Archive of SID

پژوهش درپزشکی (مجله پژوهشی دانشکده پزشکی)
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
سال ۲۸، شماره ۳، صفحات ۲۱۵ تا ۲۱۸ (پاییز ۸۳)

Original Article

شناسایی لیستریا مونوسیتوژنز 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 مونوسیتوژنز می تواند عامل مننژیت و سپسیس در انسان باشد. این میکروارگانیسم از راه مواد غذایی منتقل می شود. شناسایی سریع و دقیق آن در پیشگیری از موارد عفونت نقش بسزایی دارد.*

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

یافته‌ها: *در تعیین حساسیت ا ین روش معلوم شد که شناسایی ۳۷CFU /m از باکتری در شیر امکان پذیر می باشد. DNA چندین باکتری دیگر به جز لیستریا مونوسیتوژنز نیز با پرایمرهای مورد استفاده مورد آزمون قرار گرفتند که در همه موارد نتیجه منفی بود.*

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

واژگان کلیدی: *لیستریا مونوسیتوژنز، شیر، PCR*

مقدمه

لیستریا مونوسیتوژنز می تواند عامل بالقوه مننژیت و سپسیس در انسان باشد. زنان حامله، نوزادان و افراد با نقص ایمنی مستعد ابتلا به عفونتهای این باکتری می باشند. همچنین افراد سالم ممکن است به این باکتری آلوده شوند (۲،۱). مهمترین روش انتقال این باکتری از راه مواد غذایی می باشد (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 (۷-۱،۳). از آنجائیکه این باکتری در همه جا یافت می شود، 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 فرآورده های 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 ۸-۷ روز زمان می باشد 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 گرفته اند (۳).

در مطالعه حاضر یک روش PCR سریع و حساس برای شناسایی این باکتری در محیط کشت غنی کننده از نمونه های 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 سوش های L. monocytogenes 4b که از انستیتو پاستور فرانسه تهیه شده بود، سوش های L. innocua و L. seeligeri که در آزمایشگاه از شیر خام جدا شده بود و E.coli به شماره

www.SID.ir

Archive of SID

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

برای تعیین ویژگی روش، DNA های استخراج شده از باکتریهای لیستریا مونوسیتوژنز، لیستریا سلیگری، استافیلوکوکوس اورئوس و E.coli مورد آزمون قرار گرفتند.

به منظور تعیین حساسیت، این عمل برای غلظتهای ۵ CFU[1]/ml، ۵۰،۵۰۰،۵۰۰۰،۵۰۰۰۰،۵۰۰۰۰۰،۵۰۰۰۰۰۰،۵۰۰۰۰۰۰۰ لیستریا مونوسیتوژنز 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 اولتراپاستوریزه (۹،۸) از نظر عدم آلودگی با لیستریا با استفاده از روشهای کشت مورد بررسی قرار گرفتند و پس از آن نمونه های با غلظتهای ۰/۳۷ CFU/ml، ۳/۷، ۳۷، ۳۷۰، ۳۷۰۰ و ۳۷۰۰۰ از لیستریا مونوسیتوژنز تهیه شد. برای تهیه این غلظت های رقیق شونده باکتری که در TSB رشد کرده بود به رقت های متوالی اضافه شد و به اندازه هر نمونه به آن شیر اضافه شد. پس از آن ۱۰ میلی لیتر از هر نمونه به ۹۰ میلی لیتر LEB[3] افزوده گردید. محیط کشت مغذی به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ 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 ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد. سپس رسوب حاصله با TE (10 mM Tris-pH=8، 1mM EDTA) سه بار به صورت ورتکس- سانتریفوژ شستشو داده شد. پس از آن، رسوب به دست آمده در ۰/۱ 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 ۰/۱ میلی لیتر از پروتئیناز K با غلظت ۴۰۰μg/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 سانتریفوژ شد. ۵۰ میکرولیتر از مایع رویی به لوله های جدید منتقل شد و برای استفاده در PCR در دمای ۲۰- درجه نگهداری شد.

PCR

PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد. ترکیب master mix به این شرح بود: بافرPCR×۱، ۲ میلی مولار $MgCl_2$، ۰/۲ میلی مول از هریک از dNTP، ۱ میکرومولار از هر پرایمر و ۰/۷۵ یونیت از DNA polmerase مقاوم به حرارت و یک میکرولیتر نمونه DNA. پرایمرهای مورد استفاده عبارت بودند از: LM1(5cctaagacgcaatgaa3) و LM2(5aagcgcttgcaactgctc3) 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 برنامه اضافه شد.

الکتروفورز در ژل آگاروز:

۱۵ میکرولیتر ازمحصول PCR همراه با loading buffer بر روی ژل آگاروز ۱/۵٪ بار شد و الکتروفورز انجام شد. مدت الکتروفورز ۳۰ دقیقه و ولتاژ آن ۱۰۰ ولت بود. DNA نمونه ها 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 ژل ها با ترانسلومیناتور اشعه فرابنفش و سیستم ژل داک[4] مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها

اختصاصیت 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 مونوسیتوژنز از اختصاصیت بالایی برخوردار بودند. (شکل ۱)

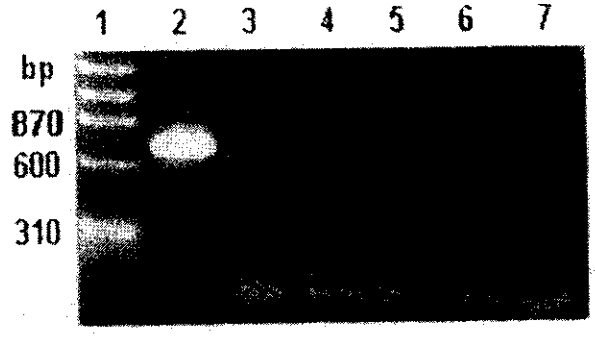
حساسیت PCR

روش PCR قادر بود که فقط مقدار ۵۰۰۰۰۰ CFU/ml از باکتری را به صورت مستقیم در محیط TSB شناسایی نماید. این در حالیست که وقتی محیط های غنی ساز مورد استفاده قرار گرفت، با روش PCR مقدار۳۷CFU/ml از باکتری قابل شناسایی بود. نتایج در شکل ۲ آورده شده است.

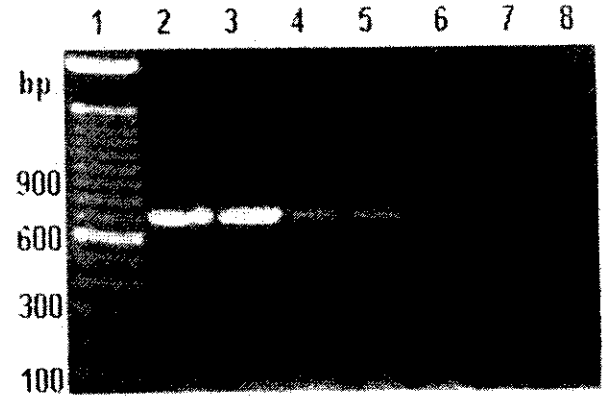
[1] Colony forming unit
[2] Trypticase Soy Broth-Difco
[3] Listeria Enrichment Broth
[4] gel documentation

www.SID.ir

Archive of SID



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



شکل ۲- نتایج PCR نمونه های شیرکه پس از تلقیح باکتری لیستریا مونوسیتوژنز به محیط کشت غنی ساز وارد شده بودند. DNA استخراج شده از باکتریها در ژل 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 مونوسیتوژنز تلقیح شده اند. ستون ۲ CFU/ml ۳۷۰۰۰، ستون ۳ ۳۷۰۰CFU/ml، ستون ۴ ۳۷۰ CFU/ml، ستون ۵ ۳۷ CFU/ml، ستون ۶ ۳/۷CFU/ml، ستون ۷ ۰/۳۷CFU/ml و ستون ۸ کنترل منفی (نمونه شیر اولتر پاستوریزه که از نظر عدم وجود باکتری با روش های استاندارد کشت تست شده است).

بحث

در سالهای اخیر PCR برای شناسایی لیستریا مونوسیتوژنز در مواد غذایی مورد استفاده قرار گرفته است. انجام این کار برای مواد غذایی دارای مشکلات تکنیکی می باشد که احتمالا 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 مونوسیتوژنز 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 PCR ژن listeriolysin O و پرایمرهای LM1/LM2 برای تکثیر قطعه ای به طول ۷۰۲ جفت باز در این ژن به کار رفته است. Border و همکاران در تحقیق خود گزارش کرده اند که ترکیب این دو پرایمر برای ردیابی لیستریا مونوسیتوژنز اختصاصی است (۱۱). به علاوه مشخص شده است که این ژن در پاتوژنز این باکتری نقش مهمی را ایفا می کند این ژن 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 مستقیما 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 مستقیما از روی نمونه های شیر با این روش ساده ردیابی شود. Fuerrer و همکاران (۱۰) یک روش شناسایی برای این

www.SID.ir

Archive of SID

باکتری در نمونه های شیر به مقدار ۱۰CFU/ml ابداع نمودند. اگرچه در این روش باز هم به علت وجود باکتریهای مرده احتمال وجود مثبت کاذب وجود دارد.

روش ما قادر است مقدار۵۰۰۰۰۰CFU/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.

سطح آلودگی با این باکتری در شیرهای آلوده کمتر از ۱۰۰۰CFU/ml می باشد (۱۷). در این مطالعه روش به کار رفته می تواند ۳۷CFU/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.

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, Hoefelein 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.

www.SID.ir