Archive of SID

12th July 2017
۲۱ تیرماه ۱۳۹۶
3rd. International Conference on
Agricultural Engineering and Natural Resources
سومین کنفرانس بین المللی
مهندسی کشاورزی و منابع طبیعی

طراحی روش Real-time pcr و آنالیز نقطه ذوب با دقت بالا(HRM) درشناسایی وتشخیص *سالمونلا تیفی موریوم و سالمونلا انتریتیدیس* در نمونه های‌تخم مرغ خام

[۱]صابره فهیمی، [۲] *دکتر حامد اهری، [۳]دکتر نریمان شیخی

[۱]دانشجوی کارشناسی ارشد صنایع غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران،Sabereh.fahimi@gmail.com
[۲*] استادیاردانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران دانشکده علوم و مهندسی صنایع غذایی،Dr.h.ahari@Gmail.com
[۳]استادیاردانشگاه آزاداسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه دامپزشکی n_sheikhi@srbiau.ac.ir

چکیده

سالمونلا ها یکی از مهمترین عوامل ایجاد کننده مسمومیت غذایی هستند. شناسایی سالمونلا در مواد غذایی از طریق کشت میکروبی روشی زمان بر است و دقت کافی ندارد . مطالعه ی حاضر، ارایه یک روش سریع و دقیق برای شناسایی و تفکیک این دو باکتری در تخم مرغ می باشد.
نمونه های تخم مرغ عاری از سالمونلا، توسط باکتری های سالمونلا تیفی موریوم،سالمونلا انتریتیدیس و مخلوط دو باکتری تلقیح شد و سرانجام روش Real-time Pcr با استفاده از یک جفت پرایمر اختصاصی به منظور شناسایی باکتری های فوق الذکر طراحی گشت و آنالیز HRM نیز به منظور تفکیک سویه ها بکار رفت.
روش Real-time Pcr و آنالیز HRM توانست باکتریهای سالمونلا تیفی موریوم و سالمونلا انتریتیدیس و مخلوط دو باکتری را در محتویات تخم مرغ با حداقل ۲۰۰ باکتری سالموناتوسط پرایمر طراحی شده مشترک شناسایی و تفکیک کند .

واژه های کلیدی: Real-time Pcr، HRM، سالمونلا تیفی موریوم، سالمونلا انتریتیدیس، تخم مرغ

۱- مقدمه

ایمنی مواد غذایی همواره یک موضوع بسیار مهم محسوب می‌شود. با وجود کنترل‌های بسیار دقیقی که برای محدود کردن آلودگی مواد غذایی به گونه‌های سالمونلا به عمل می‌آید، این باکتری‌ها هنوز هم مهم‌ترین عامل بیماری‌های ناشی از مسمومیت غذایی در سرتاسر دنیا محسوب می‌شوند. سالمونلوزیس از مهم‌ترین بیماری‌های عفونی بین انسان و حیوانات است که توسط باکتری سالمونلا ایجاد می‌شود گزارشات حاکی از این است که سالانه میلیون‌ها نفر به این بیماری مبتلا شده و هزاران مرگ ناشی از عفونت‌های سالمونلایی در سرتاسر جهان اتفاق می‌افتد[۲۷-۲۶].

سالمونلا تیفی موریوم گونه‌ای است که دارای توانایی باقی ماندن به شکل قابل تکثیر و زنده به مدت طولانی در محیط و نمونه‌های غذایی است که علاوه بر انسان، میزبان های زیادی داشته و امکان شیوع آن بالا است[۲۹، ۸].سالمونلا انتریکا زیرشاخه انتریتیدیس نیز از پاتوژن های غذایی است که در سال‌های اخیر به طور فزاینده‌ای شناسایی و ایزوله شده است و عامل بیش از ۷۰٪ از مسمومیت‌های سالمونلوزیس می‌باشد[۲۸].

تخم مرغ از سه قسمت پوسته، سفیده و زرده تشکیل شده است که هر سه قسمت می تواند دچار آلودگی با سروتیپ های سالمونلا شود. پوسته تخم مرغ ممکن است در اثر برخورد با مدفوع مرغ به این باکتری آلوده شود[۳۵]..علاوه براین، به دلیل عواملی چون شکستگی، شستن با آب آلوده، آلودگی به وسیله جعبه یا ظروفی که تخم مرغ را در آن ها جمع می کنند و دست کاری توسط کارگران، آلودگی پوسته تخم مرغ می تواند رخ دهد [۱۰].

بنابراین برای سلامت غذایی، دسترسی به سیستم های سریع ,حساس و قابل اعتماد، که از لحاظ بین المللی قابل قبول باشد، برای تشخیص حضور و یا عدم حضور بیماری زا ها در صنعت غذایی و نیز برای‌نظارت‌های‌قانونی‌بسیار مهم است[۱۸-۲۰].روشهای استاندارد مبتنی بر کشت باکتری برای تشخیص گونه های سالمونلا در مواد غذایی برخلاف حساس بودن، زمان بر است و نمونه ها بایستی ۴ تا ۵ روز در محیط غنی همچون بافر آب پپتونه (Buffered pepton water)و محیط آگار انتخابی کشت داده شوند[۲، ۳۲،۱۷].

www.SID.ir

Archive of SID

در سالهای اخیر روشهای مختلف PCR، روشهای بالقوه ای برای بهبود سرعت و حساسیت تشخیص گونه های مختلف سالمونلا فراهم کرده است که با تشخیص سریع تر ناقلین موجب ارتقای مدیریت محصولات غذایی شده است[۳،۶،۱۱،۲۳،۳۴].

Real-time pcr تکنیکی برای مشاهده مداوم پیشرفت واکنش PCR در طول زمان می‌باشد. با این روش می‌توان مقادیر تولیدات PCR را نیز اندازه گیری نمود. این روش بر مبنای فلوروسنت تولیدی از مولکول گزارشگر می‌باشد که در طول واکنش افزایش می یابد. مولکول‌های گزارشگر فلوروسنت یا به صورت رنگ هایی می باشند که به DNA دو رشته‌اي باند می‌شوند مانند SYBER GREEN و یا به صورت شناساگر های توالی های خاص مانند Taqman probes می باشند. روش Real-time pcr روشی است که دارای حساسیت مشابه روش‌های کشت میکروبی می‌باشد ولی بسیار سریع‌تر از آن بوده و حداکثر ظرف ۴۸ ساعت به پایان می‌رسد [۲۲].

آنالیز منحنی ذوب با دقت بالا(HRM) روشی نسبتا جدید و همگن بعد از تکثیر PCR است که در یک لوله دربسته انجام می‌شود. این روش آنالیز تغییرات ژنتیکی (SNPs، موتاسیون‌ها و متیلاسیون‌ها) در محصولات PCR را مقدور می‌سازد[۵]. منحنی‌های ذوب غالبا برای تعیین دمای ذوب (Tm)، DNA دو رشته ای تقویت شده به کار می‌رود. Tm دمائی است که در آن نیمی از پرایمرها به توالی هدف متصل شده اند. آنالیز HRM برای متمایز کردن شکل منحنی ذوب به کار می‌رود حتی اگر امپلیکون‌ها دارای نقطه ذوب یکسانی باشند. نرمال سازی و مقایسه منحنی‌های ذوب تعیین می‌کند که آیا دو امپلیکون دارای توالی مشابه و یا متفاوتی هستند. در واقع در این روش پس از پایان PCR منحنی ذوب ترسیم شده و برای تائید نتایج مورد استفاده قرار می‌گیرد و در صورت وجود اختلاف در ترادف نوکلئوتیدی دو نمونه شکل منحنی تفاوت می‌کند. با مقایسه منحنی نمونه‌ها با هم یا نمونه‌های نرمال (توالی‌یابی شده) موارد متفاوت مشخص می‌شوند ، در این منحنی هر یک از قله‌ها نمایانگر نقطه ذوب یک محصول PCR است که این کار بوسیله اندازه‌گیری تغییرات فلورسانس در دماهای مختلف صورت می‌گیرد[۹].

با توجه به موارد ذکر شده و لزوم استفاده از روش‌های تشخیص سریع میکروبی، در این مطالعه، کارایی روش Real-time pcr و HRM در تفکیک و تشخیص دو باکتری سالمونلا انتریتیدیس و سالمونلا تیفی موریوم در نمونه های تخم مرغی که به صورت دستی آلوده شده‌اند مورد بررسی قرار گرفت.

۲- مواد و روشها

۳۰ نمونه تخم مرغ به طور تصادفی از فروشگاه های پروتینی شهر تهران خریداری شد، سپس از نظر عدم حضور سالمونلا به روش کشت استاندارد مورد بررسی قرار گرفتند[۱۳]. به نمونه های فاقد سالمونلا، باکتری سالمونلا انتریتیدیس، سالمونلا تیفی موریوم و مخلوط دو باکتری ذکر شده تلقیح شد و نهایتا پس از استخراج DNA نمونه های آلوده، عملیات Real-time PCR و آنالیز منحنی ذوب با دقت بالا (HRM) جهت شناسایی و تفکیک نمونه های فوق بکار رفت.

۲-۱- آماده سازی نمونه تخم مرغ

نمونه های تخم مرغ سالم خریداری شد و پوسته تخم مرغ ها با اتانول ۷۰٪ استریل گشت و خشک شد، سپس به کمک کارد استریل پوسته جدا گردید و محتویات تخم مرغ(زرده و سفیده) به شیشه های استریل انتقال داده شد و همگن گشت.

۲-۲- بررسی حضور سالمونلا به روش کشت استاندارد

۲۵ گرم محتویات تخم مرغ را به ۲۲۵سی سی محیط کشت پپتون واتر(BPW ، مرک، آلمان) اضافه کرده و به مدت ۲۴ ساعت، در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شد، سپس ۱ سی سی از این محیط کشت را به ۱۰ سی سی محیط کشت مایع راپاپورت(Rappaport vassilidis مرک، آلمان) اضافه نموده و به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری گردید.یک لوپ از این محیط بر روی محیط مک کانگی آگار(مرک، آلمان)کشت داده و به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه قرار داده شد.بعد از انجام تست های تشخیصی و افتراقی نمونه های عاری از سالمونلا جدا و توسط باکتریهای مذکور تلقیح شدند.

۲-۳- تهیه باکتری و تلقیح به نمونه ها

سویه سالمونلا انتریکا سروتیپ سالمونلا تیفی موریوم(ATCC 14028) و سروتیپ سالمونلا انتریتیدیس (ATCC 13311) به صورت کشت زنده از کلکسیون میکروبی سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران به عنوان سویه استاندارد خریداری شد.رشد هر دو باکتری به طور مجزا بر روی محیط مک کانگی آگار به روش خطی صورت گرفت.

بوسیله سواپ استریل مقداری کمی از هر دو باکتری کشت شده مرحله قبل به لوله حاوی نوترینت براث ۱/۵۰۰ جهت رقیق سازی اضافه شد و کدورت 10^8 باکتری با نیم مک فارلند بررسی گردید سپس کدورت نمونه ها، با استفاده از دستگاه uv اسپکتروفوتومتر (طول موج ۶۸۰nm) به منظور اطمینان بیشتر بررسی گردید و پس از آن یک لوله حاوی مخلوط دو باکتری به نسبت ۱ به ۱ آماده شد. در مرحله بعد در محیط کشت نوترینت براث ۱/۵۰۰ (مرک، آلمان) از رقت 10^8 هر سه تیمار آماده شده، رقت های دیگری به روش سریالی تهیه شد(از رقت 10^7 تا 10^1) سپس ۱

www.SID.ir

Archive of SID

سی سی از هر کدورت به لوله های حاوی ۹ سی سی نمونه تخم مرغ عاری از سالمونلا اضافه شد و سرانجام شمارش باکتریایی در محیط کشت سرم رینگر(مرک، آلمان) برای نمونه ها صورت گرفت.

۲-۴- استخراج DNA

در این مطالعه برای استخراج و تخلیص DNA از سروتیپ سالمونلا تیفی موریوم و سالمونلا انتریتیدیس خالص و نمونه های تخم مرغ آلوده شده به طور مصنوعی (به وسیله هر سه تیمارازرقت 10^5 تا 10^8) توسط کیت استخراج DNA ژنومی (تکاپوزیست- ایران) مطابق دستورالعمل استفاده شد.

۲-۵- جفت پرایمر مورد استفاده و شرایط انجام Real-time PCR

سکانس پرایمر مورد استفاده براساس پژوهش(Bratchicow & Mauricas; 2011) سنتز شد. این جفت پرایمر قطعه ای حدود ۱۰۰-۱۵۰ جفت بازی از ژن مربوط به منطقه ژنومی کدکننده پروتئین اتصالی آدنوزین-۵' تری فسفات ترشحی نوع دوم را شناسایی و تکثیر می نمایدکه توالی آنها به صورت ذیل می باشد:

5'-CCGGTTCGCCAGGATACAAGCCTG-3'
5'-GCCCAGAGCGCGCAATGGCGTCAG-3'

مخلوط واکنش در حجم نهایی ۲۵ µl که شامل ۲ ماکرولیتر از DNA استخراج شده، ۲/۵ ماکرولیتر از PCR buffer حاوی رنگ سایتوناین، ۲ ماکرولیتر از dNTP، ۱ ماکرو لیتر MgCl2، ۰/۵ ماکرولیتر از پرایمر های F و R، ۰/۲ ماکرولیتر آنزیم Taq DNA polymeraseو آب مقطر ۱۶/۵ ماکرو لیترآماده شد.

افزوده سازی در دستگاه Rotor-Gene Q با ظرفیت HRM (کیاژن، آلمان) با برنامه حرارتی مطابق با مقاله(Bratchikov and Mauricas, 2011) به شرح ذیل صورت گرفت:

دناتوره سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴ دقیقه آغاز و بعد از آن حدود ۳۵ سیکل با دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ ثانیه (دناتوره سازی)، با دمای ۵۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه(اتصال پرایمر) وحدود ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ ثانیه (طویل سازی) و پس از آن یک مرحله طویل سازی نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه انجام شدسپس تابش فلورسنت هر نمونه به ازای هر سیکل، توسط نرم افزار دستگاه ثبت شد.

۲-۶- بررسی ویژگی آزمون Real-time PCR

Real-time PCR با استفاده از جفت پرایمر مذکور بر روی ۴ گروه تیمار مربوط به نمونه های آلوده با سالمونلا انتریتیدیس، ۴ گروه مربوط به نمونه های آلوده با سالمونلا تیفی موریوم ، ۴ گروه مربوط به نمونه های آلوده با مخلوط دو باکتری که همگی از رقت 10^5تا 10^8 بودندو۲ مورد نیز مربوط به باکتری های خالص سالمونلا تیفی موریوم و سالمونلا انتریتیدیس به عنوان کنترل مثبت و همچنین ۱ نمونه حاوی آب مقطر به عنوان کنترل منفی انجام شد

۲-۷- آنالیز منحنی ذوب با دقت بالا(HRM)

در ادامه با انجام آنالیز HRM به منظور تمایز و شناسایی محصولات PCR،با کاهش درجه حرارت به ۵۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و به دنبال آن افزایش دما از ۸۴ تا ۹۲ درجه سانتی گراد با گام۰/۲ درجه در هر ثانیه تکرار شد تا بهترین نتیجه حاصل گردد. کاهش فلورسانت به صورت مداوم توسط نرم افزار دستگاه ثبت شد و بعد از انتهای این مرحله بر مبنای منحنی فلورسانت اولیه ($\Delta F/\Delta T$)، منحنی ذوب توسط دستگاه رسم گردید، سپس بعد از نرمالایزکردن منحنی HRM ، تحلیل نتایج با استفاده از نرم افزار تحلیل HRM و Quantitative PCR متعلق به شرکت کیاژن انجام گرفت.

۳- یافته ها

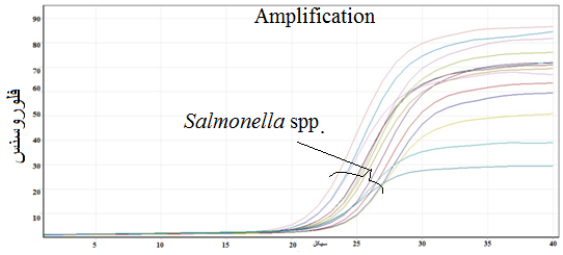
۳-۱- اختصاصیت پرایمر تعریف شده و تکثیر قطعه هدف در ژنوم

شکل ۱مرحله تکثیر قطعه ژنوم هدف در طی سیکل های دمایی پی سی آر در حضور رنگ اشباع را نشان داد که رنگ گرفتگی تیمارها نشان دهنده آن است که کلیه آنها مورد هدف این مرحله قرار گرفته اند.

www.SID.ir

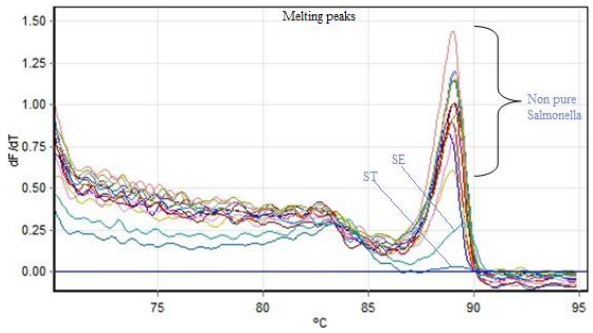
Archive of SID

(شکل ۱) مرحله تکثیر قطعه ژنوم هدف



اختلاف سکانس بین پرایمرهای رفت و برگشت موجب دماهای ذوب (Tm) متفاوت و منحنی های نرمال شده است(شکل ۲) .

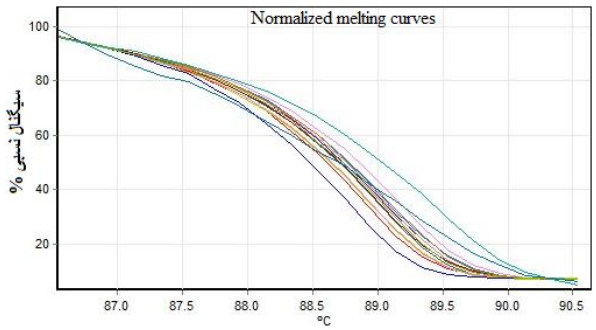
(شکل ۲) مرحله ذوب شدگی قطعات هدف در دماهای مختلف در باکتری ها و غلظت های متفاوت



در شکل ۲پروفایل های منحنی ذوب ، با اوج Tm مشخص برای هر یک از باکتری ها با غلظت مشخص بدست آمد. بر اساس این نتیجه ۲ پروفایل متفاوت برای تیمارهای باکتریائی در شکل ۲ ترسیم شده است بطوریکه محصول تکثیر در پروسه پی سی آر برای سالموناهای ناخالص دمای ذوب متوسط ۸۶/۸۶±۰/۰۸ و برای دو تیمار خالص سالمونلائی دمای ذوب۹۰/۴۲±۱/۰۶ را نشان داد.

سپس طبق شکل ۳ منحنی های ذوب برای کلیه تیمارها نرمالایز گشت و دستگاه موفق به شناسایی باکتری های خالص سالمونلا انتریتیدیس و سالمونلا تیفی موریوم ومخلوط دو باکتری خالص به تفکیک شد.

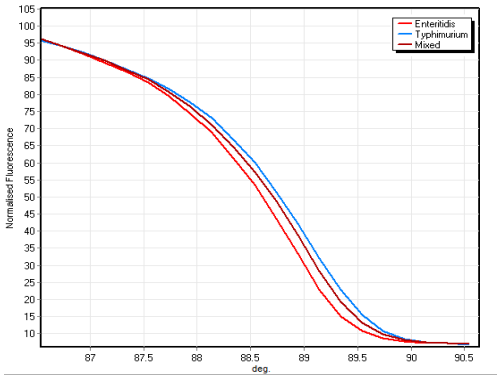
(شکل ۳) نتیجه HRM برای پانزده منحنی ذوب- نرمال شده



نمودار نرمالایز شده شکل ۴ تفکیک دو سوش سالمونلا تیفی موریوم و سالمونلا انتریتیدیس و مخلوط دو باکتری را به خوبی توسط آنالیز های HRM نشان می دهد.

www.SID.ir

(شکل ۴) نتیجه HRM برای دو منحنی ذوب- نرمال شده خالص و یک منحنی مخلوط

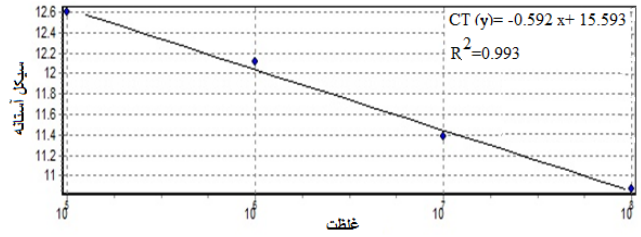


۳-۲-تحلیل آنالیز HRM برای سالمونلا انتریتیدیس وسالمونلا تیفی موریوم

پس از ۴ ساعت گذشت از سیکل دمائی، نتایجی به شکل ذیل توسط نرم افزار دستگاه (Rotor-Gene 2.0.2.4) بطوری بدست آمد: که در تحلیل HRM ، دامنه معنی داری نتیجه ۹۰٪ ، منطقه ۱ نرمالیزاسیون بین دماهای ۸۶/۵۴-۸۷/۱۸ ، منطقه ۲ نرمالیزاسیون بین دماهای ۷۱/۱۳-۹۰/۹۰را نشان دادند.

۳-۳- آنالیز کمی Real time-PCR وHRM در بررسی نمونه های آلوده

تست Realtime-PCR و HRM یکبار نیز برای باکتریهای خالص سالمونلا تیفی موریوم و سالمونلا انتریتیدیس و مخلوط دو باکتری خالص در رقت های مختلف انجام گرفت و بر اساس نتایج حاصله معادله خط رگرسیون رسم شد (شکل ۵). بر همین اساس چنین بنظر می رسد رابطه بین CT و غلظت باکتری های سالمونلا انتریتیدیس و تیفی موریوم در نمونه های تشخیصی معکوس بوده است. بدین ترتیب با کاهش هر نیم واحد از غلظت باکتری تقریبا به میزان ۱۵ واحد به سیکل آستانه افزوده می گردد.



(شکل ۵) آزمون معادله خط رگرسیون برای محاسبه همبستگی غلظت باکتری های سالمونلای هدف این تحقیق و سیکل آستانه ضریب همستگی این آزمون ۰,۹۹ بوده و نشان دهنده توان بالای این همبستگی بوده است.

۳-۴- حساسیت آزمون Real time-PCR وHRM

پس از انجام تست توسط باکتریهای خالص، با توجه به جفت پرایمر بکار رفته و برنامه دمایی لحاظ شده، تست Realtime-PCR و HRM نتوانست رقت های کمتراز 10^5 باکتری خالص را شناسایی کند لذا از رقت های کمتر از 10^5 برای تخم مرغ های آلوده نیز استفاده نشد. در این خصوص چون حداقل تعداد باکتری قابل شناسایی 10^5 باکتری در میلی لیتر بوده است و از آنجاییکه این آزمایش بر اساس ۲ ماکرولیتر برای هر تیمار طراحی شده بود، چنین بنظر می رسد حداقل تعداد باکتری های قابل شناسائی در سیستم Q-PCR با پرایمر طراحی شده مشترک برای شناسایی باکتری سالمونلا ۲۰۰ باکتری بوده است.

۴- بحث و نتیجه گیری

اکثر بیماری های ناشی از مصرف مواد غذایی به علت استفاده از غذاهای حاوی میکروارگانیسم های بیماریزا ایجاد می شود، به طور کلی، آلودگی با میکروارگانیسم های بیماریزا به علت عدم رعایت بهداشت در تولید مواد غذایی اتفاق می افتد. آلودگی ممکن است در هر کدام از مراحل زنجیره غذایی از تولید تا فرآوری و توزیع تا آماده سازی اتفاق بیافتد. در مورد شیوع بیماری های ناشی از مصرف مواد غذایی، میکروارگانیسم های بیماریزا باید در سطح گونه و ریزگونه شناسایی شوند تا ریشه و منشاء آلودگی تعیین و راهکار مناسبی ارائه شود[۳۰].روش های سنتی بر پایه کشت میکروبی

www.SID.ir

برای شناسایی گونه ها و زیرگونه ها بهینه نیستند زیرا کار زیادی می برند و وقت گیر هستند. علاوه بر آن سلول های باکتریایی استرس دیده و ضعیف شده معمولا نیاز به شرایط کشت خاصی دارند[۲۵].درسال های اخیر روشهای تشخیص مولکولی برای شناسایی و بررسی گونه های باکتری ها، از جمله سالمونلا ابداع گردیده است که روش pcr از آن دسته می باشد روش pcr با وجود متداول بودن معایبی از جمله استفاده از اتیدیوم بروماید برای آشکار سازی محصولات را داراست[۳، ۱۲،۲۰، ۲۱].

آنالیز HRM یک روش پیشرفته برای آنالیز منحنی های ذوب است که بعد از آمپلیفای کردن توالی DNA مورد نظر در حضور یک رنگ اشباع، دما بسیار آهسته بالا برده می شود. برخلاف آنالیزهای منحنی های ذوب سنتی، در آنالیز HRM نه تنها می توان دمای ذوب را تعیین کرد بلکه پروفایل ذوب یک آمپلیکون نیز قابل شناسایی است. از آنجا که پروفایل ذوب یک محصول PCR به میزان محتوی GC آن، طول و توالی و مکمل رشته آن (هتروزیگوسیتی) بستگی دارد، آنالیز HRM یک روش بسیار مناسب برای شناسایی SNP ها و جهش زایی است و بنابراین نقش مهمی را در تحقیقات و تشخیص های کلینیکی ایفا می کند. [۹].

بر خلاف روش های سنتی، آنالیز HRM در همان لوله ای که آمپلیفیکاسیون در آن صورت گرفته است انجام میگیرد و لازم نیست که خالص سازی و جداسازی آمپلیکون ها صورت گیرد. این باعث افزایش سرعت HRM، کار کمتر برای انجام آن و مناسب تر بودن آن برای نمونه های با مقدار بالا نسبت به روش های جایگزین مانند روش های بر پایه ژل الکتروفورز، می شود [۳۶].

در این مقاله برای شناسایی سالمونلا تیفی موریوم و سالمونلا انتریتیدیس به عنوان مهمترین پاتوژنهای تخم مرغ از روش Real-time PCR وآنالیز HRM با استفاده از تنها یک جفت پرایمراختصاصی ژن مربوط به منطقه ژنومی کدکننده پروتئین اتصالی آدنوزین-۵' تری فسفات ترشحی نوع دوم جهت تکثیر قطعه bp ۱۰۰-۱۵۰ استفاده شد.

در سال ۲۰۱۲یک روش آنالیز HRM برای شناسایی شش گونه لیستریا توسط Jin و همکاران (۲۰۱۲) ارائه شد. آن ها یک قطعه DNA دارای ۱۶۶جفت بازی از ژن ssrA را که یک انتقال دهنده پیام RNA (tmRNA) است را انتخاب کردند. به طور کلی ۵۳ گونه لیستریا(شامل ۳۴ نژاد لیستریامونوسیتوژنز و لیستریا اینوکوا) و ۴۵ گونه غیر لیستریایی مورد بررسی قرار گرفت. آنالیز HRM قادر بود ۱۰۰٪ گونه های لیستریا را نسبت به روش های سنتی شناسایی کند. این روش برای نمونه های غذایی که به صورت دستی آلوده شده بودند (آبمیوه، شیر، پنیر و گوشت) مورد استفاده قرار گرفت که در ۲۸ نمونه گونه ای، لیستریا به صورت صحیح شناسایی شدن ولی شناسایی نمونه ها در دو نمونه آبمیوه موفقیت آمیز نبود [۱۴].

VanBlerk و همکاران (۲۰۱۱) نیز از آزمون Real-time PCR به همراه یک مرحله پیش غنی سازی برای شناسایی سریع سالمونلا در نمونه های آب استفاده کردند، این آزمون با حساسیت بالا،شناسایی تا cfu/g ۱ رادر نمونه های سطح آب اثبات کرد،این آزمون همچنین زمان تشخیص مورد نیاز برای شناسایی سالمونلا را از چندین روز برای روش رایج کشت به کمتر از ۲۴ ساعت کاهش می داد[۳].

Chen و همکاران (۲۰۱۰) از روش real-time PCR برای شناسایی سالمونلا انتریکا در مواد غذایی که به صورت مصنوعی آلوده شده بودند استفاده کردند که نتایج آن ها حاکی از این بود که روش PCR معمولی فقط قادر به شناسایی تعداد بالاتر از ۱۳۰ cfu/ml بود در حالی که روش real-time PCR می توانست تا cfu/g ۱ را در نمونه‌های گوشت مرغ، تخم‌مرغ مایع و کره بادام زمینی شناسایی کند [۷].

حساسیت روش استفاده شده در این مقاله برای شناسایی سالمونلا 10^5 باکتری در میلی لیتر بوده است و حداقل تعداد باکتری قابل شناسائی در سیستم Q-PCR با پرایمر طراحی شده مشترک برای هر دو باکتری سالمونلا انتریتیدیس و تیفی موریوم ۲۰۰ باکتری بوده است در حالیکه همانطور که اشاره شد Chen و همکاران (۲۰۱۰) وهمین طور VanBlerk و همکاران (۲۰۱۱) تعداد باکتری قابل شناسائی با این روش را تا cfu/g ۱تایید کرده اندکه بر اساس یافته های این پژوهش به نظر میرسد با بهینه سازی بیشتر، این روش علاوه برتشخیص هر دو باکتری سالمونلا انتریتیدیس و تیفی موریوم بتواند از حساسیت کافی نیز برخوردار باشد.

نتایج ما در راستای نتایج حاصل از بررسی Maksim Bratchikov و Mykolas Mauricas در سال ۲۰۱۱ بود. در این پژوهش Maksim Bratchikov و Mykolas Mauricas با پرایمرهای طراحی شده برای ژن هدف A گونه های سالمونلا و حتی ژنوتیپ و سروتیپ آن ها را شناسایی کردند[۵].

مقالات اخیر نشان می دهد که آنالیز HRM یک جایگزین نسبتا پر هزینه است که قادر به شناسایی میکروارگانیسم های بیماریزای مربوط به مواد غذایی در سطح گونه و نژاد می باشد[۱،۴، ۱۴، ۲۵،۱۵، ۱۶، ۳۳].

۵- مراجع

[1] Antolinos, V., Fernández, P. S., Ros-Chumillas, M., Periago, P. M., & Weiss, J. Development of a High-Resolution Melting–Based Approach for Efficient Differentiation Among Bacillus cereus Group Isolates. Foodborne Pathogens and Disease, 9(9), 777-785,2012.

www.SID.ir

Archive of SID

[2] 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.

[3] 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; 70(5): 1080-7, 2007.

[4] BRATCHIKOV, M. & MAURICAS, M. Development of a multiple-run high-resolution melting assay for Salmonella spp. genotyping: HRM application for Salmonella spp. subtyping. Diagnostic microbiology and infectious disease, 71, 192-200, 2011. [19] Bratčikov, M., & Mauricas, M.. The use of high-resolution melting analysis for Salmonella spp. CRISPR sequence genotyping. Acta medica Lituanica, 16(3), 98-102,2009.

[5] Bratčikov, M., & Mauricas, M.. The use of high-resolution melting analysis for Salmonella spp. CRISPR sequence genotyping. Acta medica Lituanica, 16(3), 98-102,2009.

[6] 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; 35: 239–250, 1997.

[7] CHEN, J., ZHANG, L., PAOLI, G. C., SHI, C., TU, S.-I. & SHI, X. A real-time PCR method for the detection of Salmonella enterica from food using a target sequence identified by comparative genomic analysis. International journal of food microbiology, 137, pp.168-174, 2010.

[8] D'AOUST, J.-Y. Pathogenicity of foodborne Salmonella. International Journal of Food Microbiology, 12, 17-40, 1991.

[9] DRUML, B. & CICHNA-MARKL, M. High resolution melting (HRM) analysis of DNA–Its role and potential in food analysis. Food chemistry, 158, 245-254, 2014.

[10] EMADI CHASHMI, S. H. Isolation of salmonella in local poultry in border of Gilan and Mazandaran province, 2007.

[11] Eyigor A, Carli KT, Unal CB. Implementation of real-time PCR to tetrathionate broth enrichment step of Salmonella detection in poultry. Lett Appl Microbiol; 34: 37–41, 2002.

[12] 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; 39: 2477-84, 2001.

[13] IRANIAN NATIONAL STANDARDIZATION ORGANIZATION. Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for the detection of Salmonella spp, 2014.

[14] Jin, D., Luo, Y., Zhang, Z., Fang, W., Ye, J., Wu, F., & Ding, G. Rapid molecular identification of Listeria species by use of real-time PCR and high-resolution melting analysis. FEMS Microbiol Lett, 330(1), 72-80,2012.

[15] Kagkli, D.-M., Folloni, S., Barbau-Piednoir, E., Van den Eede, G., & Van den Bulcke, Towards a Pathogenic Escherichia coli Detection Platform Using Multiplex SYBR®Green Real-Time PCR Methods and High Resolution Melting Analysis. PLoS ONE, 7(6),2012.

www.SID.ir

[16] Lilliebridge, R. A., Tong, S. Y. C., Giffard, P. M., & Holt, D. C. The Utility of High-Resolution Melting Analysis of SNP Nucleated PCR AmpliconAnMLSTBased Staphylococcus aureus Typing Scheme. PLoS ONE, 6(6),2011.

[17] 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; 70(1): 69–75, 2004.

[18] 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; 61: 1245–7,1999.

[19] Malorny B, Hoorfar J, Bunge C, Helmuth R. Multicenter validation of the analytical accuracy of Salmonella PCR: towards an international standard. Appl Environ Microbiol; 69: 290-6, 2003.

[20] Malornya B, Hoorfar J, Hugas M, Heuvelink A, Fache P, Ellerbroeka L, Bungea C, Dorna C, Helmutha R. Interlaboratory diagnostic accuracy of a Salmonella specific PCR-based method. Int J Food Microbiol; 89: 241–9, 2003.

[21] 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 ; 27: 351–63, 1998.

[22] NAVAS, J., ORTIZ, S., LOPEZ, P., JANTZEN, M. M., LOPEZ, V. & MARTINEZ-SUAREZ, J. V. Evaluation of effects of primary and secondary enrichment for the detection of Listeria monocytogenes by real-time PCR in retail ground chicken meat. Foodbourne Pathogens & Disease, 3, 347-354, 2006.

[23] 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; 52: 773–6, 2003.

[24] 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; 18: 409-20, 2004.

[25] Pietzka, A. T ,.Stöger, A., Huhulescu, S., Allerberger, F., & Ruppitsch, W. Gene Scanning of an Internalin B Gene Fragment Using High-Resolution Melting Curve Analysis as a Tool for Rapid Typing of Listeria monocytogenes. The Journal of Molecular Diagnostics, 3(1),57-63,2011.

[26] PUI, C., WONG, W. C., CHAI, L. C., TUNUNG, R., PONNIAH, J., ANYI, U., MOHAMAD GHAZALI, F., CHEAH, Y. K. & RADU, S. Salmonella: a foodborne pathogen. International Food Research Journal, 18,pp. 465-473, 2011a

[27] PUI, C. F., WONG, W .C., CHAI, L. C., NILLIAN, E., GHAZALI, F. M., CHEAH, Y. K., NAKAGUCHI, Y., NISHIBUCHI, M. & RADU, S. Simultaneous detection of Salmonella spp., Salmonella Typhi and Salmonella Typhimurium in sliced fruits using multiplex PCR. Food Control, 22,pp. 337-342, 2011b.

[28] RABSCH, W., TSCHäPE, H. & BäUMLER, A. J. Non-typhoidal salmonellosis: emerging problems. Microbes and infection, 3, 237-247, 2001.

www.SID.ir

Archive of SID

[29] RIYAZ-UL-HASSAN, S., VERMA, V. & QAZI, G. N.. Rapid detection of Salmonella by polymerase chain reaction. Molecular and cellular probes, 18, 333-339, 2004.

[30] Settanni, L., & Corsetti, A. The use of multiplex PCR to detect and differentiate food- and beverage-associated microorganisms: A review. Journal of Microbiological Methods, 69(1), 1-22,2007.

[31] VAN BLERK, G., LEIBACH, L., MABUNDA, A., CHAPMAN, A. & LOUW, D. Rapid and specific detection of Salmonella in water samples using real-time PCR and High Resolution Melt (HRM) curve analysis. Water Science & Technology, 64, 2011.

[32] 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; p: 373–91,2000.

[33] Wang, J., Yamada, S., & Ohashi, E. Rapid identification of Listeria species and screening for variants by melting curve and high-resolution melting curve analyses of the intergenic spacer region of the rRNA gene. Canadian Journal of Microbiology, 56(8), 676-682,2010.

[34] Warren BR, Yuk HG, Schneider KR. Detection of salmonella by flow-through immunocapture realtime PCR in selected foods within 8 hours. J Food Prot; 70(4): 1002-6, 2007.

[35] WHO. Risk assessments of Salmonella in eggs and broiler chickens, Food & Agriculture Org, 2002.

[36] Wittwer, C. T. High-resolution DNA melting analysis: advancements and limitations. Human Mutation, 30(6), 857-859,2009.

Designing of Real-time pcr Method and HRM Analysis in Separation and Recognition *Salmonella typhimurium* and *salmonella enteritidis* in raw egg

Sabereh Fahimi, *D.r Hamed Ahari, D.r Nariman SHeikhi

Master of Science of Food Science and Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran: Sabereh.fahimi@gmail.com
*Department of Food Science and Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran : Dr.h.ahari@Gmail.com
Department of Clinical Science, Faculty of Specialized Veterinary, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran: n_sheikhi@srbiau.ac.ir

Abstract. Salmonella is one of the most important causes of food poisoning. recognition of Salmonella food typically through culture, is method that time consuming and not accurate enough.
recently study presents a fast and accurate method for the detection and Separation of this bacteria in eggs.
Sampel eggs of without salmonella incoulated with Salmonella typhimurium, Salmonella Enteritidis and a mixture of both bacteria and finally Real-time pcr method designed with using a Pair of spacial primer for recognition of mention bacteria and HRM analysis was used for sepration of geneallogy.
Real-time pcr method and HRM could identify and Separat bacteria Salmonella typhimurium, Salmonella Enteritidis and a mixture of both in the eggs content with minimum identifiable 200 Salmonella bacteria with common designed primer.
keywords: Real-time Pcr, HRM, Salmonella typhimurium, Salmonella enteritidis, eggs

www.SID.ir