مجله علوم پزشکی مدرس
دوره ۱۰، شماره ۱: از ۵۱-۶۲
بهار ۱۳۸۶

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

حسن اردستانی[۱]، سیدلطیف موسوی‌گرگری[۲*]، شهرام نظریان[۳]، جعفر امانی[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه سلولی و مولکولی، دانشگاه امام حسین(ع)، تهران، ایران
۲- دانشیار، گروه بیولوژی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران
۳- کارشناس ارشد، گروه سلولی و مولکولی، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...تهران، ایران

دریافت مقاله: ۸۶/۴/۴ پذیرش مقاله: ۸۶/۵/۱۰

چکیده

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

مواد و روش‌ها: ژن rfb، که مسئول بیوسنتز آنتی‌ژن O از لیپوپلی‌ساکارید باکتری است، به عنوان توالی هدف انتخاب گردید. آغازگرهای تعیین شده منجر به تکثیر قطعه ۸۸۲ جفت بازی برای گونه سالمونلا تیفی‌موریوم شد. نمونه‌های غذایی آلوده به باکتری سالمونلا تیفی‌موریوم 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 ٦ نمونه غیر سالمونلا ارزیابی شد که فقط نتایج گونه تیفی‌موریوم 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 تیفی‌موریوم باشد. روش حاضر در غربالگری‌های وسیع با توجه به حساسیت بالا می‌تواند ضمن تشخیص اختصاصی‌تر، جایگزین خوبی برای PCR باشد.

کلید واژگان: سالمونلا تیفی‌موریوم، تشخیص سریع، PCR-ELISA.

۱- مقدمه

سالمونلا (Salmonella)، یکی از بیماری‌زاهای مهم غذایی برای انسان و حیوانات محسوب می‌گردد [۲،۱] و در بسیاری از کشورها منجر به‌ایجاد فساد غذایی و عفونت می‌شود [٤،۳]. در این میان، سالمونلا تیفی‌موریوم (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

***نشانی مکاتبه:** تهران، بزرگراه تهران قم، روبروی حرم امام خمینی(ره)، دانشگاه شاهد، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی E-mail: slmousavi@shahed.ac.ir

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-05-17]

غذایی است [۵]. آلودگی‌های انسانی از خوردن غذاهای خام از جمله گوشت، مرغ، تخم‌مرغ و غذاهای روزانه بوجود می‌آید. باکتری سالمونلا تیفی‌موریوم از جمله گونه‌هایی است که علاوه بر انسان، میزبان‌های زیادی داشته و امکان شیوع آن بالا است [۷،٦]. 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 ٦٥٧٩ برای تشخیص گونه‌های سالمونلا در مواد غذایی برخلاف حساس بودن، زمان‌بر است و نمونه‌ها بایستی٤ تا ٥ روز در محیط غنی همچون بافر آب پپتونه (Buffered peptone water) و محیط آگار انتخابی کشت داده شوند [۱۱-۱۳]. در سال‌های اخیر روش‌های مختلف PCR روش‌های بالقوه‌ای برای بهبود سرعت و حساسیت تشخیص گونه‌های مختلف سالمونلا، از جمله تیفی‌موریوم در نمونه‌های گوناگون فراهم کرده است که با تشخیص سریع‌تر ناقلین موجب ارتقای مدیریت محصولات غذایی شده است [۱۷،۱۵،۱٤-۲۰]. 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 زمان‌بر بودن، از مواد سمی مانند اتیدیوم بروماید نیز در این روش استفاده می‌شود. روش PCR-ELISA (PCR-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 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 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 می شود. محصولات تولید شده در ظرف‌های پوشیده از استرپتواویدین (Streptoavidin) ریخته 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 بیماری‌زایی سالمونلا تیفی‌موریوم و احتمال آلودگی 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 تیفی‌موریوم 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

۲-۱- 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 تیفی‌موریوم (ATCC 13311)، پاراتیفی A (ATCC 11511) و انتریتیدیس(ATCC 13076)، گونه‌های باکتری جدا شده از کشت مدفوع بیماران، شش گونه باکتری اشرشیاکلی (ATCC 25922)، شیگلا دیسانتری (ATCC 13313)، کلبسیلا پونومونیا (ATCC 75288)، پروتئوس ولگاریس (ATCC 27654) و انتروباکتر آئروجنز (ATCC 49469) مورد استفاده قرار گرفت. باکتری‌ها در محیط تریپتیکاز سوی براث (Tripticase Soy Broth: TSB) یا سوی آگار

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-05-17]

(Tripticase Soy Agar) کشت داده شد (Difco). گونه‌های سالمونلا به محیط TSB (Difco) حاوی ۰/۰۲ درصد SPS (Sodium polyanethanol sulfonate) و محیط برین هارت اینفوژن براث (Brain heart infusion broth) (Difco) تلقیح و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، به مدت ۲٤ ساعت قرار داده شد. برای تأیید باکتری‌ها از روش‌های بیوشیمیایی و سرولوژیکی استفاده گردید.

۲-۲- آلوده‌سازی مواد غذایی

به ۲۵ گرم از نمونه مواد غذایی(شیر)، یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون (Suspension) باکتری سالمونلا تیفی‌موریوم، که حاوی ۳×۱۰^{۸} CFU/ml (Colony Forming Unit/ml) سلول باکتری بود، اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. پس از آن ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط مغزی بافر آب پپتونه به هر نمونه اضافه و به مدت ۲ دقیقه در یکنواخت سازنده (Homogenizer) یکنواخت گردید. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه حاصله به ۵ میلی‌لیتر محیط برین هارت براث، تلقیح و ١٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد. به رسوب حاصله از سانتریفیوژ ۱/۵ میلی‌لیتر کشت مایع و ۱۰۰ میکرولیتر ترتیون x۱۰۰ (Triton X100) یک درصد اضافه و به مدت ۵ دقیقه جوشانده شد. نمونه حاصله پس از خنک شدن به عنوان الگو برای واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفت. همچنین از نمونه‌های غذایی بدون تلقیح جهت بررسی اختصاصیت واکنش استفاده گردید.

۲-۳- آماده‌سازی نمونه‌های مدفوعی

نمونه‌های مدفوع جمع‌آوری شده از مراکز بالینی مورد استفاده قرار گرفت. بدین ترتیب که ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط آب پپتونه (Peptone) به هر نمونه اضافه و به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شد. پس از آن با سانتریفیوژ دور پایین ذرات موجود در نمونه‌های مدفوع جداسازی شد. سپس با سانتریفیوژ دور بالاتر سلول‌های باکتری جمع‌آوری و برای تشخیص مورد استفاده قرار گرفت. همچنین به روش مرسوم و متداول کشت، نمونه‌های مدفوع مورد ارزیابی قرار گرفتند.

۲-٤- تخلیص DNA ژنومی از باکتری

۵ میلی‌لیتر از سلول‌های باکتری در محیط TSB را برداشته و پس از سانتریفیوژ در دور ۳۰۰۰ rpm، رسوب حاصل با محلول لیزوزیم (Lysozyme) (۱ میلی‌گرم لیزوزیم در ۰/۱۵ مولار NaCl و EDTA (Ethylene Dinitro Tetra acetic Acid) با pH=۸) حل و سلول‌ها با استفاده از SDS (Sodium dodecyl sulfate) یک درصد و محلول ۰/۱ مولار NaCl و ۰/۱ مولار (pH=۸) Tris/HCl در دمای ٦۰ درجه سانتیگراد لیز (Lysis) شدند. سپس به نسبت ۱/۱۰ حجم کل، استات سدیم ۳ مولار اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه با دور rpm۲۵۰۰ در دمای ٤ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ گردید. اسید نوکلئیک موجود در نمونه با استفاده از محلول فنل/کلروفرم/ایزوآمیل الکل (۱/۲٤/۲۵) استخراج و با ایزوپروپانل رسوب داده شد. رسوب حاوی DNA با اتانول ۷۰ درصد شستشو و پس از خشک شدن در ۲۰ میکرولیتر بافر TE (Tris-EDTA: Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH= ۸) حل گردید. پس از اضافه نمودن ۵ میکرولیتر آرناز (RNase A) نمونه به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد.

۲-۵- رقت‌سازی از باکتری

از محیط کشت باکتری، ۱۰ بار رقت‌سازی شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت به مدت ۱۰ دقیقه جوشانیده و به سرعت روی یخ سرد شد و برای مدت یک دقیقه در دور rpm۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. پس از آن ٤ میکرولیتر از محلول رویی به عنوان الگو در واکنش PCR استفاده شد. شمارش تعداد باکتری با گسترش ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌ها روی ظرف‌های حاوی LB آگار (Luria Bertani Agar) انجام گرفت.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-05-17]

۲-۶- ژن هدف، آغازگرها و کاوشگر مورد استفاده

ژن rfb، که مسئول بیوسنتز آنتی‌ژن O باکتری سالمونلا است، به عنوان توالی هدف PCR انتخاب و با استفاده از نرم افزارهای Oligo 5 و DNAsis آغازگرها و کاوشگر مورد نظر طراحی و آنالیز گردید. آغازگر فرادست (۵'-AGAATATGTAATTGTCAG-۳') و آغازگر فرودست (۵'-TAACCGTTTCAGTAGTTC-۳') در واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفت که منجر به تکثیر قطعه ۸۸۲ جفت بازی شد. برای تأیید محصول PCR از کاوشگر طراحی شده (۵'-AGTTATCAATTGATTCTGC-۳') استفاده گردید. این کاوشگر مکمل قسمتی از ژن rfb بوده و در انتهای '۵ دارای نشان بیوتین می‌باشد. این الیگونوکلئوتیدها به وسیله شرکت Life Technologies ساخته شدند.

۲-۷- واکنش PCR

واکنش PCR برای حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر انجام گرفت. هر واکنش شامل ۰/۳ میکرومول از آغازگر، ۲۰۰ میکرومول از یکی از نوکلئوتیدهای dATP، dCTP، dGTP، ۱۹۰ میکرومول از dTTP، ۱۰ میکرومول از دیگوکسی‌ژنین (Rosh Diagnostics)، ۱/۵ واحد از آنزیم Taq پلیمراز (Cinnagen)، ۵ میکرولیتر از بافر PCR ۱۰X، غلظت ۱/۵ میلی‌مولار از $MgCl_2$ و غلظت‌های متفاوت از DNA ژنومی بود (از ۲۰ نانوگرم تا ۰/۲ پیکوگرم). در واکنشی دیگر به جای استفاده از DNA ژنومی، رقت‌های مختلفی از باکتری (از ۱۵۰۰ تا ۱ سلول در هر واکنش) مورد استفاده قرار گرفت. نحوه اجرای هر چرخه PCR عبارت بود از: واسرشتگی (Denaturation) اولیه در دمای ۹٤ درجه سانتیگراد به مدت ۳ دقیقه، سپس ۵ تا ۳۰ چرخه واسرشتگی در دمای ۹٤ درجه سانتیگراد، اتصال در دمای ٦۰ درجه سانتیگراد و تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد (هر یک به مدت ۳۰ ثانیه) و نهایتاً تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه. واکنش PCR در ۸ و ۳۰ چرخه به طور مجزا انجام گرفت. ۵ میکرولیتر از محصول واکنش PCR درون چاهک‌های ژل ۲ درصد حاوی ۰/۵ pg/ml اتیدیوم بروماید الکتروفورز شدند. به منظور تعیین اندازه محصول PCR از نشانگر bp۱۰۰ (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 استفاده از کیت شناسایی PCR-ELISA, DIG Detection (Boehringer Mannheim, German) انجام گرفت. به این منظور، ۱۰ میکرولیتر از محصولات PCR نشان‌دار، با ۹۰ میکرولیتر از محلول دورگه سازی SSC ۱X (Sodium chloride-Sodium citrate Buffer) با ۰/٦ پیکومول از کاوشگر نشان‌دار مخلوط اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در ۹۵ 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 ۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر بافر PBS (Phosphate Buffered Saline) ۰/۰۱ مولار با pH=۷/٤ به هر چاهک اضافه گردید و در دمای ٤ درجه سانتیگراد انکوبه شد). سپس به مدت یک ساعت در دمای ٦۵ درجه سانتیگراد قرار گرفت تا خشک شوند. چاهک‌ها به وسیله PBS حاوی ۰/۰۵ درصد توین (Tween) ۲۰ (PBST) شستشو داده شدند. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی‌بادی ضد دیگوکسی‌ژنین نشان‌دار با پراکسیداز با رقت ۱/۲۵۰۰ در PBST به هر کدام از چاهک‌ها اضافه شد. پس از شستشوی مجدد، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول سوبسترا (Substrate) (۲ میلی‌گرم O- فنیل دیامین (OPD) در ۵ میلی‌لیتر بافر سیترات فسفات با pH=۵ به همراه

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-05-17]

۲/۵ میکرولیتر از آب اکسیژنه ۳۰٪) به هر چاهک اضافه و به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه در اتاقک تاریک نگهداری شد. برای توقف واکنش از ۱۰۰ میکرولیتر اسید سولفوریک ۱/۵ مولار استفاده گردید. جذب نوری با استفاده از سنجش الایزا (ELISA Reader) (DYNEX Technologies) در ٤۹۰ نانومتر خوانده شد. سپس با استفاده از نتایج نورسنجی میزان سطح حداقل (cut off) تعیین گردید [۲٤].

۲-۹- بهینه‌سازی روش PCR و ELISA

برای بهینه‌سازی تکثیر قطعه ۸۸۲ جفت بازی، غلظت‌های مختلف $MgCl_2$ (۰/۵ تا ۳/۵ میلی‌مولار)، میزان dNTPs و همچنین دماهای مختلف اتصال آغازگرها (۵۸ تا ٦۲ درجه سانتیگراد) مورد بررسی قرار گرفت. در روش الایزا نیز مدت زمان انکوباسیون (Incubation) محصول PCR نشان‌دار در محلول دورگه‌سازی، میزان توییین مورد استفاده و همچنین رقت آنتی‌بادی ضد دیگوکسی‌ژنین نشان‌دار با پراکسیداز، به منظور دستیابی به بهترین نتایج آزمایش گردید.

۲-۱۰- بررسی تکرارپذیری آزمایش

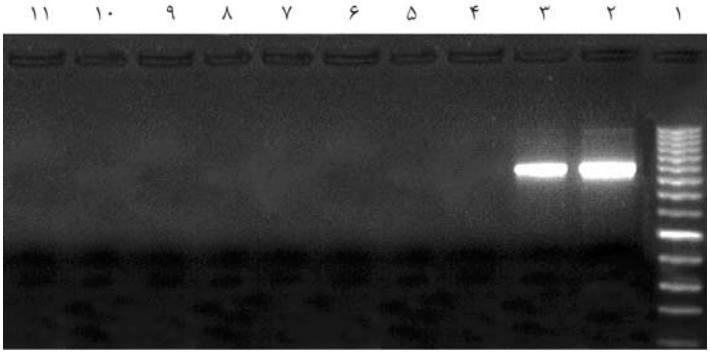
آزمایش‌ها ٦ بار به‌طور جداگانه، در روزهای متفاوت و با شرایط یکسان انجام پذیرفت. همچنین در یک روز، آزمایش با ٦ ظرف جداگانه و مواد و شرایط یکسان انجام و نتایج مورد بررسی قرار گرفت.

۳- نتایج

۳-۱- بررسی آغازگرها و کاوشگر

آنالیز ژن rfb باکتری سالمونلا تیفی‌موریوم 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 ۱۵-۳۲ و ۸۸۰-۸۹۷ ژن کدکننده آنتی‌ژن O منتج شده‌اند. کاوشگر طراحی شده در این تحقیق نیز برگرفته از توالی نوکلئوتیدی ۱۹۱-۲۰۹ ژن هدف می‌باشد. استفاده ازآغازگرهای اختصاصی منجر به تکثیر قطعه ۸۸۲ جفت بازی از باکتری سالمونلا تیفی‌موریوم شد. برای بررسی اختصاصی بودن آغازگرهای طراحی شده از گونه‌های غیر سالمونلا و همچنین گونه‌های سالمونلای غیر تیفی‌موریوم استفاده شد که در نتیجه هیچ باندی بر روی ژل آگارز مشاهده نشد (شکل ۱).

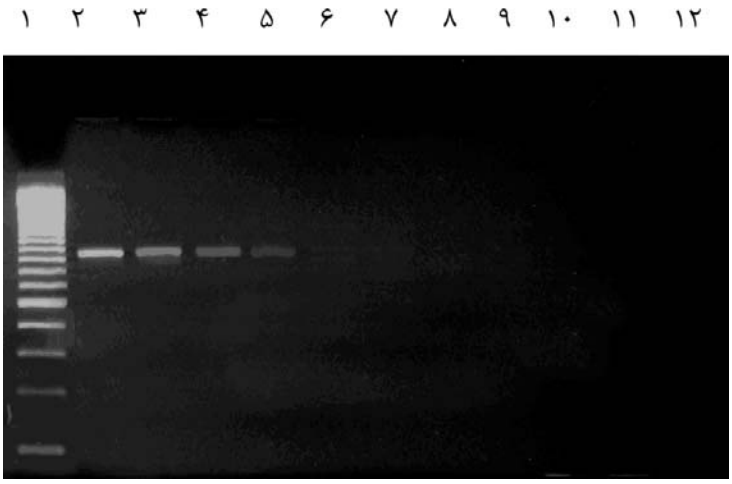
حداقل DNA ژنومی سالمونلا تیفی‌موریوم مورد استفاده در PCR، که باند قابل رویتی روی ژل آگارز رنگ‌آمیزی شده با اتیدیوم بروماید ایجاد می‌نمود، ۲۰۰ pg بود. همچنین نتایج PCR با استفاده از حداقل ۲۵۰ سلول باکتری با ۳۰ چرخه PCR بر روی ژل آگارز قابل مشاهده بود. با اعمال ۸ چرخه PCR نیز هیچ باندی بر روی ژل آگارز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



شکل ۱ بررسی اختصاصیت واکنش PCR جهت تشخیص سالمونلا تیفی‌موریوم

ردیف۱: نشانگر اندازه DNA (bp۱۰۰ DNA ladder)؛ **ردیف۲:** محصول PCR ۸۸۲ جفت بازی از گونه استاندارد سالمونلا تیفی‌موریوم؛ **ردیف۳:** محصول PCR ۸۸۲ جفت بازی از گونه جداسازی شده سالمونلا تیفی‌موریوم از نمونه بالینی؛ **ردیف ٤-۱۱:** استفاده از باکتری‌های سالمونلا پاراتیفی A، انتریتیدیس، اشیرشیاکلی، شیگلا دیسانتری، کلبسیلا پونومونیا، پروتئوس؛ ولگاریس و انتروباکتر آئروجنز به عنوان الگوی PCR

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-05-17]



شکل۲ بررسی حساسیت واکنش PCR جهت تشخیص سالمونلا تیفی‌موریوم با استفاده از سلول باکتری
ردیف۱: نشانگر اندازه DNA (bp۱۰۰ DNA ladder)؛ **ردیف۲-۷:** نتایج PCR رقت‌های مختلف سلول باکتری (۶۵-۱۲۵-۲۵۰-۵۰۰-۱۰۰۰-۲۰۰۰ سلول) با اعمال ۳۰ چرخه PCR؛ **ردیف۸-۱۲:** نتایج PCR رقت‌های مختلف سلول باکتری (۱۲۵-۲۵۰-۵۰۰-۱۰۰۰-۲۰۰۰ سلول) با اعمال ۸ چرخه PCR

۳-۲- حساسیت اندازه‌گیری PCR-ELISA

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 ۲۰۰ fg از DNA ژنومی و ۱۰ سلول باکتری است. در این آزمایش میزان سطح حداقل ۲٪ محاسبه گردید و در بررسی نتایج مورد استفاده قرار گرفت. 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 ۱تا ۳).

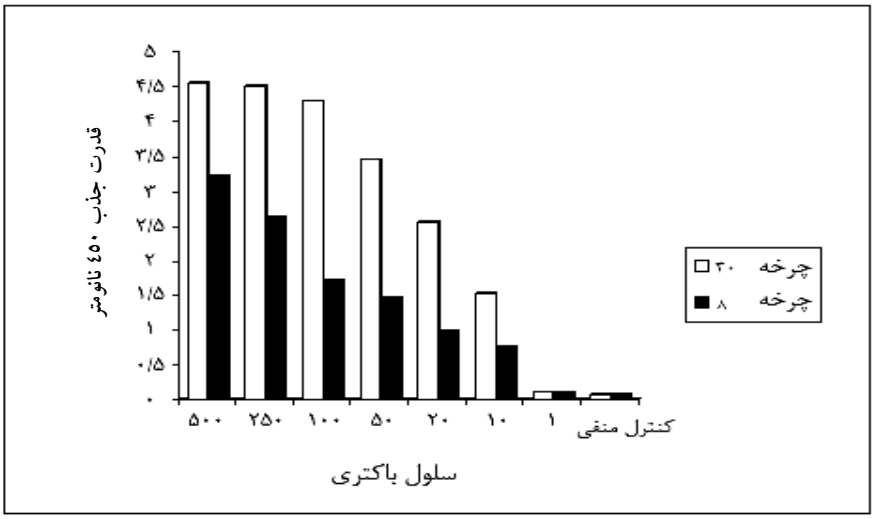
۳-۳- اختصاصی بودن روش PCR-ELISA

اختصاصی بودن روش تشخیصی با استفاده از گونه‌های باکتری مشخص شده در مواد و روش‌ها مورد بررسی قرار گرفت. نتیجه نشان داد که میزان جذب نوری حاصل از نمونه‌های باکتری سالمونلا تیفی‌موریوم، بیش از حد مقادیر کنترل‌های واکنش بود؛ در حالی که جذب نوری باکتری‌های دیگر پایین‌تر از ۰ و ۰/۵۲ تعیین شد (نمودار ٤).

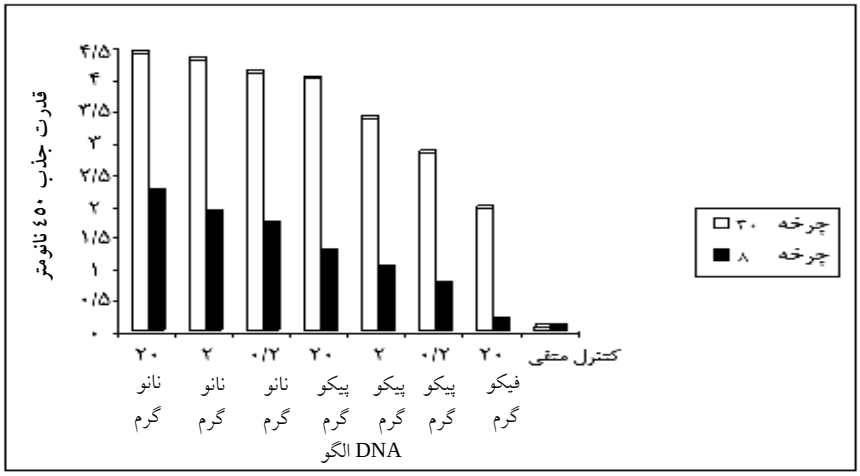
۳-٤- شناسایی سالمونلا تیفی‌موریوم در نمونه‌های غذایی

محصولات PCR به‌دست آمده از بررسی ۲۰ نمونه غذایی (شیر) آلوده شده به سالمونلا تیفی‌موریوم بر روی ژل آگارز و همچنین با روش دیگ‌ـ‌الایزا (DIG-ELISA) مورد بررسی قرار گرفت. با مقایسه نتایج به‌دست 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).

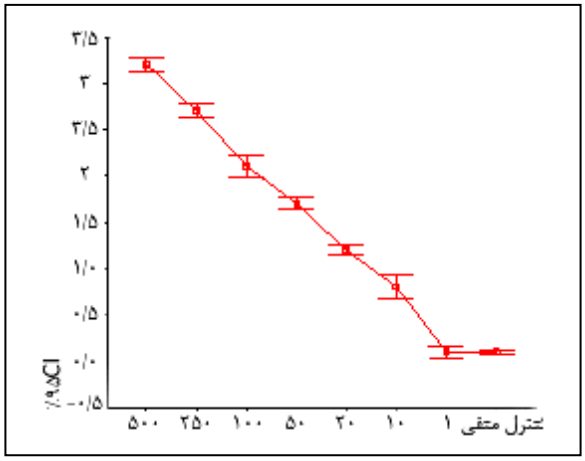
[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-05-17]

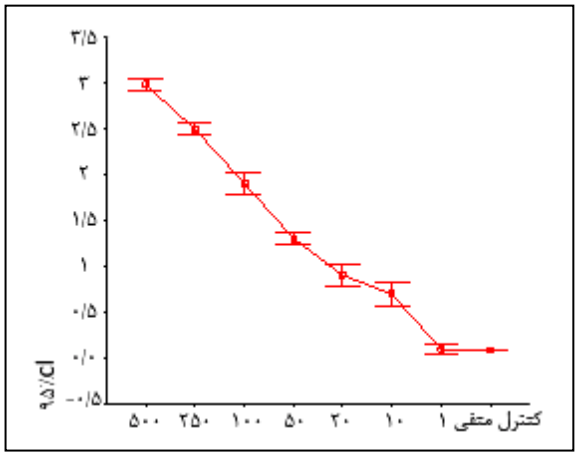


نمودار ۱ تعیین حساسیت روش PCR-ELISA با استفاده از نمونه سلول باکتری سالمونلا تیفی‌موریوم



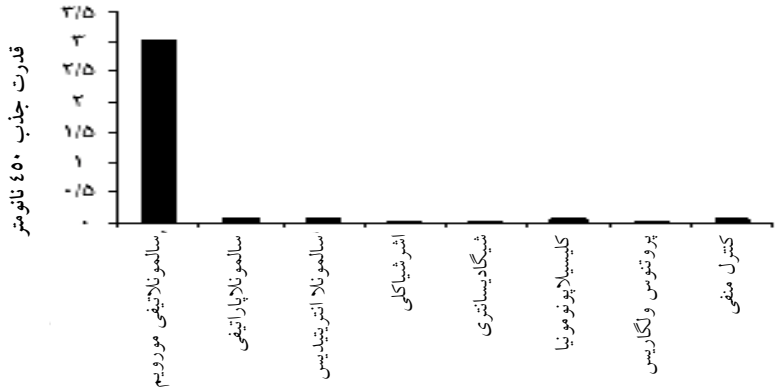
نمودار ۲ تعیین حساسیت روش PCR-ELISA با استفاده از نمونه DNA ژنومی باکتری سالمونلا تیفی‌موریوم



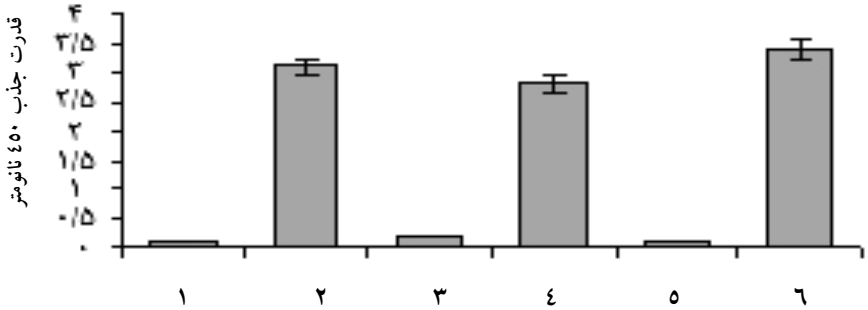


نمودار ۳ بررسی نتایج آزمون درون سنجش(۱) و برون سنجش(۲) واکنش PCR-ELISA جهت تشخیص سالمونلا تیفی‌موریوم بر حسب تعداد سلول باکتری با استفاده از نرم افزار SPSS 10

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-05-17]



نمودار٤ بررسی ویژگی روش PCR-ELISA جهت تشخیص سالمونلا تیفی‌موریوم



نمودار٥ بررسی نمونه‌های مواد غذایی و نمونه بالینی جهت وجود سالمونلا تیفی موریوم به روش PCR-ELISA
١- کنترل منفی واکنش؛ ٢- نتایج حاصله از بررسی نمونه‌های غذایی آلوده شده با سالمونلا تیفی‌موریوم؛ ٣- بررسی مواد غذایی بدون تلقیح باکتری سالمونلا تیفی‌موریوم؛ ٤- نمونه سالمونلا تیفی‌موریوم جدا شده از نمونه‌های بالینی؛ ٥- نمونه‌های بالینی سالمونلا غیر تیفی‌موریوم؛ ٦- کنترل مثبت (گونه استاندارد سالمونلا تیفی‌موریوم)

٣-٥- بررسی نمونه‌های جدا شده از کشت مدفوع

تعداد ٢٠ 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، ٧ مورد مثبت گزارش شد. با بررسی نمونه‌ها به روش PCR-ELISA نیز مجموعاً ٧ مورد سالمونلا تیفی‌موریوم شناسایی و تأیید گردید (نمودار٥).

٤- بحث

سالمونلا تیفی‌موریوم یکی از مهم‌ترین گونه‌های سالمونلا است که انگل درون سلولی اختیاری بوده و از راه غشاهای مخاطی به میزبان حمله می‌کند [٥]. این باکتری سبب ایجاد بیماری‌های دستگاه گوارشی می‌شود و اصلی‌ترین راه انتقال آن به وسیله آب، گوشت، تخم مرغ و غذاهای خام می‌باشد [٢٥-٢٧]. سالمونلوز 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 سالمونلا، برنامه‌های نظارتی و غربالی مورد نیاز است [٤-٢٠]. تشخیص باکتری سالمونلا تیفی‌موریوم در نمونه‌های بالینی افراد واجد گاستروانتریت (Gastroenterit) و نمونه غذاهای مصرف شده به وسیله آنها می‌تواند کمک بزرگی در حفظ و کنترل شیوع این عامل باشد. شناسایی سالمونلاها، از جمله سالمونلا تیفی‌موریوم به روش‌های باکتری‌شناسی زمان‌بر بوده و به ٤ تا ٥ روز وقت

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-05-17]

نیاز دارد؛ مخصوصاً هنگامی که تعداد نمونه‌های مورد بررسی زیاد باشد، این نقاط ضعف بیشتر آشکار می‌شود [۲۹،۱۵،۲۸].

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 [۳۱،۹،۱٤،۳۰]. 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 داراست.

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 ۹٦ خانه اشاره کرد که به خصوص در زمان شیوع همه‌گیری‌ها بسیار کاربرد خواهد داشت [۲۰-۲۲]. در این مقاله برای شناسایی سالمونلا تیفی‌موریوم، که یکی از عوامل ایجاد کننده مسمومیت‌های غذایی است، از روش PCR-ELISA استفاده شد. ژن کد کننده آنتی‌ژن O باکتری سالمونلا تیفی‌موریوم 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 تیفی‌موریوم 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 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 مدفوع 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 بردند. 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 [۳٤].

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 لوک (Luck) و همکاران از ژن rfbS لیپوپلی‌ساکارید (Lipopolysaccharide) برای غربالگری نمونه‌های مدفوع و تشخیص سریع گروه D سالمونلا استفاده

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-05-17]

شد. حد تشخیص این تحقیق نیز شناسایی ۱۰ باکتری در هرنمونه بود که با نتایج این بررسی همخوانی دارد [۳۶]. همچنین مانازو (Manazo) توانست حساسیت روش PCR-ELISA را برای شناسایی سالمونلا در نمونه غذایی به ٤/٥ fg کاهش دهد که بالاترین حساسیت تشخیص گزارش شده سالمونلا 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 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 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 تجربه شده بود. به طور خلاصه، روش PCR-ELISA 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.

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, Hoorfar 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, Hoorfar J, Hugas M, Heuvelink A, Fache P, Ellerbroeka L, Bungea C, Dorna C, Helmutha R. Interlaboratory diagnostic accuracy

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-05-17]

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 matricest. 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] Jofre´ A, Martin B, Garriga M, Hugas M, Pla M, Rodri´guez-La´zaro 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, Sa´nchez-Jime´ nez MM, Correa-Ochoa MM, Puthucheary SD ,Thong Kl . 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, Yamguchi M, Moriya K, Ezaki T, Kawamura Y,

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-05-17]

زنجیره‌ای پلیمراز-الایزا (PCR-ELISA). مجله پزشکی کوثر. ۱۳۸۵؛ ۱ (۱۱): ٤١-٥٠

[34] Gilbert C, Winters D, O'Leary A, Slavik M. Development of a triplex PCR assay for the specific detection of Campylobacter jejuni,Salomnella 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 01 strains from south Iran with PCR-ELISA. IBJ 2008; 12(1): 15-21.

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 ParatypHi 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 Infectioous Diseases 2006; 1(3): 113-9.

[۳۳] احمدی شهرام، موسوی میرلطیف، سروری رحیم، سلیمیان جعفر، کریمی راهجردی احمد، نظریان شهرام، امانی جعفر. تشخیص سریع ویبریو کلرا O1 با استفاده از روش واکنش

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-05-17]