR-ELISA استفاده شد. ژن کد کننده آنتی ژن O باکتری سالمونلا تیغی موریوم به عنوان توالی هدف انتخاب گردید که عدم واکنش متقاطع سایر گونه‌های بکار گرفته شده با آغازگرهای مورد استفاده، اختصاصی بودن روش و توالی ژنی هدف را تأیید نمود.

در تحقیقی که به وسیله همین گروه بر روی شناسایی سالمونلا تیغی موریوم به روش PCR-ELISA انجام گرفت، حد تشخیص روش ۲/۵ پیکوگرم از DNA ژنومی و تعداد ۲۰ سلول باکتری تعیین گردید. همچنین از روش آلوده‌سازی نمونه مواد غذایی نیز استفاده نشده بود [۲۷-۳۲]. اما نتایج حاصله از تحقیق کنونی، در مقایسه با گزارش قبلی، حساسیت بیشتری را نشان می‌دهد؛ به گونه‌ای که کمترین مقدار تشخیص به ۱ نانوگرم از DNA ژنومی و ۱۰ سلول باکتری

ارزیابی قرار داد؛ از این رو زمان تشخیص را می‌توان به مدت یک ساعت کاهش داد، ضمناً اینکه استفاده موادی مانند dNTPs، آغازگرها و آنزیم Taq پلی‌مراز به حداقل می‌رسد. ارزیابی بیشتر نتایج PCR-ELISA نسبت به ژل آگارز PCR-ELISA مشخص نمود که حساسیت اندازه گیری PCR-ELISA ۱۰۰۰ برابر بیشتر از الکتروفورز ژل آگارز است؛ این در حالی است که در تحقیق قبلی افزایش حساسیت ۱۰۰ برابری PCR-ELISA تجربه شده بود. به طور خلاصه، روش اختصاصی بودن و حساسیت بالایی داشته و استفاده از آن به جای الکتروفورز، به میزان زیادی حساسیت اندازه گیری را افزایش می‌دهد. همچنین قابلیت ماشینی کردن روش‌های PCR و ELISA، با تجهیزات اتوماتیک، استفاده از این روش را برای آزمایش نمونه‌های زیاد با سرعت و اختصاصی بودن بالا فراهم می‌نماید.

شد. حد تشخیص این تحقیق نیز شناسایی ۱۰ باکتری در هر نمونه بود که با نتایج این بررسی همخوانی دارد [۳۶]. همچنین مانازو (Manazo) توانست حساسیت روش PCR-fg ELISA را برای شناسایی سالمونولا در نمونه غذایی به ۴/۵ کاهش دهد که بالاترین حساسیت تشخیص گزارش شده سالمونولا به روش PCR و PCR-ELISA است [۳۷].

برای کاهش زمان تشخیص، همان‌طور که در نتایج گزارش‌های قبلی نیز اشاره شده، مدت زمان اجرای برنامه زمانی PCR به کمترین میزان کاهش یافت [۳۸]. همچنین نتایج محصول به‌دست آمده از ۸ و ۳۰ چرخه PCR نیز با روش ELISA بررسی شد. هرچند محصول مذکور از ۸ چرخه PCR در ژل آگارز قابل رؤیت نمی‌باشد، ولی این محصول از طریق ELISA کاملاً قابل شناسایی است. بنابراین می‌توان فقط با اعمال ۸ چرخه محصول به‌دست آمده را مورد

۵- منابع

- [1] HumpHrey T. Public-health aspects of *Salmonella* infection, Way C, Way A, (ed.), *Salmonella in domestic animals*. Oxon, UK, CABI Publishing, 2000; p: 245–63.
- [2] Davies RH, Hinton MH. *Salmonella in animal feed*, Wray C, Wray A (ed.), *Salmonella in domestic animals*. England, CABI, Wallingford, 2000; P: 285–300.
- [3] Keusch GT. Systemic gastro-intestinal infections: a clinical overview. In Sussman M (ed.). *Molecular Medical Microbiology*. 2nd ed. San Diego, Academic Press, 2002; p: 1357–63.
- [4] Wallace DJ, VanGilder T, Shallow S, Fiorentino T, Segler SD, Smith KE, Shiferaw B, Etzel R, Garthright WE, Angulo FJ. Incidence of foodborne illnesses reported by the foodborne diseases active surveillance network (FoodNet)-1997. FoodNet Working Group. *J Food Prot* 2000; 63: 807–9.
- [5] Skjolaas KA, Burkey TE, Dritz SS, Minton JE. Effects of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium (ST) and Choleraesuis (SC) on chemokine and cytokine expression in swine ileum and jejunal epithelial cells. *Vet Immunol Immunopathol* 2006; 111(3-4): 199-209.
- [6] D'Aoust AY. Pathogenecity of food-borne *Salmonella*. *Int J Food Microbiol* 1991; 12: 14–70.
- [7] Hassan SR, Verma V Qazi GN. Rapid detection of *Salmonella* by polymerase chain reaction. *Mol Cell Probes* 2004; 18: 333–9.
- [8] Makino S, Kurazono H, Chongsanguam M, Hayashi H, Cheun H, Suzuki S, Shirahata T. Establishment of the PCR system specific to *Salmonella* spp. and its application for the inspection of food and faecal samples. *J Vet Med Sci* 1999; 61: 1245–7.
- [9] Malorny B, Hoofar J, Bunge C, Helmuth R. Multicenter validation of the analytical accuracy of *Salmonella* PCR: towards an international standard. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69: 290-6.
- [10] Malornya B, Hoofar J, Hugas M, Heuvelink A, Fache P, Ellerbroeka L, Bungea C, Dorna C, Helmutha R. Interlaboratory diagnostic accuracy

- of a *Salmonella* specific PCR-based method. *Int J Food Microbiol* 2003; 89: 241–9.
- [11] Anonymous Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs—Horizontal Method for the Detection of *Salmonella* (ISO 6579:1993). International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland, 1993.
- [12] Lofstrom C, Knutsson R, Axelsson C, Radstrom P. Rapid and specific detection of *salmonella* spp. in animal feed samples by PCR after culture enrichment. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70(1): 69–75.
- [13] Van der Zee H, Huis in't Veld JHJ. Methods for the rapid detection of *Salmonella*. In *Salmonella* in Domestic Animals, Wray C, Wray A(ed.), Wallingford, UK, CABI Publishing, 2000; p: 373–91.
- [14] Bohaychuk VM, Gensler GE, McFall ME, King RK, Renter DG. A real-time PCR assay for the detection of *Salmonella* in a wide variety of food and food-animal matrices. *J Food Prot* 2007; 70(5): 1080-7.
- [15] Warren BR, Yuk HG, Schneider KR. Detection of *salmonella* by flow-through immunocapture real-time PCR in selected foods within 8 hours. *J Food Prot* 2007; 70(4): 1002-6.
- [16] Jofré A, Martín B, Garriga M, Hugas M, Pla M, Rodríguez-Lázaro D, Aymerich T. Simultaneous detection of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* by multiplex PCR in cooked ham. *Food Microbiol* 2005; 22: 09-115.
- [17] Pathmanathan SG, Cardona-Castro N, Saúchez-Jiménez MM, Correa-Ochoa MM, Puthucheary SD, Thong KI. Simple and rapid detection of *Salmonella* strains by direct PCR amplification of the *hilA* gene. *J Med Microbiol* 2003; 52: 773–6.
- [18] Eyigor A, Carli KT, Unal CB. Implementation of real-time PCR to tetrathionate broth enrichment step of *Salmonella* detection in poultry. *Lett Appl Microbiol* 2002; 34: 37–41.
- [19] Chen S, Yee A, Griffiths M, Larkin C, Yamashiro CT, Behari R, Paszko-Kolva C, Rahn K, De Grandis SA. The evaluation of a fluorogenic polymerase chain reaction assay for the detection of *Salmonella* species in food commodities. *Int J Food Microbiol* 1997; 35: 239–250.
- [20] Perelle S, Dilasser F, Malorny B, Grout J, Hoorfar J, Fach P. Comparision of PCR-ELISA and LightCycler real-time PCR assays for detecting *Salmonella* spp. In milk and meat samples. *Mol Cell Probes* 2004; 18: 409-20.
- [21] Hong Y, Berrang ME, Liu T, Hofacre CL, Sanchez S, Wang L, Maurer1 JJ. Rapid Detection of *Campylobacter coli*, *C. Jejuni*, and *Salmonella enterica* on Poultry Carcasses by using PCR–enzyme-linked immunosorbent assay. *Appl Environ Microbiol* 2003; 6: 3492-9.
- [22] Ge B, Zhao S, Hall R, Meng J. A PCR-ELISA for detecting Shiga toxin - producing *Escherichia coli*. *Microbes Infect* 2002; 4: 285–90.
- [23] Sails AD, Bolton FJ, Fox AJ, Wareing DRA, Greenway DLA. Detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in environmental waters by PCR enzyme-linked immunosorbent assay. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68(3): 1319–24.
- [24] International Organisation for Standardization. Microbiology-general guidance on methods for the detection of *Salmonella* (Revision of 2nd edition, ISO 6579, 1990) Draft International Standards ISO/DIS 6579; 1991.
- [25] Tirado C, Schmidt K. WHO surveillance programme for control of foodborne infections and intoxications: results and trends across greater Europe. *J Infect* 2001; 43: 80–4.
- [26] Rychlik I, Kesteren van L, Cardova L, Svestkova A, Martinkova R, Sisak F. Rapid detection of *Salmonella* in field samples by nested polymerase chain reaction. *Lett Appl Microbiol* 1999; 29: 269–72.
- [27] Baumler AJ, Hargis BM, Tsolis RM. Tracing the origins of *Salmonella* outbreaks. *Science* 2000; 287: 50–2.
- [28] Hirose K, Itoh K, Nakajima H, Kurazono T, Yamaguchi M, Moriya K, Ezaki T, Kawamura Y,

- Tamura K, Watanabe H. Selective amplification of *tyv* (*rfbE*), *prt* (*rfbS*), *viaB*, and *fliC* genes by multiplex PCR for identification of *Salmonella enterica* serovars *TypHi* and *ParatyphHi A*. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 633-6.
- [29] Touron A, Berthe T, Pawlak B, Petit F. Detection of *Salmonella* in environmental water and sediment by a nested-multiplex polymerase chain reaction assay. *Res Microbiol* 2005; 156: 541-53.
- [30] Feder I, Nietfeld JC, Galland J, Yeary T, Sargeant JM, Oberst R, Tamplin ML, Luchansky JB. Comparison of cultivation and PCR hybridization for detection of *Salmonella* in porcine fecal and water samples. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 2477-84.
- [31] Marsh P, Morris NZ, Wellington EMH. Quantitative molecular detection of *Salmonella* typHimurium in soil and demonstration of persistence of an active but non-culturable population. *FEMS Microbiol Ecol* 1998; 27: 351-63.
- [32] Mousavi ML, Salimiyan J, Karimi A, Amani J, Nazarian Sh, Ardestani H. A rapid and specific PCR-ELISA for detecting *Salmonella* typHi. *Iranian Journal of Clinical Infectious Diseases* 2006; 1(3): 113-9.
- [۳۳] احمدی شهرام، موسوی میرلطیف، سروی رحیم، سلیمانی جعفر، کریمی راهجردی احمد، نظریان شهرام، امانی جعفر. تشخیص سریع ویبریو کلرا O1 با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز-الایزا (PCR-ELISA). *مجله پژوهشکی کوثر*. ۱۳۸۵؛ ۱ (۱۱): ۴۰-۵۰.
- [34] Gilbert C, Winters D, O'Leary A, Slavik M. Development of a triplex PCR assay for the specific detection of *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157:H7. *Mol Cell Probes* 2003; 17: 135-8.
- [35] Malorny B, Paccassoni E, Fach P, Bunge C, Martin A, Helmuth R. Diagnostic real-time PCR for detection of salmonella in food. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70(12): 7046-52.
- [36] Luk JM, Konguang U, Tsang RS, Lindberg AA. An enzyme-linked immunosorbent assay to detect PCR products of the *rfbS* gene from Serogroup D *Salmonellae*: a rapid screening prototype. *J Clin Microbiol* 1997; 35(3): 714-8.
- [37] Manzano M, Cocolin L, Astori G, Pipan C, Botta GA, Cantoni C, Comi G. Development of a PCR microplate-capture hybridization method for simple, fast and sensitive detection of *Salmonella* serovars in food. *Mol Cell Probes* 1998; 12: 227-34.
- [38] Mousavi SL, Nazarian Sh, Amani J, Karimi Rahgerdi A. Rapid screening of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 strains from south Iran with PCR-ELISA. *IBJ* 2008; 12(1): 15-21.