مجله علمی- پژوهشی زیست فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی
زمستان 1390، دوره سوم، شماره یازدهم، صفحه 40-35

مقایسه دو روش کشت میکروبی و PCR در شناسایی *اشریشیا کلی* در شیر

محمد حسن شاه حسینی[1و2] ، روزبه زند[3]، الهام مسلمی[4] ، وجیهه فدائی[3]

1. دپارتمان میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرقدس
2. موسسه ایرانیان ژن فن آور
3. دپارتمان علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرقدس
4. دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شرق (قیام دشت) ، گروه زیست شناسی

نویسنده مسؤول: روزبه زند. گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرقدس . R_zandfood@yahoo.com

دریافت: 90/10/8 پذیرش: 90/12/10

چکیده

زمینه و هدف: *اشریشیا کلی* **از طریق آب، گوشت، شیر و فرآورده های آن به انسان منتقل می شود، با توجه به اینکه شیر از مواد غذایی با ارزش در سبد غذایی خانواده ها است کنترل کیفیت باکتریولوژیکی شیر خام و پاستوریزه در سطح مراکز تولید،جمع آوری و فرآوری شیر بسیار حائز اهمیت است. استفاده از روش های متواتر کشت جهت شناسایی** *اشریشیاکلی* **هم بسیار وقت گیر بوده و هم دقت پایینی دارند و ممکن است باعث بدست آمدن نتایج مثبت کاذب گردند. واکنش زنجیره ای پلیمرآز (PCR) از جمله روش هایی است که می تواند جایگزین مناسبی برای آزمایشات رایج باشد که روشی حساس، دقیق، ارزان و سریع می باشد. هدف از این مطالعه بهینه نمودن تست PCR جهت شناسایی** *اشریشیاکلی* **در شیر، معرفی حالت زنده اما غیر قابل کشت در صنایع غذایی و مقایسه کشت با PCR در شناسایی** *اشریشیاکلی* **در شیر قبل و بعد از پاستوریزاسیون می باشد.**

روش بررسی: در این مطالعه 50 نمونه شیر خام و 50 نمونه شیر پاستوریزه جمع آوری گردید. DNA به روش جوشاندن استخراج شد و به وسیله PCR بهینه شده مورد بررسی قرار گرفت . نتایج واکنش PCR بر روی ژل آگارز ارزیابی شد. جهت کشت نیز ابتدا از روش MPN 9 لوله ای استفاده گردید سپس از لوله های حاوی گاز بر روی محیط کشت ائوزین متیلن بلو آگار (EMB) به صورت خطی کشت داده شد.

یافته ها: در بین 50 نمونه شیر غیر پاستوریزه در 24 نمونه تست PCR مثبت ارزیابی گردید اما در 20 نمونه نتیجه کشت میکروبی مثبت بود و در بین 50 نمونه شیر پاستوریزه در 29 نمونه تست PCR مثبت ارزیابی گردید اما در هیچ نمونه ای نتیجه کشت میکروبی مثبت نبود.

نتیجه‌گیری: این بررسی نشان داد که روش PCR در مقایسه با روش های متواتر کشت دارای حساسیت بیشتری بوده و قادر به شناسایی اشریشیاکلی در داخل شیر با ویژگی بالا و صرف زمان کم تر می باشد.

واژه‌های کلیدی: شیر، *اشریشیا کلی*، کشت میکروبی، PCR

www.SID.ir

مقدمه

اشریشیاکلی که به ای کلای (*E.coli*) یا کلی باسیل نیز معروف است یک باکتری گرم منفی از خانواده انترو باکتریاسه می باشد که برخی سویه های آن عامل گاستروآنتریت،عفونت خونی، عفونت دستگاه ادراری و مننژیت می باشد. از آن جهت که باکتری *اشریشیاکلی* در محتویات روده انسان و حیوان یافت می شود، وجودش در خارج از روده می تواند دلیلی بر آلودگی با مدفوع انسان یا حیوان باشد. بازیابی *اشریشیا کلی* از مواد غذایی می تواند احتمال وجود میکروارگانیسم هایی که منشا مدفوعی دارند را در داخل مواد غذایی نشان دهد(1). آلودگی شیرهای خام و پاستوریزه از مسائلی است که به دلایل متعدد حتی در جوامع پیشرفته می تواند بروز نماید و تعداد کل باکتری های شیر در رابطه با ارزیابی مناسب بودن آن برای مصرف انسان نه تنها مهم بوده بلکه اهمیت بیشتر آن در امکان وجود باکتری هایی است که قادرند در مصرف کننده بیماری ایجاد کنند(2). حضور *اشریشیا کلی* دلالت بر آلودگی شیر به مدفوع انسانی یا حیوانی است و از آنجایی که این باکتری فلور طبیعی روده تمام حیوانات خونگرم می باشد، حضور آن در شیر پاستوریزه نشانه ناسالم بودن برای مصرف کننده است(3). طبق گزارش های موجود *اشریشیا کلی* از طریق آب،گوشت، شیر و فرآورده های آن به انسان منتقل می شود و با توجه به اینکه شیر از مواد غذایی با ارزش در سبد غذایی خانواده ها است کنترل کیفیت باکتریولوژیکی شیر خام و پاستوریزه در سطح مراکز تولید، جمع آوری و فرآوری شیر بسیار حائز اهمیت است(4). استفاده از روش های متداول شناسایی *E.coli* ها مانند: روش تخمیر در لوله های چندتایی (MPN)، روش پورپلیت،روش فیلتراسیون غشایی(mf) و روش حضور وغیاب (P-A) هم بسیار وقت گیر بوده و هم دقت پایینی دارند و ممکن است باعث بدست آمدن نتایج مثبت کاذب گردند(5). واکنش زنجیره ای پلیمراز از جمله روش هایی است که می تواند جایگزین مناسبی برای آزمایشات رایج باشد که روشی حساس، دقیق، ارزان و سریع می باشد و کارآیی استفاده از آن در مطالعات مختلف به اثبات رسیده است(6). با استفاده از روش فوق می توان تا حتی یک باکتری در 100 میلی لیتر آب را شناسایی نمود. مزیت مهم این تکنیک ها،کاربرد آنها به طور عمومی برای تعیین هویت همه عوامل عفونی است. به بیان دیگر، اکثر قریب به اتفاق عوامل میکروبی از طریق روشهای مولکولی قابل تشخیص، به ویژه تشخیص سریع با حساسیت و ویژگی بالا می باشند(7-10). هدف از این مطالعه بهینه نمودن تست PCR جهت شناسایی اشریشیاکلی در شیر همچنین معرفی حالت زنده اما غیر قابل کشت *اشریشیا کلی* در شیر و مقایسه کشت (بعنوان روش متواتر) با روش مولکولی PCR در شناسایی این میکروارگانیسم در نمونه های شیر، قبل و بعد از پاستوریزاسیون و همچنین شناسایی فرم های زنده اما غیر قابل کشت ، قبل و بعد از پاستوریزاسیون می باشد.

روش بررسی

جهت بررسی مولکولی ابتدا تست PCR برای شناسایی این باکتری بهینه گردید.در این تحقیق از ژن 16s rRNA به عنوان مولکول هدف برای شناسایی باکتری استفاده(1). علت انتخاب این ژن ، بالا بودن تعداد کپی این مولکول و پایداری آن در سلول می باشد. با استفاده از تراف استاندارد ژن 16s rRNA از باکتری اشریشیا کلی طراحی پرایمرهای رفت و برگشت انجام شد. ترادف پرایمرهای مزبور به صورت زیر است :

Forward Primer: 5'- CGA GTG GCG GAC GGG TGAGT-3'
Reverse Primer: 5'- TCG ACA TCG TTT ACG GCGTGGA-3'

غلظت عوامل PCR به شرح زیر و در حجم 20میکرولیتر استفاده گردید. آب دوبار تقطیر در حجم 14 میکرولیتر، 2,5 میکرولیتر 10X PCR Buffer، 0,75 میکرولیتر $MgCl_2$، 0,5 میکرولیتر dNTPs، پرایمرهای جلویی و عقبی هر کدام به غلظت 1 میکرولیتر و 0,3 میکرولیتر

Archive of SID

www.SID.ir

آنزیم Taq DNA Polymerase. برنامه حرارتی دستگاه ترموسایکلر برای تکثیر سکانس مورد نظر در این تحقیق به صورت زیر می باشد. دناتوراسیون در 94°C به مدت 20 ثانیه، چسبیدن پرایمرها در 68°C به مدت 10 ثانیه و طویل شدن در 72°C به مدت 20 ثانیه. این برنامه ی حرارتی به تعداد 30 سیکل در نظر گرفته شد.
برای بررسی نهایی محصولات PCR ، از الکتروفورز آن بر روی ژل آگار 1/5 درصد استفاده شد. بررسی نتیجه الکتروفورز با استفاده از رنگ آمیزی آن با محلول اتیدیوم بروماید و مشاهده آن با دستگاه ترانس لومیناتور UV انجام گرفت. برای تعیین حساسیت تست PCR بهینه شده از سوش استاندارد اشریشیاکلی با تعداد واحد سازنده کلنی (CFU) مشخص استفاده شد و رقت های سری را از آن تهیه گردید. DNA را بر مبنای روش جوشاندن استخراج شد. DNA استخراج شده هر کدام از رقت ها به تیوب جدیدی منتقل گردید. با استفاده از DNA های استخراج شده و نمونه کنترل مثبت و منفی حساسیت تست PCR برای تشخیص اشریشیاکلی تعیین شد. برای تعیین اختصاصیت تست PCR بهینه شده، DNA چند جنس از خانواده انتروباکتریاسه مانند باکتری های شیگلا ، پروتئوس و سالمونلا و همچنین نمونه DNA انسان استخراج گردید و تست PCR بهینه شده برای آنها به همراه نمونه کنترل مثبت و منفی اشریشیاکلای مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت کشت ابتدا از روش 9 MPN لوله ای استفاده گردید. پس از گرمخانه گذاری به مدت 24 ساعت از لوله های حاوی گاز بر روی محیط کشت EMB به صورت خطی کشت داده شد و پس از 24 ساعت گرمخانه گذاری تست های تاییدی MR,VP جهت تایید حضور اشریشیاکلی انجام گرفت(3).
در این پروژه جهت تجزیه و تحلیل آماری از نرم افزار SPSS استفاده شده است و با توجه به اینکه نمونه شیرهای مورد آزمون، به طور مستقل مورد آزمایش با روشهای کشت میکروبی و PCR قرار گرفتند، در کلیه آزمون های فرض آماری، پیش فرض "آزمون نسبتهای مستقل(غیر همبسته)" مورد تاکید قرار گرفته است.

یافته ها

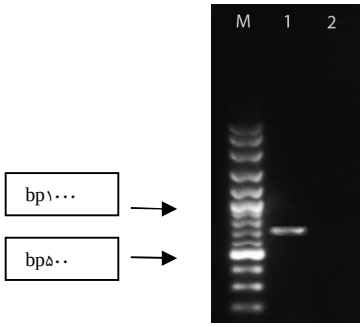
با تکثیر ژن مورد نظر با استفاده از پرایمرهای طراحی شده قطعه ای حدود 723 جفت باز به دست آمد(شکل 1). تست PCR بهینه شده قادر به شناسایی 10 باکتری در هر میلی لیتر بوده (شکل 2) و هیچ آمپلیکون ناخواسته ای برای سایر DNA ها بجز نمونه کنترل مثبت وجود نداشت(شکل 3). مقایسه بین دو روش کشت میکروبی و PCR نشان داد که در بین 50 نمونه شیر غیر پاستوریزه در 24 نمونه تست PCR مثبت ارزیابی گردید اما در 20 نمونه نتیجه کشت میکروبی مثبت بود و در بین 50 نمونه شیر پاستوریزه در 29 نمونه تست PCR مثبت ارزیابی گردید اما در هیچ نمونه ای نتیجه کشت میکروبی مثبت نبود. نتایج حاصل از انجام تست PCR و کشت میکروبی بر روی شیرهای خام و پاستوریزه به تفکیک نوع نمونه در جدول 1 آمده است.

جدول1. نتایج حاصل از انجام تست PCR و کشت میکروبی به تفکیک نوع نمونه

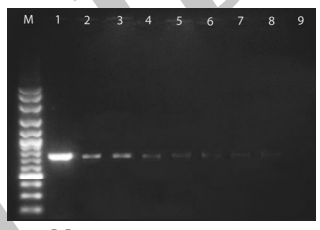
نام نمونه	تعداد نمونه	نتیجه مثبت PCR	نتیجه مثبت کشت
شیر خام دریافتی از مراکز جمع آوری	11	11	11
شیر خام دریافتی از دامداری های مستقل	39	13	9
شیر پاستوریزه مربوط به شرکت الف	20	19	0
شیر پاستوریزه مربوط به شرکت ب	12	3	0
شیر پاستوریزه مربوط به سایر شرکت ها	18	7	0

Archive of SID

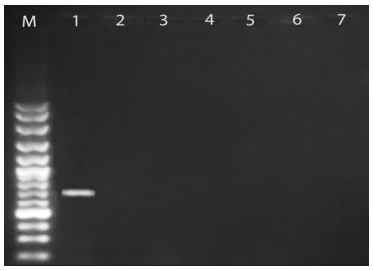
www.SID.ir



شکل 1. سایز مارکر شرکت فرمنتاس 100bp DNA Ladder plus ، 1: نمونه کنترل مثبت 2: کنترل منفی.



شکل 2. سایز مارکر شرکت فرمنتاس 100bp DNA Ladder plus ، 1: نمونه کنترل مثبت، نمونه های مشخص و به ترتیب شامل2:CFU 107 ، 3:CFU 106، 4: 105CFU، 5: 104 CFU، 6: 1000CFU، 7:CFU 100، 8: 10CFU، 9: کنترل منفی.



شکل 3. نتیجه ی تعیین اختصاصیت آزمون PCR بهینه شده : M: سایز مارکر شرکت فرمنتاس 100bp DNA Ladder plus ، 1: نمونه کنترل مثبت اشریشیا کلای، 2: DNAی انسان، 3: DNAی شیگلا، 4: DNAی پروتئوس، 5: DNAی سالمونلا، 6: کنترل منفی.

بحث

اشریشیاکلی یکی از ارگانیسم هایی است که از طرق مختلف می تواند وارد شیر شود و آلودگی ایجاد نماید از جمله از طریق آب آلوده ، پستان گاو ، شخص شیر دوش و تجهیزات شیردوشی و حمل شیر. حضور اشریشیا کلی دلالت بر آلودگی شیر به مدفوع انسانی یا حیوانی است و از آنجایی که این باکتری فلور طبیعی روده تمام حیوانات خونگرم می باشد ، حضور آن در شیر پاستوریزه نشانه ناسالم بودن برای مصرف کننده است(13-11). در مطالعات متعددی به ورود اشریشیا کلی به حالت زنده اما غیرقابل کشت به دلایل متعدد اشاره شده است ، دلایلی مانند گرسنگی ، انکوباسیون خارج از دمای بهینه رشد (در مورد اشریشیاکلی به ویژه انکوباسیون در دمای 5 درجه سانتی گراد) ، افزایش فشار اسمزی ، تابش های اکسیداتیو (نور سفید) و غیره همچنین اشاره شده است که برخی فرآیندها مانند پاستوریزاسیون شیر که برای باکتری ها به صورت باکتریسیدال عمل می کنند می توانند باعث باقی ماندن آن ها در حالت VBNC شوند (14). سیستم های پاستوریزاتور به روش CIP ، می تواند محرک خوبی برای ورود برخی ارگانیسم ها مانند اشریشیاکلی به این حالت باشد به طوری که در مورد شرکت الف که از بین 20 نمونه مورد ارزیابی در 19 نمونه PCR مثبت ارزیابی شده بود، تحقیقات ما نشان داد که از نانوسیل جهت ضدعفونی کردن سیستم پاستوریزاتور خود استفاده می نمایند. یافته ها حاکی از آن است که بیشترین آلودگی شیر خام به اشریشیاکلی مربوط به شهریور ماه و کم ترین آلودگی آن به Ecoli در بهمن و اسفند می باشد (15). بنابراین به نظر بهترین زمان برای بررسی آلودگی شیر به گونه های زنده اما غیر قابل کشت ماه های بهمن و اسفند می باشد چرا که اولاً دمای هوا در این ماه ها برای ورود اشریشیاکلی به حالت VBNC مناسب تر بوده و ثانیاً آلودگی بالا در ماه های گرم سال در جستجوی این گونه ها مشکل ایجاد نمی نماید. ابطحی و همکارانش در سال 1387 روش PCR را برای تشخیص آلودگی آب به اشریشیاکلی بهینه نمودند. در مطالعه ی آنها همانند این مطالعه از ژن 16s rRNA به عنوان ملکول هدف برای شناسایی اشریشیاکلی استفاده شده است. در مطالعه آنها برای جداسازی سلول باکتری ها از آب از فیلترهای نیترو استفاده شده است اما در این مطالعه روش ساده و کم هزینه جوشاندن مورد استفاده قرار گرفته است. غلظت عوامل PCR در تست آنها بسیار بالا می باشد (حجم نهایی مخلوط PCR 100 میکرولیتر) که هزینه ی بالایی را در بر دارد اما در این مطالعه حجم نهایی مخلوط PCR تا حجم 20 میکرولیتر کاهش داده شده است که در حدود 5 برابر در هزینه های تست کاهش ایجاد می نماید. سیکل حرارتی به کار رفته در تست دکتر ابطحی و همکارانش شامل 35 سیکل به همراه 10 دقیقه دناتوراسیون اولیه و 5

www.SID.ir
Archive of SID

دقیقه تکثیرنهایی می باشد که جمعاً 120 دقیقه به طول می انجامد که بسیار وقت گیر است، اما در این مطالعه با کاهش تعداد سیکل ها به 30 سیکل و حذف دناتوراسیون اولیه و کاهش زمان تکثیر نهایی به یک دقیقه کل زمان سیکل حرارتی به 55 دقیقه کاهش یافت. حساسیت تست مطالعه دکتر ابطحی و همکارانش در حدود 1 باکتری در حجم 1600 میلی لیتر اعلام شده است که حساسیت نسبتاً خوبی می باشد(16). همچنین در مطالعه دیگری که در سال 1389 توسط ابطحی و همکارانش صورت گرفت در تعیین اشریشیاکلی موجود در آب آشامیدنی از روش زنجیره ای پلی مرآز با نسخه برداری معکوس استفاده شد. مزیت این روش نسبت به PCR این است که این روش در شناسایی سلول های زنده کاراتر از روش PCR می باشد(17). عرب عامری و همکارانش در سال 1387 در بررسی آلودگی باکتریولوژیکی شیر خام و پاستوریزه در شهرستان شاهرود اعلام کردند که 61% شیرهای خام و 5% شیرهای پاستوریزه به اشریشیاکلی آلوده بودند. همچنین نشان دادند که آلودگی میکروبی شیرخام و پاستوریزه در هر فصل بطور معناداری با هم متفاوت است. در این مطالعه نیز از محیط ائوزین متیلن بلو آگار جهت شناسایی *اشریشیاکلی* استفاده شده است اما تعداد نمونه ها تقریباً دو برابر مطالعه مذبور است(18). جمشیدی و همکارانش در سال 2011 جهت شمارش اشریشیاکلی O157:H7 در شیر از ترکیب دو روش MPN و PCR استفاده نمودند. آنها *اشریشیاکلی* را به صورت شمارش شده در داخل شیر استریلیزه تلقیح کردند و سپس اقدام به بررسی آن با دو روش فوق نمودند. آن ها برای استخراج DNA از روش فنل کلروفرم استفاده کردند که روشی زمان بر است ولی احتمالاً موجب افزایش حساسیت تست می شود. آنها اعلام نمودند که روش MPN-PCR روشی حساس است که قادر است تا 10^1CFU/ml باکتری را شناسایی نماید اما روش MPN به تنهایی حداکثر قادر به شناسایی $2,4 \times 10^5$ در 100 میلی لیتر می باشد. در آن تحقیق از ژن های rfbO157 و flicH7 به عنوان مولکول هدف استفاده شد که با این مطالعه متفاوت است(19). تجزیه و تحلیل های آماری توسط نرم افزار SPSS و با کمک آزمون های فرض آماری نسبت های مستقل نشان داد که در مجموع 100 نمونه شیر خام و پاستوریزه با اطمینان 95 درصد می توان گفت که روش PCR در شناسایی اشریشیاکلی در شیر حساس تر عمل نموده است. همچنین تحلیل های آماری نشان داد که آلودگی در نمونه های تحویلی از مراکز جمع آوری به شکل معناداری بیشتر از سایر نمونه ها می باشد که دلیل عمده آن عدم رعایت بهداشت در دامداری های کوچک و با ظرفیت پایین است. در مورد شیرهای پاستوریزه تحلیل های آماری نشان داد که آلودگی بین شیرهای پاستوریزه شرکت های مختلف به شکل معناداری با هم متفاوت می باشد که این مسئله مبین کارآمدی متفاوت سیستم های پاستوریزاتور در کارخانجات مختلف است.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج می توان بیان نمود که روش PCR در مقایسه با روش های کشت متواتر دارای حساسیت بیشتری بوده و قادر به شناسایی اشریشیاکلی حای در شکلهای زنده اما غیر قابل کشت در شیر با ویژگی بالا و صرف زمان کم تر می باشد.

References

1. Akhavan sepahi A, lary pour M. *Escherichia coli*. Biology education growth. 2006; 20(2): 2-6.
2. Institute of Standards and Industrial Research of Iran. *Microbiology of milk and its products* . No 2406
3. Institute of Standards and Industrial Research of Iran. *counting of E.coli bye Most probable number technique*. No 5234
4. Sadeghifard N, Azizi Jalilian , Seidkhani A , Rostamzad A. *A study on Contamination of E.coli_and S.aureus in raw milk in Ilam during*. Journal of Ilam University of Medical Sciences Autumn 2006; 14(1)
5. Soltandalal M, Hoseini M . Comparison of Three Methods of Pour Plate (PP) ،*Most Probable Number (MPN) and Membrane Filter (MF) for Detection of Escherichia coliin Well Water Samples in Tehran's Parks in 2010*. mljgoums. 2009; 3 (2) :0-0
6. Shahhoseini M .*Principles of Molecular Recognition*.Shahreghods Publications.430p
7. Abtahi H, Ghannadzadeh MJ, Salmanian AH, Ghaznavi Rad E, Karimi M, Molaei N. *Improvement of PCR in detection of coliform in water pollution*. Journal of Arak University of Medical Sciences Autumn 2008; 11(3): 1-7.
8. Akbari A, et al. *Invasive E. coli strains isolated from children with diarrhea by polymerase chain reaction*. Journal of Ilam University of Medical Sciences Autumn 2011; 3(3) : 25-30
9. Ayatollahi J, et al. *Application of PCR For diagnosis of infectious diseases*. Journal of Shaheed Sadoughi University of Medical Sciences 2011; 18(6): 578-586
10. Barati B. *Microbiology Laboratory*. Jafary Publications . 460 p.
11. Bonyadian M, et al. *Study of Escherichia coli O157 contamination of raw milk in charmahal and bakhtiari city*. Veterinary Journal of Iran 2008; 3(2)
12. Pourahmad R, Fadaie V. *Dairy Industry 1* 2010 . varamin pishva Publications .229 p

Archive of SID
www.SID.ir

13. Sen K, L Sinclair J, Boczek L, Rice EW.*Development of a Sensitive Detection Method for Stressed E. coli O157:H7 in Source and Finished Drinking Water by Culture-qPCR*. Environ. Sci. Technol, 2011; 45 (6): 2250–2256.
14. Cihan D, Resit O, Önder D.2009. Viable but Non-Culturable State (VBNC) of Escherichia coli Related to EnvZ under the Effect of pH, Starvation and Osmotic Stress in Sea Water. Polish Journal of Microbiology; 58: 307-317.
15. Yarahmadi B, et al. *Study of total count, E. coli and coliforms contamination of raw milk from letdown stage till delivery to factory in Lorestan province*. Journal of lorestan University of Medical Sciences Autumn 2008; 10 (3)
16. Abtahi H, Ghannadzadeh MJ, Salmanian AH, Ghaznavi Rad E, Karimi M, Molaei N. *Improvement of PCR in detection of coliform in water pollution.* Journal of Arak University of Medical Sciences Autumn 2008; 11(3): 1-7
17. Abtahi H, Ghannazadeh MJ, Salmanian AH, Ghaznavi Rad E, Karimi M. *Efficacy of RT-PCR for the detection of E. coli in drinking water*. Faiz Journal 2010; 14(4).
18. Arab amery M. *Evaluation of bacterial contamination of raw and pasteurized milk in shahrood*. Shahid beheshti University of Medical Sciences Autumn 2007.
19. Jamshidi A, Mohammadi S, Mohammadi A. *Quantification of Escherichia coli O157:H7 in milk by most probable number-polymerase chain reaction (MPN-PCR) method*. African Journal of Microbiology Research, 2011; 5(26): 4588-4591.

Archive of SID

www.SID.ir