Archive of SID

مجله تحقیقات دامپزشکی
دوره ۷۵، شماره ۱، ۱۳۹۹، ۶۴-۵۷
مقاله پژوهشی

بکارگیری تکنیک نوین ترکیب PCR کمی با پروپیدیوم مونوآزید جهت شمارش *استافیلوکوکوس اورئوس* انتروتوکسیژنیک در محصولات خامه‌ای قنادی

مریم عزیزخانی، فهیمه توریان

گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تخصصی فن آوری‌های نوین آمل، آمل، ایران

10.22059/jvr.2018.241840.2721

تاریخ دریافت: ۱۰ شهریور ماه ۱۳۹۸ **تاریخ پذیرش:** ۱۹ آبان ماه ۱۳۹۸

چکیده

زمینهٔ مطالعه: *استافیلوکوکوس اورئوس* یکی از پاتوژن‌های مهم انسانی است که عامل بروز عفونت بوده و نیز با تولید انواع مختلف انتروتوکسین‌ها موجب مسمومیت‌های غذایی می‌گردد. استفاده از روش‌های معمول کشت جهت شمارش *استافیلوکوکوس اورئوس* دارای محدودیت‌هایی مانند مدت زمان طولانی برای رشد باکتری و فقدان حساسیت و دقت لازم در مورد سلول‌های زنده غیرقابل کشت می‌باشد.

هدف: هدف از انجام این پژوهش جستجو و شمارش *استافیلوکوکوس اورئوس* تولید کننده انتروتوکسین‌های A-E در محصولات خامه‌ای قنادی با استفاده از روش PCR زمان واقعی در ترکیب با پروپیدیوم مونوآزید (PMA) جهت تفکیک سلول‌های زنده از مرده بود.

روش‌کار: تعداد ۱۰۰ نمونه شیرینی خامه‌ای به مدت ۲ ماه و به صورت تصادفی از کارگاه‌های قنادی شهر آمل تهیه شد. پس از تهیه رقت از نمونه، پلت‌های باکتریایی جداسازی و قبل از استخراج DNA، با PMA تیمار شدند. PCR زمان واقعی جهت شمارش کل سلول‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و نیز سویه‌های انتروتوکسیژنیک آن با استفاده از پرایمرهای اختصاصی انجام شد.

نتایج: نتایج شمارش کشت معمولی به نتایج PMA-qPCR بسیار نزدیک بود ($P>0/05$)، لیکن داده‌های به دست آمده از qPCR که مجموع سلول‌های مرده و زنده را شمارش می‌نماید از نتایج دو روش دیگر تعداد بیشتری باکتری را نشان داد. حساسیت روش به کار رفته در این مطالعه جهت جستجوی تعداد اندک *استافیلوکوکوس اورئوس* (کمتر از ۱۰سلول در گرم) قابل ملاحظه به نظر می‌رسد.

نتیجه‌گیری نهایی: یافته‌ها نشان داد که استفاده از PCR در ترکیب با PMA نتایج قابل اعتمادتری نسبت به روش معمولی کشت حاصل می‌نماید. با توجه به مدت زمان کوتاه حصول نتایج، اختصاصی بودن و حساسیت قابل ملاحظه این روش امید است در آینده نزدیک در آزمایشگاه‌های کنترل کیفیت مواد غذایی دستگاه‌های نظارتی به کار گرفته شود.

کلمات کلیدی: *استافیلوکوکوس اورئوس*، پروپیدیوم مونوآزید، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، محصولات قنادی، مسمومیت

کپی‌رایت © تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است.

نویسنده مسئول: مریم عزیزخانی، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تخصصی فن آوری‌های نوین آمل، آمل، ایران
پست الکترونیکی: *m.azizkhani@ausmt.ac.ir*

مقدمه

باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* یکی از مهمترین باکتری‌های بیماریزا برای انسان و دام به شمار می‌رود که انواع مختلفی از انتروتوکسین‌ها را تولید می‌کند و در میان توکسین‌های خارج سلولی (اگزوتوکسین‌ها)، توکسین‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* بالاترین پتانسیل ایجاد مسمومیت را دارند. در حال حاضر بیش از ۱۵ انتروتوکسین استافیلوکوکی شناخته شده است. این انتروتوکسین‌ها، اگزوپروتئین‌های مقاوم به حرارت با وزن مولکولی ۲۶۰۰۰ تا ۳۰۰۰۰ دالتون هستند که سندرم گاستروانتریت در انسان ایجاد می‌کنند. زنجیرهای پلی‌پپتیدی منفرد توسط یک پل دی سولفیدی به یکدیگر متصل شده و حلقه سیستینی ویژه‌ای را به وجود می‌آورند و تصور می‌شود که این حلقه قسمت سمی مولکول باشد. از بین انتروتوکسین‌های مختلف نوع A و D اغلب عامل مسمومیت‌های غذایی هستند و

www.SID.ir

Archive of SID

انتروتوکسین A در ایجاد مسمومیت غذایی نسبت به سایر انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی بیشترین نقش را دارد (۱).

بیماری‌های ناشی از غذا یکی از شایع‌ترین و عمده‌ترین مشکلات بهداشتی – تغذیه‌ای در جهان امروز است که مواد غذایی مختلف در ایجاد آن دخیل می‌باشند. از جمله مواد غذایی که آلودگی آن موجب بروز مسمومیت‌های شدید می‌شود فرآورده‌های قنادی به خصوص شیرینی‌های حاوی خامه هستند. فرآورده‌های قنادی بخش مهمی از تولیدات غذایی خرده فروشی را در کشور تشکیل می‌دهند. با توجه به بالا بودن مصرف شیرینی‌های خامه‌دار ضروری است که کنترل‌های بهداشتی و میکروبیولوژیکی به منظور بالا بردن زمان ماندگاری و حفظ کیفیت این فرآورده‌ها و در نهایت تامین سلامت مصرف‌کنندگان اعمال گردد. با توجه به گزارشات موارد متعدد در رابطه با عفونت‌ها و مسمومیت‌های ناشی از مصرف مواد غذایی آلوده و اهمیت انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی در بهداشت عمومی و بخش‌های غذایی، توجه به سلامت غذا و ارائه راهکارهایی جهت حفظ هر چه بیشتر سلامت مواد غذایی در جامعه رو به گسترش است.

استفاده از روش‌های سنتی کشت دارای نواقصی از جمله مدت زمان نسبتاً طولانی برای رشد باکتری و فقدان حساسیت لازم در مورد سلول‌های زنده غیر قابل کشت می‌باشد (۱۱). همچنین، نمی‌توان سویه‌های تولیدکننده انتروتوکسین را از سویه‌های غیر مسمومیت‌زا تشخیص داد. PCR زمان واقعی به عنوان یک روش جایگزین امکان تشخیص و تعیین کمی سریع، حساس و اختصاصی عوامل بیماریزا را فراهم می‌آورد. علاوه بر این، این تکنیک از طریق پیش تیمار نمونه با عوامل متصل شونده به DNA مانند پروپیدیوم مونو آزید، قادر به تمایز بین DNA سلول‌های مرده و زنده می‌باشد (۱۹). از آنجا که پروپیدیوم مونوآزید تنها به درون غشاهای سلولی آسیب‌دیده نفوذ می‌نماید، این تکنیک بر اساس سالم بودن یا آسیب دیده بودن سلول‌های باکتریایی عمل می‌نماید (۱۴). پیش تیمار نمونه با پروپیدیوم مونوآزید (PMA) و سپس انجام PCR کمی به طور موفقیت‌آمیزی برای تشخیص پاتوژن‌های باکتریایی مانند *لیستریامونوسیتوژنز* (۱۷)، *اشرشیاکلی* O157:H7 (۶،۷) و *کامپیلوباکتر ژژونی* (۹) به کار رفته است. نکته قابل ملاحظه در خصوص این روش آنست که PMA در مورد همه سلول‌های باکتریایی یکسان عمل نمی‌کند و در برخی موارد نتایج دور از واقعیت می‌باشد. لذا تأثیرگذاری PMA بر باکتری‌های مختلف باید به طور اختصاصی برای هر باکتری بررسی گردد. معدودی از مطالعات به جستجوی *استافیلوکوکوس اورئوس* در مواد غذایی پرداخته‌اند لیکن هنوز گزارشی مبنی بر بررسی وضعیت آلودگی نمونه‌های واقعی مواد غذایی جمع آوری شده از بازار مصرف جهت اهداف نظارتی و کنترل بهداشتی در دسترس نیست (۲،۴،۲۱). در این مطالعه به جستجو و شمارش *استافیلوکوکوس اورئوس* تولید کننده انتروتوکسین‌های A-E در محصولات خامه‌ای قنادی با استفاده از روش نوین PCR کمی در ترکیب با پروپیدیوم مونوآزید جهت تفکیک سلول‌های زنده از مرده و شمارش دقیق‌تر و نزدیک به واقعیت باکتری پرداخته شد.

مواد و روش کار

تهیه نمونه: تعداد ۱۰۰ نمونه شیرینی خامه‌ای به مدت ۲ ماه و به صورت تصادفی از کارگاه‌های قنادی شهر آمل تهیه شد. نمونه‌ها در شرایط و ظروف استریل و درکنار کیسهٔ یخ به آزمایشگاه منتقل و تا زمان انجام آزمایشات دریخچال در دمای ۱±۴ درجه سانتیگراد (کمتر از ۲۴ ساعت) نگهداری شدند.

تهیه مواد شیمیایی: کلیه مواد شیمیایی و محیط‌های کشت از شرکت مرک (دارمستاد، آلمان) تهیه شد.

شمارش باکتری نمونه‌ها در محیط کشت: نسبت ۱ به ۱۰ از نمونه‌ها در محلول رینگر استریل تهیه شد، از رقت‌های مختلف آن بر روی محیط کشت اختصاصی (برد پارکر آگار) کشت و به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در ۳۵ درجه سانتیگراد گرمخانه‌گذاری گردید. کلنی‌های سیاه رنگ، براق و انحنادار شمارش و در ادامه آزمون‌های تاییدی (کشت در محیط مانیتول سالت آگار و تست کاتالاز و کواگولاز) انجام شد.

تیمار با پروپیدیوم مونوآزید: اسلوری نمونه‌ها با نسبت ۱ به ۱۰ در محلول رینگر در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه در ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ و پلت باکتریایی جداسازی گردید. پروپیدیوم مونوآزید (PMA) در دی‌متیل سولفوکساید ۲۰ درصد جهت به دست آوردن محلول استوک ۲۰ میلی مول حل و تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد در تاریکی نگهداری شد. محلول استوک به ۵۰۰ میکرولیتر از پلت باکتری تا رسیدن به غلظت نهایی ۱۵۰ میکرومول افزوده

www.SID.ir

Archive of SID

شد (این غلظت بر اساس نتایج آزمون‌هایی که با غلظت‌های مختلف PMA برای *استافیلوکوکوس اورئوس* انجام شده بود به دست آمد). پس از افزودن PMA، نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در تاریکی در دمای اتاق قرار گرفته و برای افزایش نفوذ PMA به سلول تکان داده شد. سپس، نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با استفاده از سیستم فعال سازی نوری در معرض نور قرار گرفتند. پس از ایجاد اتصالات عرضی از طریق القای نوری، سلول‌ها در ۷۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه در۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ شده و محلول رویی دور ریخته شد. پلت به دست آمده برای جداسازی DNA مورد استفاده قرار گرفت (۲).

استخراج DNA: محلول استخراج Tripure (Roche, United States) جهت استخراج DNA به کار رفت و کلیه مراحل مطابق دستورالعمل شرکت تولید کننده انجام شد.

انجام PCR: پرایمرهای به کار رفته جهت انجام PCR (جدول ۱) از شرکت تکاپوزیست (تهران، ایران) تهیه شد. جهت به دست آوردن منحنی ذوب پرایمرها دامنه حرارتی ۹۵-۷۰ درجه سانتیگراد با شیب ۱ درجه سانتیگراد در دقیقه اعمال شد. واکنش Real Time PCR جهت جستجوی ژن مولد انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی با استفاده از محلول Power SYBR Green (ایالات متحده Applied Biosystems,) انجام شد، مستر میکس تهیه شده شامل پرایمرهای forward و reverse به میزان ۱ میکرولیتر، الگوی DNA (غلظت نهایی ۱۰ نانوگرم در میکرولیتر)، ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس Power SYBR Green و آب فاقد نوکلئاز بود. واکنش در یک ترموسایکلر ABI PRISM 7,500 Sequence Detection System, Applied Biosystems, انجام شد. شرایط چرخه حرارتی واکنش به صورت زیر بود: یک سیکل در ۵۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه، یک سیکل در ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه، ۴۰ چرخه در ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ ثانیه و ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه.

آنالیز آماری نتایج حاصله: داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۲، نمودار فراوانی و مربع کای مورد آنالیز قرار گرفت. جهت اطمینان از تکرارپذیری نتایج، تیمار نمونه‌ها در سه تکرار انجام شد.

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده جهت بررسی فراوانی ژن‌های مولد انتروتوکسین در *استافیلوکوکوس اورئوس*.

نام پرایمر	توالی (5'→3')	طول (bp)	مرجع
sea-F	ATGGTGCTTATTATGGTTATC	۱۲۰	(۱۲)
sea–R	CGTTTCCAAAGGTACTGTATT		
seb-F	GTATGGTGGTGTAACTGAGC	۱۶۴	(۱۳)
seb–R	CCAAATAGTGACGAGTTAGG		
sec-F	TTTTTGGCACATGATTTAATTT	۲۵۷	(۱۲)
sec–R	CAACCGTTTTATTGTCGTTG		
sed-F	CCAATAATAGGAGAAAATAAAAG		(۱۳)
sed–R	ATTGGTATTTTTTTTCGTTC		
see-F	CAGTACCTATAGATAAAGTTAAAACAAGC	۱۷۸	(۱۲)
see–R	TAACTTACCGTGGACCCTTC		
16S rRNA-F	GCTGCCCTTTGTATTGTC	۲۷۸	(۱۴)
16S rRNA –R	AGATGTTGGGTTAAGTCCC		

جدول ۲. نتایج شمارش *استافیلوکوکوس اورئوس* (لگاریتم واحدهای تشکیل دهنده کلنی در گرم) در نمونه‌های شیرینی به روش کشت معمولی، qPCR و PMA-qPCR.

زمان نمونه گیری	کشت معمولی	qPCR	PMA-qPCR
هفته اول	۲/۷±۰/۲۵*^{a}	۳/۲±۰/۱۶^{b}	۲/۸۱±۰/۲۷^{a}
هفته دوم	۲/۸۵±۰/۱۸^{a}	۳/۷۱±۰/۲۳^{b}	۲/۷۸±۰/۲۴^{a}
هفته سوم	۲/۶۵±۰/۳۱^{a}	۳/۵۲±۰/۱۵^{b}	۲/۷۲±۰/۱۹^{a}
هفته چهارم	۲/۸۳±۰/۱۲^{a}	۳/۹۱±۰/۳۵^{b}	۲/۹±۰/۳۲^{a}
هفته پنجم	۱/۹۱±۰/۱۹^{a}	۲/۷۷±۰/۲۱^{b}	۱/۸۵±۰/۱۵^{a}
هفته ششم	۱/۸۰±۰/۳^{a}	۲/۶۹±۰/۲۶^{b}	۱/۹۱±۰/۲۱^{a}
هفته هفتم	۲/۵۹±۰/۲۲^{a}	۳/۸۲±۰/۱۳^{b}	۲/۶۳±۰/۳۵^{a}
هفته هشتم	۲/۷۵±۰/۱۷^{a}	۲/۹۱±۰/۲۰^{b}	۲/۸۴±۰/۱۱^{a}

*حروف انگلیسی در هر سطر نشان دهنده تفاوت معنادار بین داده‌های آن سطر می باشد($P<0/05$).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳. نتایج شمارش *استافیلوکوکوس اورئوس* انتروتوکسیژنیک (لگاریتم واحدهای تشکیل دهنده کلنی در گرم) در نمونه‌های شیرینی به روش qPCR و PMA-qPCR.

نوع انتروتوکسین	PMA-qPCR	qPCR
SEA	۱/۷۲±۰/۱۱^{*a}	۱/۰۳±۰/۱۶^{b}
SEB	۰	۰
SEC	۱/۸۵±۰/۲^{a}	۱/۲±۰/۱۴^{b}
SED	۰/۶۵±۰/۱۹^{a}	۰/۱۱±۰/۰۸^{b}
SEE	۱/۳۷±۰/۱۵^{a}	۰/۹۰±۰/۰۴^{b}
فاقد انتروتوکسین	۲/۰۵±۰/۱۸^{a}	۱/۵۳±۰/۱۳^{a}

*حروف انگلیسی در هر سطر نشان دهنده تفاوت معنادار بین داده‌های آن سطر می باشد ($P<۰/۰۰۵$).

نتایج

نتایج شمارش *استافیلوکوکوس اورئوس* در نمونه‌ها به روش‌های کشت معمولی، qPCR و PMA-qPCR در جدول ۲ آمده است. همانطور که نتایج نشان می‌دهد، نتایج شمارش با کشت معمولی به نتایج PMA-qPCR بسیار نزدیک است ($P>۰/۰۵$)، لیکن داده‌های به دست آمده از qPCR که مجموع سلول‌های مرده و زنده را شمارش می‌نماید از نتایج دو روش دیگر تعداد بیشتری باکتری را نشان می دهد ($P<۰/۰۵$). تعداد سلول‌های مرده با تفریق تعداد سلول‌های زنده (نتایج qPCR-PMA) از تعداد کل سلول‌ها (نتایج qPCR) به دست می‌آید.

نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که روش PMA-qPCR قادر است سلول‌های زنده *استافیلوکوکوس اورئوس* را در ماده غذایی تشخیص داده و شمارش نماید و سلول‌های مرده را از تولید سیگنال بازدارد. در جدول ۳ تعداد سلول‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* حامل ژن‌های انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی که به روش qPCR و PMA-qPCR شمارش گردیده‌اند، آورده شده است.

بحث

کارآیی روش جدید PMA-qPCR در مواد غذایی تلقیح شده به طور مصنوعی مانند سبزیجات و سالاد، شیر پاستوریزه، غلات مورد استفاده در غذای کودک و برنج مورد بررسی قرار گرفته است، لیکن معدودی از مطالعات به طور مستقیم به بررسی وضعیت آلودگی ماده غذایی پرداخته‌اند. از آنجا که *استافیلوکوکوس اورئوس* بیماریزا و مولد انتروتوکسین می‌باشد، جستجوی آن در مواد غذایی از جنبه ایمنی و بهداشت بسیار حائز اهمیت است. تکنیک به کار رفته در این مطالعه واجد پتانسیل جستجو و شمارش سلول‌های زنده *استافیلوکوکوس اورئوس*، تمایز میان *استافیلوکوکوس اورئوس* توکسین‌زا و غیر توکسین‌زا و نیز جستجوی سویه‌های زنده *استافیلوکوکوس اورئوس* مولد پنج انتروتوکسین شایع استافیلوکوکی (A-E) می‌باشد. همچنین، این تکنیک ابزار مناسبی جهت ارزیابی وضعیت آلودگی مواد غذایی به انواع *استافیلوکوکوس اورئوس* انتروتوکسیژنیک می‌باشد. در برخی از مطالعات از اتیدیوم مونوآزید (EMA) جهت تفکیک سلول‌های زنده از مرده استفاده شده است، اما جمع بندی نتایج مطالعات مختلف نشان می‌دهد PMA دارای قدرت نفوذ انتخابی بیشتری به داخل سلول‌های مرده با دیواره سلولی آسیب دیده می‌باشد لیکن EMA علاوه بر سلول‌های مرده می‌تواند به داخل سلول‌های زنده نیز نفوذ نماید (۲۰).

مطابق استاندارد ملی ایران (۷)، تعداد *استافیلوکوکوس اورئوس* در یک دهم گرم شیرینی تر باید صفر باشد. با توجه به اینکه تعداد باکتری برای تولید میزان توکسین مورد نیاز جهت ایجاد مسمومیت غذایی استافیلوکوکی بیشتر از $۱۰^{۶}$ واحد تشکیل دهنده کلنی در گرم می‌باشد (۷)، حساسیت روش به کار رفته در این مطالعه جهت جستجوی تعداد اندک *استافیلوکوکوس اورئوس* (کمتر از ۱۰ واحد تشکیل دهنده کلنی در گرم) می‌باشد قابل ملاحظه به نظر می‌رسد. داده‌های به دست آمده از qPCR که مجموع سلول‌های مرده و زنده را شمارش نموده است از نتایج دو روش دیگر (کشت معمولی و PMA-qPCR) تعداد بیشتری باکتری را نشان می‌دهد. PMA فاقد توانایی حذف سیگنال‌ها از سلول‌های زنده می‌باشد بدین ترتیب سلول‌های مرده با افزودن PMA طی PMA-qPCR شمارش نمی‌گردند (۲۲). حساسیت روش PMA-qPCR برای سلول‌های مختلف باکتریایی متفاوت است و مطالعات مختلف برای جنس‌ها و گونه‌های مختلف باکتریایی نتایج متفاوتی را گزارش می‌نمایند.

نتایج مطالعه Kobayashi و همکاران در سال ۲۰۰۹ طی بررسی توانایی PMA در تمایز سلول‌های سالم از سلول‌های مرده *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیس* نشان داد که

www.SID.ir

Archive of SID

PMA از تولید سیگنال توسط سلول‌های آسیب دیده و مرده جلوگیری نموده است و داده‌های qPCR منعکس کننده تعداد باکتری‌های زنده بدون تأثیرپذیری از حضور سلول‌های مرده می‌باشد (۱۰).

Elizaquível و همکاران در سال ۲۰۱۳ به ارزیابی تأثیر ضدمیکربی اسانس آویشن شیرازی بر باکتری‌های *اشرشیاکلی* O157:H7، *سالمونلا انتریکا* و *لیستریا مونوسیتوژنز* در سبزیجات برگی پرداخته و جهت شمارش انتخابی سلول‌های زنده از تکنیک PMA- qPCR استفاده نمودند. نتایج مطالعه ایشان نشان داد که روش فوق به طور کارایی تنها باکتری‌های بیماریزای زنده را جستجو می‌نماید (۴). داده‌های به دست آمده در مطالعه حاضر نیز کارایی این تکنیک را در شمارش سلول‌های زنده *استافیلوکوکوس اورئوس* تائید می‌نماید. اما چنانکه پیش‌تر ذکر گردید تکنیک qPCRدر ترکیب باPMA در مورد همه سلول‌های باکتریایی با کیفیت یکسان عمل نمی‌کند و در برخی موارد نتایج با نتایج حاصل از کشت معمولی قرابت ندارد. به طور مثال در مطالعه Azizkhani در سال ۲۰۱۶ تأثیر ضد میکربی اسانس آویشن شیرازی بر باکتری‌های بیماریزای گوشت چرخ شده با استفاده از روش PMA-qPCR مورد ارزیابی قرار گرفت. مطابق نتایج به دست آمده برای ترکیب‌های مختلف سلول‌های زنده و مرده در گوشت چرخ شده تلقیح شده به طور مصنوعی، تعداد باکتری‌ها در گوشت چرخ‌شده $۳/۲۷ \times ۱۰^{۴}$ واحد تشکیل دهنده کلنی در گرم بود. مقادیر به دست آمده از PMA-qPCR برای *سالمونلا انتریکا* و *اشرشیاکلی* O157:H7، با تعداد سلول‌های زنده شمارش شده روی پلیت مرتبط بود. لیکن در خصوص *لیستریامونوسیتوژنز*، تعداد سلول‌های زنده در همه موارد بیشتر از تعداد واقعی تخمین زده شد و برای نمونه حاوی ۱۰۰ درصد سلول‌های مرده، تکنیک PMA-qPCR همچنان وجود ۳/۸ درصد سلول زنده را نشان می داد (۲). احتمال می‌رود که تکنیک PMA-qPCR که در خصوص برخی از باکتری‌ها با کارایی و اعتمادپذیری بالا عمل می‌کند در مورد برخی دیگر کاربردی نباشد. در این رابطه نتایج مشابهی توسط Lovdal و همکاران در سال ۲۰۱۱ به دست آمد (۱۲). به نظر می‌رسد علت این امر تفاوت‌های جزیی در دیواره سلولی و گرم مثبت یا گرم منفی بودن باکتری باشد (۱۶).

Zhang و همکاران در سال ۲۰۱۴، جهت تفکیک سلول‌های زنده از مرده و حذف سیگنال‌های کاذب حاصل از DNA سلول‌های مرده طی شمارش باکتری *باسیلوس سرئوس* از روش PCR multiplex همراه با PMA استفاده نمودند. محدوده جستجو برای سلول‌های مرده *باسیلوس سرئوس* بدون تیمار با PMA در کشت خالص باکتری ۴×۱۰^{۲} واحد تشکیل دهنده کلنی در میلی لیتر، $۷/۵ \times ۱۰^{۱}$ واحد تشکیل دهنده کلنی در میلی لیتر برای سلول‌های زنده *باسیلوس سرئوس* بدون تیمار با PMA و $۷/۵ \times ۱۰^{۱}$ واحد تشکیل دهنده کلنی در میلی لیتر برای سلول‌های زنده *باسیلوس سرئوس* تیمارشده با PMA بود. مطابق نتایج این مطالعه روش PCR multiplex در ترکیب با PMA، ابزار ارزیابی سریع، مطمئن و واجد کارایی تشخیصی بالا در کنترل میکربی نمونه‌های غذایی می‌باشد (۲۲). Forghani و همکاران در سال ۲۰۱۵ نیز پژوهشی مشابه جهت شمارش سلول‌های زنده *باسیلوس سرئوس*، سویه‌های انتروتوکسین‌زا و تهوع‌زا، در مواد غذایی انجام دادند. یافته‌ها نشان داد که استفاده از PCR در ترکیب با PMA نتایج قابل اعتمادتری نسبت به روش معمولی کشت حاصل می‌نماید (۶). در پژوهش حاضر نیز اختلاف معناداری میان داده‌های حاصل از شمارش به روش کشت معمولی و PMA-qPCR مشاهده نشد.

Zhang و همکاران در سال ۲۰۱۵ از تکنیک PMA-qPCR جهت جستجو و شمارش سلول‌های زنده *استافیلوکوکوس اورئوس* در شیر خشک و محصولات گوشتی تلقیح شده با باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس* و *سالمونلا انتریکا* استفاده نمودند. نتایج نشان داد که تیمار سلول با PMA قبل از استخراج DNA موجب حذف نتایج مثبت کاذب با تاثیر بسیار ناچیز بر سلول‌های زنده می‌گردد. آستانه جستجو و شمارش در مطالعه ایشان $۳/۰ \times ۱۰^{۲}$ واحد تشکیل دهنده کلنی در گرم شیر خشک بود (۲۱). در حالی که در پژوهش حاضر قدرت جستجو بالاتر بود. ممکنست بالا بودن تعداد و تنوع میکروارگانیسم‌های موجود در نمونه به عنوان عامل مداخله‌گر و کاهش‌دهنده حساسیت تکنیک عمل نماید. واضح است که انجام مطالعات بیشتری جهت بررسی این مساله نیاز است.

نتیجه گیری: به طور کلی با توجه به نتایج به دست آمده، تکنیک PMA-qPCR روشی کارآ و سریع جهت شمارش سلول‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* در مواد غذایی می‌باشد. این روش به عنوان ابزار تشخیصی قابل اعتماد و دارای دقت و حساسیت بالا و هزینه نه چندان زیاد قابلیت کاربرد در آنالیز میکربی مواد غذایی و نیز تشخیص‌های بالینی را دارد. در کلیه مطالعات انجام شده توسط سایر محققین که پیش‌تر به آن‌ها اشاره شد تأثیر بازدارندگی PMA از تولید سیگنال توسط سلول‌های مرده طی qPCR مورد تأیید قرار گرفته است اما هیچ کدام از این پژوهش‌ها

www.SID.ir

Archive of SID

روش PMA-qPCR را در نمونه‌های بالینی یا غذایی جهت کاربرد واقعی این تکنیک و یا بررسی وجود سویه‌های انتروتوکسیژنیک *استافیلوکوکوس اورئوس* در مواد غذایی عرضه شده در بازار مصرف گزارش ننموده‌اند. این مطالعه نخستین کاری است که در راستای اهداف نظارتی و کنترل کیفیت مواد غذایی در سطح وسیع انجام شده و با توجه به مدت زمان کوتاه حصول نتایج و صحت و دقت قابل ملاحظه این روش امید است در آینده نزدیک در آزمایشگاه‌های کنترل کیفیت مواد غذایی دستگاه‌های نظارتی به کار گرفته شود.

سپاسگزاری

این طرح تحقیقاتی با استفاده از اعتبارات ویژه پژوهشی (گرنت شماره ۸/۴۳۷/پ) دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل انجام گردیده است.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. Akinedan, O., Hassan, A.A., Schneider, E., Usleber, E. (2008). Entrotoxigenic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from goat's milk cheese. Int J Food Microbiol, 124(2), 211-216. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.027 PMID: 18455257
2. Azizkhani, M. (2016). Evaluation of antimicrobial effect of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil on food-borne pathogens in minced beef combining real time-PCR and propidium monoazide. J Food Process Preserv, 7, 97-118.
3. Azizkhani, M., Misaghi, A., Basti, A.A., Gandomi, H., Hosseini, H. (2013). Effects of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil on growth and gene expression of enterotoxins A, C and E in *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Int J Food Microbiol, 166, 249–255. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.02.020 PMID: 23558199
4. Elizaquível, P., Azizkhani, M., Sánchez, G., Aznar, R. (2013). Evaluation of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil activity against *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* by propidium monoazide quantitative PCR in vegetables. Food Control, 34, 770-776. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.06.036
5. Elizaquivel, P., Sanchez, G., Aznar, R. (2012). Quantitative detection of viable foodborne *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and Salmonella in fresh-cut vegetables combining propidium monoazide and real-time PCR. Food Control, 25, 704-708. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.12.003
6. Forghani, F., Langaee, T., Eskandari, M., Seo, K.H., Chung, M.J., Oh, D.H. (2015). Rapid detection of viable *Bacillus cereus* emetic and enterotoxic strains in food by coupling propidium monoazide and multiplex PCR (PMA-mPCR). Food Control, 55, 151-157. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.02.049
7. Iranian Standard of microbiological characteristics of Pastry products (No 2395). (1993). Institute of Standards and Industrial Research of Iran. Tehran, Iran.
8. Jay, J.M., Loessner, M.J., Golden, D.A. (2005). Modern Food Microbiology. (7th ed.). Springer. New York, USA. p. 531.
9. Josefsen, M.H., Lofstrom, C., Hansen, T.B., Christensen, L.S., Olsen, J.E., Hoorfar, J. (2010). Rapid quantification of viable Campylobacter bacteria on chicken carcasses, using real time PCR and propidiummonoazide treatment, as a tool for quantitative risk assessment. Appl Environ Microbiol,76(15), 5097-5104. https://doi.org/10.1128/AEM.00411-10 PMID: PMC2916463
10. Kobayashi, H., Oethinger, M., Tuohy, M.J., Hall, G.S., Bauer, T.W. (2009). Improving clinical significance of PCR: use of propidium monoazide to distinguish viable from dead *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. J Orthop Res, 27(9), 1243-1247. https://doi.org/10.1002/jor.20872 PMID: 19322790
11. Kramer, M., Obermajer, N., Bogovic, M.B., Rogelj, I., Kmetec, V. (2009). Quantification of live and dead probiotic bacteria in lyophilised product by real-time PCR and by flow cytometry. Appl Microbiol Biotechnol, 84(6), 1137-1147. https://doi.org/10.1007/s00253-009-2068-7 PMID: 19529931
12. Lovdal, T., Hovda, M. B., Bjorkblom, B., Moller, S. G. (2011). Propidium monoazide combined with real-time quantitative PCR underestimates heat-killed *Listeria innocua*. J Microbiol Method, 85(2), 164-169. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.01.027 PMID: 21324348
13. Mehrotra, M., Wang, G., Johnson, W.M. (2000). Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. J Clin Microbiol, 38(3), 1032–1035. PMID: 10698991
14. Nocker, A., Cheung, C. Y., Camper, A. K. (2006). Comparison of propidium monoazidewith ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. J Microbiol Method, 67(2), 310-320. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.04.015 PMID: 16753236
15. Nocker, A., Mazza, A., Masson, L., Camper, A. K., Brousseau, R. (2009). Selective detection of live bacteria combining propidium monoazide sample treatment with microarray technology. J Microbiol Method, 76(3), 253-261. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.11.004
16. Nogva, H. K., Dromtorp, S., Nissen, H., Rudi, K. (2003). Ethidium monoazide for DNA-based differentiation of viable and dead bacteria by 50-nuclease PCR. Bio Technol, 34(4), 804-813. https://doi.org/10.2144/03344rr02 PMID: 12703305
17. Pan,Y., Breidt, F., J. (2007). Enumeration of viable *Listeria monocytogenes* cells by realtime PCR with propidium monoazide and ethidium monoazide in the presence of dead cells. Appl Environ Microbiol, 73(24), 8028-8031. https://doi.org/10.1128/AEM.01198-07 PMID: 17933922
18. Qiu, J., Feng, H., Xiang, H., Wang, D., Xia, L., Jiang, Y., Song, K., Lu, J., Yu, L., Deng, X. (2010). Infuence of subinhibitory concentrations of licochalcone A on the secretion of enterotoxins A and B by *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol Lett, 307, 135–141. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.01973.x PMID: 20412304
19. Rudi, K., Nogva, H. K., Moen, B., Nissen, H., Bredholt, S., Moretro, T., Naterstad, K., Holck, A. (2002). Development and application of new nucleic acid-based technologies for microbial community analyses in foods. Int J Food Microbiol, 78, 171-180. https://doi.org/10.1016/s0168-1605(02)00236-2 PMID: 12222632
20. Yáñez, M.A., Nocker, A., Soria-Soria, E., Múrtula, R., Martínez, L., Catalán, V. (2011). Quantification of viable *Legionella pneumophila* cells using propidium monoazide combined with

www.SID.ir

Archive of SID

quantitative PCR. J Microbiol Method, 85, 124–130. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.02.004 PMID: 21329735

21. Zhang, Z., Liu, W., Xu, H., Aguilar, Z.P., Shah, N.P., Wei, H. (2015). Propidium monoazide combined with real-time PCR for selective detection of viable *Staphylococcus aureus* in milk powder and meat products. J Dairy Sci, 98(3), 1625-1633. https://doi.org/10.3168/jds.2014-8938 PMID: 25582587

22. Zhang, Z., Wang, Z., Xu, H., Zoraida, P., Aguilar, C., Liu, C., Gan, B., Xiong, Y., Lai, W., Xu, F., Wei, H. (2014). Detection of non-emetic and emetic Bacillus cereus by propidium monoazide multiplex PCR (PMA-mPCR) with internal amplification control. Food Control, 35, 401-406. https://doi.org/10.3168/jds.2014-8938

www.SID.ir

Archive of SID

Journal of Veterinary Research
J Vet Res, Volume 75, Number 1, 2020
Original Article

Applying Modern Technique of qPCR Coupling with Propidium Monoazide to Detect Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in Cream Pastry Products

Maryam Azizkhani, Fahimeh Tooryan

Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran

10.22059/jvr.2019.250965.2721
Received 1 September 2019, Accepted 10 November 2019

Abstract

BACKGROUND: *Staphylococcus aureus* is one of the most important human pathogens that cause infection and also food intoxication by secreting various enterotoxins. Conventional culturing methods to detect *S. aureus* have some limitations such as being time-consuming due to bacterial growth and low precision and sensitivity in detecting viable but non-cultivable cells.

OBJECTIVES: The objective of this study was to detect and quantify enterotoxigenic (A-E) *S. aureus* in cream pastry products applying PCR coupling with propidium monoazide (PMA) to distinguish dead and live cells.

METHODS: One hundred samples were randomly collected from pastry shops in Amol, in a period of 2 months. After preparing dilutions, bacterial pellets were separated and treated with PMA before DNA extraction. Real time PCR was conducted in order to quantify *S.aureus* cells and enterotoxigenic strains using specific primers.

RESULTS: Results of conventional method were close to PMA-qPCR data ($P>0.05$), but data from qPCR that includes live and dead cells shows more bacterial count than two other methods. Sensitivity of the method applied in the present study, detecting low number of *S.aureus* cells (less than 10/g) seems considerable.

CONCLUSIONS: Findings showed that applying PCR coupling with PMA results in more reliable data than conventional culturing method. Regarding this approach being time-effective, considerably sensitive and specific, it is expected that it be used in food quality control labs in monitoring systems in future.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, Propidium monoazide, PCR, Pastry products, Intoxication

Copyright © 2020. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution- 4.0 International License which permits Share, copy and redistribution of the material in any medium or format or adapt, remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially.

Corresponding author's email: m.azizkhani@ausmt.ac.ir Tel/Fax: 011-44271057 / 011-44271054

How to cite this article:

Azizkhani, M., Tooryan, F. (2020). Applying Modern Technique of qPCR Coupling with Propidium Monoazide to Detect Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in Cream Pastry Products, J Vet Res, 75(1), 57-64. https://doi.org/10.22059/jvr.2018.244760.2721

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Primers used in quantifying entertoxigenic genes in *S.aureus*.
Table 2. Results of *S.aureus* number (log cfu/g) in pastry samples counted through conventional culturing, qPCR and PMA-qPCR.
Table 3. Results of enterotoxigenic *S.aureus* number (log cfu/g) in pastry samples counted through qPCR and PMA-qPCR.

www.SID.ir