

شناسایی لیستریا مونوستیتوژنر در شیر توسط واکنش زنجیره ای پلی مراز

دکتر سیاوش سلمانزاده اهرابی، دکتر محسن رضایی همامی، دکتر محمد رضا زالی*

* گروه بیماریهای ناشی از غذا، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

چکیده

سابقه و هدف: لیستریا مونوستیتوژنر می‌تواند عامل منتشریت و سپسیس در انسان باشد. آین میکروارگانیسم از راه مواد غذایی منتقل می‌شود. شناسایی سریع و دقیق آن در پیشگیری از موارد عفونت نقش بسزایی دارد.

مواد و روشها: برای شناسایی لیستریا مونوستیتوژنر در شیر پس از غنی سازی در محیط کشت از روش PCR استفاده شد. شیوه کار بدین صورت بود که ابتدا نمونه‌ها در بروث مغذی کشت داده شد و آنها استخراج شد و با استفاده از روش PCR مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: در تعیین حساسیت این روش معلوم شد که شناسایی $m/37CFU$ از باکتری در شیر امکان پذیر می‌باشد. DNA چندین باکتری دیگر به جز لیستریا مونوستیتوژنر نیز با پرایمرهای مورد استفاده مورد آزمون قرار گرفتند که در همه موارد نتیجه منفی بود.

نتیجه‌گیری: این روش می‌تواند به عنوان روشی با حساسیت و اختصاصیت بالا و صرف وقت کمتر به صورت کاربردی برای شناسایی لیستریا مونوستیتوژنر در شیر استفاده شود.

واژگان کلیدی: لیستریا مونوستیتوژنر، شیر، PCR

می‌باشد از این رو وجود روش‌های سریع و کاربردی برای شناسایی این باکتری در مواد غذایی نیازی ضروری است که به این منظور روش‌هایی مانند: PCR، DNA hybridization و ELISA مورد آزمایش قرار گرفته‌اند (۳). در مطالعه حاضر یک روش PCR سریع و حساس برای شناسایی این باکتری در محیط کشت غنی کننده از نمونه‌های شیر به کار رفته است. در این روش وجود باکتری با تکثیر قطعه DNA به طول ۷۰۲ جفت باز در منطقه ژن Listeriolysin O تعیین گردید.

مواد و روشها

سوشهای باکتری و روش‌های کشت: در مراحل مختلف این مطالعه از سوش‌های *L. monocytogenes* 4b که از انسیتوپاستور فرانسه تهیه شده بود، سوش‌های *L. innocua* و *L. seeligeri* که در آزمایشگاه از شیر خام جدا شده بود و *E.coli* به شماره

مقدمه
لیستریا مونوستیتوژنر می‌تواند عامل بالقوه منتشریت و سپسیس در انسان باشد. زنان حامله، نوزادان و افراد با نقص ایمنی مستعد ابتلا به عفونتهای این باکتری می‌باشند. همچنین افراد سالم ممکن است به این باکتری آلوده شوند (۲۰۱). مهمترین روش انتقال این باکتری از راه مواد غذایی می‌باشد (۳). از سال ۱۹۸۰ موارد زیادی از درگیری با این باکتری به صورت اپیدمی یا موارد تک گیر بر اثر مصرف غذای آلوده گزارش شده است (۱۳-۷). از آنجاییکه این باکتری در همه جا یافت می‌شود، باید با کنترل بیشتر چرخه تولید و توزیع مواد غذایی تلاش خود را برای پیشگیری از این عفونت افزایش دهیم. پتانسیل بالای خطر آلودگی شیر خام و پاستوریزه و فرآورده‌های شیر و محصولات گوشتی با این باکتری در مطالعات بسیاری در کشورهای مختلف نشان داده شده است (۳). جداسازی لیستریا از موادغذایی با روش کشت و شناسایی آن با روش‌های بیوشیمیایی نیازمند ۷-۸ روز زمان

شناسایی لیستریا مونوسیتوفیزنز به کمک PCR

PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد. ترکیب master mix به این شرح بود: بافر $1 \times$ PCR، ۲ میلی مولار $MgCl_2$ ، ۰/۲ میلی مول از هریک از dNTP، ۱ میکرومولاژ هر پرایمر و ۰/۷۵ یونیت از DNA polymerase مقاوم به حرارت و یک میکرولیتر نمونه DNA. پرایمرهای مورد استفاده عبارت بودند LM2(5aaggcgttgcactgct3) و LM1(5ccataaggacgcaatgaa3) از: که توسط Border و همکارانش استفاده شده بود. دمای دناتوره شدن ۹۴ درجه به مدت ۳ دقیقه، دمای annaeling ۵۶ درجه به مدت ۴۵ ثانیه، دمای extension ۷۲ درجه به مدت یک دقیقه و تعداد سیکل ها ۴۰ بار تعیین شد. در پایان نیز ۴ دقیقه با دمای ۷۲ درجه برای extension نهایی به نامه اضافه شد.

میکرولیتر از محصول PCR همراه با loading buffer بر روی ژل آگاروز ۱٪ بار شد و الکتروفورز انجام شد. مدت الکتروفورز ۳۰ دقیقه و ولتاژ آن ۱۰۰ ولت بود. DNA نمونه‌ها با استفاده از اتیدیوم بروماید با غلظت ۰/۵ میکروگرم در میلی لیتر به مدت ۳۰ دقیقه رنگ آمیزی شد و پس از آن برای رنگ زدایی به مدت ۳۰ دقیقه در آب مقطر قرار گرفت. پس از آن ژل‌ها با ترانسلومیناتور اشعه فرابنفش و سیستم ژل داک^۴ مورد بررسی قرار گرفتند.

ما فتھا

اختصاصت PCR

در این مطالعه در نمونه هایی که تعداد کمی از سوش های باکتری استفاده شده بود، پرایمرهای مورد استفاده (LM1/LM2) برای شناسایی لیستریا مونوسیتوفیزنز از اختصاصیت بالایی، برخوردار بودند. (شکل ۱)

PCR حساسیت روش PCR قادر بود که فقط مقدار CFU/ml ۵۰۰۰۰۰ از باکتری را به صورت مستقیم در محیط TSB شناسایی نماید. این در حالیست که وقتی محیط های غنی ساز مورد استفاده قرار گرفت، روش PCR مقدار ۳۷CFU/ml از باکتری قابل شناسایی بود. نتایج در شکل ۲ آورده شده است.

ATCC 25922 و استافیلوکوکوس اورئوس به شماره ATCC 25923 استفاده شد.

برای تعیین ویژگی روش، DNA های استخراج شده از باکتریهای لیستریا مونوسیتولزن، لیستریا سالیگری، استافیلکوکوس اورئوس و E.coli مورد آزمون قرار گرفتند.

به منظور تعیین حساسیت، این عمل برای غلظتهاي $5\text{ CFU}/\text{ml}$ لیستریا مونوسپیتوز نر در یک میلی لیتر TSB^2 انجام شد.

برای سنجش قابلیت تکرار پذیری آن، روشی که در زیر ذکر می شود ۵ بار تکرار شد. ابتدا نمونه های شیر اولتراتراپاستوریزه (۹۸) از نظر عدم آلودگی با لیستریبا با استفاده از روش های کشت مورد بررسی قرار گرفتند و پس از آن نمونه های با غلظتهاي CFU/ml از $0, 37, 370, 3700, 37000$ لیستریبا مونوسیتوژن تهیه شد. برای تهیه این غلظت های رقیق شونده باکتری که در TSB رشد کرده بود به رقت های متواالی اضافه شد و به اندازه هر نمونه به آن شیر اضافه شد. پس از آن 10 میلی لیتر از هر نمونه به 90 میلی لیتر LEB گرفته شد. محیط کشت مغذی به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه انکوبه گردید و پس از آن به محیط Modified Oxford agar پاساژ داده شد (۹). همزمان یک میلی لیتر از بروث مغذی برای استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفت.

استخراج :DNA

یک میلی لیتر از کشت باکتری در TSB یا LEB به مدت سه دقیقه و با دور rpm ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ شد. سپس رسوب حاصله با ۱mM EDTA، TE (10 mM Tris-pH=8) و ۱mM Tris-Cl باز برسوب به دست آمده در ۱/۰ میلی لیتر محلول حاوی لیزوزیم صورت ورتکس- سانتریفیوژ شیستشو داده شد. پس از آن، رسوب به دست آمده در ۱/۰ میلی لیتر محلول حاوی لیزوزیم با غلظت ۱mg/ml به حالت تعلق درآمد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه انکوبه شد. سپس ۱/۰ میلی لیتر از پروتئیناز K با غلظت ۴۰۰ µg/ml به آن اضافه گردید و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۶۰ درجه انکوبه گردید. در ادامه مخلوط حاصله به مدت ۱۵ دقیقه جوشانده شد. پس از آن با دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. ۵۰ میکرولیتر از مایع رویی به لوله های جدید منتقل شد و برای استفاده در PCR در دمای ۲۰ درجه نگهداری شد.

PCR

¹ Colony forming unit

² Trypticase Soy Broth-Difco

³ Listeria Enrichment Broth

بحث

در سالهای اخیر PCR برای شناسایی لیستریا مونوسیتوژنر در مواد غذایی مورد استفاده قرار گرفته است. انجام این کار برای مواد غذایی دارای مشکلات تکنیکی می باشد که احتمالاً به علت واکنشهای بازدارنده است بنابراین روش‌های مورد استفاده در بررسی نمونه های مواد غذایی باید به اندازه کافی حساسیت داشته باشند تا بتوانند مقادیر کم باکتری را ردیابی نمایند.

فرآوری مواد غذایی پیش از مصرف ممکن است باعث مرگ این باکتریها شود. وجود این باکتریهای مرده می تواند باعث به دست آوردن نتایج مثبت کاذب در PCR شود. به منظور حل این مشکل بسیاری از محققین پیش از PCR نمونه های مواد غذایی، از محیط های کشت غنی ساز استفاده می کنند (۸,۶).

محیط های غنی ساز باعث افزایش زیاد تعداد باکتریهای زنده می شوند و حساسیت PCR را افزایش می دهند همچنین استفاده از محیط های غنی ساز باعث رقیق شدن باکتریهای مرده و عوامل بازدارنده واکنش PCR می گردد.

در این مطالعه یک روش PCR حساس و اختصاصی برای شناسایی لیستریا مونوسیتوژنر درشیر، پس از غنی سازی در محیط های غنی ساز به کار رفته است. کل این فرآیند می تواند در طی دو روز انجام شود. برای این زن LM1/LM2 و پرایمرهای listeriolysin O تکثیر شد. قطعه ای به طول ۷۰۲ جفت باز در این زن به کار رفته است. Border و همکاران در تحقیق خود گزارش کرده اند که ترکیب این دو پرایمر برای ردیابی لیستریا مونوسیتوژنر اختصاصی است (۱۱). به علاوه مشخص شده است که این زن در پاتوژن این باکتری نقش مهمی را ایفا می کند این زن در تمامی نمونه های بالینی این باکتری موجود می باشد (۱۳,۱۲,۱).

بعضی از محققین تلاش نموده اند که این باکتری را با روش PCR مستقیماً از روی غذا و بدون استفاده از محیط غنی ساز ردیابی نمایند. برای این کار نیازمند عملیات پیچیده ای برای استخراج DNA از مواد غذایی مانند پنیر و ماهی سالمون می باشیم و نتایج نیز به علت حساسیت پایین رضایت بخش نمی باشد (۱۵,۱۴). این در حالیست که در شیر می توان باکتری را با سانتریفوژ جدا نمود و عوامل بازدارنده PCR نیز با استفاده از بافر، شستشو داد (۱۶,۱۰). این باکتری می تواند مستقیماً از روی نمونه های شیر با این روش ساده ردیابی شود. Fuerrer و همکاران (۱۰) یک روش شناسایی برای این

شکل ۱- نتایج PCR برای DNA استخراج شده از باکتریهای متفاوت که در ۱/۵٪ و با اتیدیوم بروماید الکتروفورز شده است. ستون یک استاندارد وزنهای مولکولی، ستون ۲ لیستریا مونوسیتوژنر سروتاپ، ستون ۳ L. innocua، ستون ۴ L. aureus، ستون ۵ E.coli و ستون ۶ S.aureus و ستون ۷ کنترل منفی، آب مقطر به جای DNA استفاده شد.

شکل ۲- نتایج PCR نمونه های شیر که پس از تلقيق باکتری لیستریا مونوسیتوژنر به محیط کشت غنی ساز وارد شده بودند. DNA استخراج شده از باکتریها در ۱/۵٪ و با اتیدیوم بروماید الکتروفورز شده است. ستون یک استاندارد وزنهای مولکولی (خط کش ۱۰۰ جفت باز). نمونه های شیر که با باکتری لیستریا مونوسیتوژنر تلقيق شده اند. ستون ۲ CFU/ml ۳۷۰۰۰، ستون ۳ CFU/ml ۳۷۰۰، ستون ۴ CFU/ml ۳۷۰، ستون ۵ CFU/ml ۳۷۰ و ستون ۶ CFU/ml ۳۷CFU/ml و ستون ۷ CFU/ml ۳/۷CFU/ml و ستون ۸ کنترل منفی (نمونه شیر اولتر پاستوریزه که از نظر عدم وجود باکتری با روش های استاندارد کشت تست شده است).

سطح آلودگی با این باکتری در شیرهای آلوده کمتر از 1000 CFU/ml می باشد (۱۷). در این مطالعه روش به کار رفته می تواند 37CFU/ml را در نمونه های شیر پس از غنی سازی شناسایی نماید. این روش دارای حساسیت و اختصاصیت بالا می باشد و در مدت زمان کوتاهتری انجام می شود.

باکتری در نمونه های شیر به مقدار 10 CFU/ml ابداع نمودند. اگرچه در این روش باز هم به علت وجود باکتریهای مرده احتمال وجود مثبت کاذب وجود دارد. روش ما قادر است مقدار 50000 CFU/ml باکتری را به طور مستقیم از محیط TSB شناسایی نماید. پس از غنی سازی به علت رقیق شدن باکتریهای مرده، نتایج مثبت کاذب بسیار کاهش می یابد.

REFERENCES

1. Gellin BG, Broome CV. Listeriosis. *JAMA* 1986; 261: 1313-17.
2. Vandepitte J, Ruelens R. Clinical aspects of human listeriosis. *Turk J Infect* 1988, 2: 487-93.
3. Farber IM, Peterkin PI. Listeria monocytogenes, a food-borne pathogen. *Microbiol Rev* 1991; 55: 476-78.
4. Fleming DW, Cochi SL, MacDonald KL, et al. Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. *N Eng J Med* 1985; 312: 404.
5. Linnan MJ, Mascola L, Lou XD. Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. *N Eng J Med* 1988; 319: 823.
6. Schlech WF, Lavigne PM, Bortolussi RA, et al. Epidemic listeriosis-evidence for transmission by food. *N Eng J Med* 1983; 308: 203.
7. McLauchlin J. Listeria monocytogenes, recent advances in the taxonomy and epidemiology of listeriosis in humans. *J Appl Bacteriol* 1987; 63: 1-7.
8. Lovett J, Francis DW, Hunt JM. Listeria monocytogenes in raw milk: detection, incidence and pathogenecity. *J Food Prot* 1987; 50: 188-94.
9. Nash P, Krenz MM. Culture media. In: Isenberg HP, Jean Shadomy H, eds. *Manual of clinical microbiology*. American Society for Microbiology, Washington DC, 1991; p:1226.
10. Furrer B, Candrian U, Hoeflein C, et al. Detection and identification of *Listeria monocytogenes* in cooked sausage products and in milk by in vitro amplification of haemolysins gene fragments. *J Appl Bacteriol* 1991; 70: 372-76.
11. Border PM, Howard JJ, Plastow GS, et al. Detection of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* using polymerase chain reaction. *Lett Appl Microbiol* 1990; 11: 158-63.
12. Grves RD, Welshimer HJ. Separation of pathogenic from apathogenic *L. monocytogenes* by three in vitro reactions. *J Clin Microbiol* 1977; 5: 559.
13. Jenkins EM, Njoku-Obi AN, Adams EA. Purification of the soluble hemolysins of *L. monocytogenes*. *J Bacteriol* 1964; 88: 418-22.
14. Wernars K, Heuvelman CJ, Chakraborty T, et al. Use of the polymerase chain reaction for direct detection of *Listeria monocytogenes* in soft cheese. *J Appl Bacteriol* 1991; 70: 121-26.
15. Simon MC, Gray DI, Cook N. DNA extraction and PCR methods for the detection of *L. monocytogenes* in cold-smoked Salmon. *Appl Environ Microbiol* 1996; 62: 822-25.
16. Cooray KJ, Nishibori T, Xiong H, et al. Detection of multiple virulence-associated genes of *Listeria monocytogenes* by PCR in artificially contaminated milk samples. *Appl Environ Microbiol* 1994; 60: 3023.
17. Center for Disease Control: Up-date listeriosis and pasteurized milk. *Morbid Mortal Weekly Rep* 1988; 37: 764.