Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2017; 20(123): 83-93

Optimization of a Multiplex PCR for Simultaneous Detection of Foodborne Pathogens *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157:H7 and Contamination Prevalence Assay in Meat Products

Hossein Morsali[1], Golnaz Asaadi Tehrani[2], Hanieh Asaadi[3], Sajjad Yazdansetad[4*], Reza Najafpour[1]

1. PhD Candidate in Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.
2. Assistant Professor, PhD in Molecular Genetic, Department of Genetics, Faculty of Basic Sciences, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran.
3. MSc in Microbiology, Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medicine, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran.
4. PhD Candidate in Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran.

Received: 4 Apr 2017, Accepted: 26 Jul 2017

Abstract

Background: *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157:H7 are the most common bacterial foodborne pathogens contaminating food products especially meat. It is essential to detect the pathogens rapidly, specifically, and simultaneously by selection and optimization of suitable reference genes. The present study was conducted to simultaneously detect *E. coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. in meat products and contamination prevalence assay by using multiplex PCR based on *rfbE* and *invA* genes amplification in Zanjan province, northwest of Iran.

Materials and Methods: A total of 74 meat samples were obtained from various regions of Zanjan province, randomly. 25 grams of each meat sample was completely homogenized in 225 ml of Mueller-Hinton broth growth medium and incubated. Bacterial strains were purified and DNA extraction was performed from purified bacterial isolates. Simultaneous amplification of *rfbE* and *invA* gene fragments was done with specific primers by optimization of a multiplex PCR. Finally, the sensitivity of the method was evaluated by inoculation of the bacteria to the meat.

Results: Out of 74 meat samples, 6(8%), 4(5.4%), and 2(2.7%) samples were positive for *E. coli* O157:H7, *Salmonella*, and both *E. coli* O157:H7-*Salmonella*, respectively. Multiplex PCR indicated high sensitivity for simultaneous detection of the pathogens in lowest dilution of the bacteria that had been inoculated to the meat.

Conclusion: In this study, a multiplex PCR was optimized based on *Salmonella* spp. and *E. coli* O157:H7 virulence genes for rapid and simultaneous detection of the pathogens with high sensitivity and specificity. Multiplex PCR as a reliable tool for rapid and simultaneous detection of foodborne pathogens to prevent contamination of food products.

Keywords: *Escherichia coli* O157:H7, Meat products, Multiplex PCR, *Salmonella*.

*Corresponding Author:
Address: Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran.
Email: sajjad.yazdansetad@gmail.com

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال ۲۰، شماره ۶ (شماره پیاپی ۱۲۳)، شهریور ۱۳۹۶، ۹۳-۸۳

بهینه‌سازی تشخیص همزمان *سالمونلا* و *اشرشیاکلی* O157:H7 در فرآورده‌های گوشتی و بررسی میزان آلودگی با روش Multiplex PCR

حسین مرسلی[۱]، گلناز اسعدی تهرانی[۲]، حانیه اسعدی[۳]، سجاد یزدان ستاد[۴*]، رضا نجف‌پور[۱]

۱. دانشجوی دکتری تخصصی میکروب شناسی، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران.
۲. استادیار، دکتری تخصصی ژنتیک مولکولی، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران.
۳. کارشناس ارشد میکروب شناسی، گروه میکروب‌شناسی و انگل‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ایران.
۴. دانشجوی دکتری تخصصی میکروب شناسی، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۶/۱/۱۵، تاریخ پذیرش: ۹۶/۵/۴

چکیده

زمینه و هدف: *سالمونلا* و *اشرشیا کلی* از مهم ترین پاتوژن‌های آلوده‌کننده مواد غذایی به ویژه فرآورده‌های گوشتی هستند. تشخیص سریع، اختصاصی و همزمان این پاتوژن‌ها با انتخاب و بهینه‌سازی ژن‌های اختصاصی از اهمیت بالایی برخوردار است. این مطالعه با هدف تشخیص توأم *سالمونلا* و *اشریشیا کلی* O157:H7 در فرآورده‌های گوشتی و بررسی میزان آلودگی بر مبنای تکثیر دو ژن *rfbE* و *invA* با روش Multiplex PCR در استان زنجان واقع در شمال غربی ایران انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: تعداد ۷۴ نمونه گوشت به صورت تصادفی از نواحی مختلف استان زنجان جمع‌آوری شد. ۲۵ گرم از هر نمونه گوشت در ۲۲۵ میلی‌لیتر محیط مولر هینتون براث به طور کامل یکنواخت‌سازی و گرماگذاری گردید. جدایه‌های باکتری خالص‌سازی شد و استخراج DNA انجام گردید. تکثیر همزمان قطعات ژنی rfbE و invA با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و با بهینه‌سازی واکنش PCR چندگانه انجام گرفت. در نهایت، حساسیت این روش با تلقیح رقت‌های مختلف از باکتری‌ها به نمونه‌های گوشتی بررسی گردید.

یافته‌ها: از بین ۷۴ نمونه گوشتی، تعداد ۶ نمونه (۸/۱ درصد) به *اشریشیا کلی* O157:H7، تعداد ۴ نمونه (۵/۴ درصد) به *سالمونلا* و تعداد ۲ نمونه (۲/۷ درصد) به هر دو باکتری آلوده بودند. واکنش PCR چندگانه در تشخیص توام هر دو پاتوژن در کمترین رقت تلقیح شده به نمونه‌های گوشتی نیز از حساسیت بالایی برخوردار بود.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه، واکنش PCR چندگانه بر اساس ژن‌های بیماری‌زایی *سالمونلا* و *اشریشیا کلی* O157:H7 جهت تشخیص سریع و همزمان این پاتوژن‌ها با حساسیت و اختصاصیت بالا بهینه شد. واکنش PCR چندگانه به منظور شناسایی همزمان پاتوژن‌های منتقله از راه غذا در کنترل آلودگی‌های مواد غذایی روش قابل اعتمادی است.

واژگان کلیدی: فرآورده‌های گوشتی، *سالمونلا*، *اشریشیا کلی* O157:H7، Multiplex PCR

* **نویسنده مسئول:** ایران، گرگان، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، دانشکده پزشکی، گروه میکروب‌شناسی
Email: sajjad.yazdansetad@gmail.com

مقدمه

بیماری‌های ناشی از آلودگی مواد غذایی با پاتوژن-های میکروبی، یک خطر جدی سلامت در سراسر جهان است. انواع مختلفی از میکروارگانیسم‌ها از جمله باکتری‌ها، ویروس‌ها، قارچ‌ها و انگل‌ها می‌توانند باعث آلودگی مواد غذایی و در نتیجه باعث انتقال به انسان شوند(۱، ۲). در میان پاتوژن‌های منتقله از غذا، باکتری‌های *اشرشیا کلی* و *سالمونلا* شیوع بیشتری داشته و می‌توانند به طور بالقوه از فرآورده‌های غذایی جدا شوند. *اشرشیا کلی* O157:H7 یکی از خطرناک‌ترین باکتری‌های پاتوژن مواد غذایی است. اگرچه اکثر عفونت‌های ناشی از این باکتری خود محدود شونده است، اما می‌تواند باعث بیماری‌های تهدید کننده حیات مثل کولیت خون ریزی دهنده و سندروم همولایتیک-اورمیک در کودکان و بیماران دچار نقص ایمنی شود. بنابراین به تنهایی مسئول بسیاری از موارد عفونت و مرگ و میر در سراسر جهان می‌باشد(۳، ۴). از طرفی *سالمونلا* یکی از علت‌های مهم گاستروانتریت باکتریایی است که هر ساله در ایالات متحده ۱/۴ میلیون مورد بیماری را در انسان ایجاد کرده که ۳۰ درصد آن ها از آلودگی‌های غذایی گزارش شده است(۵،۶). در میان گونه‌های *سالمونلا*، *سالمونلا تایفی موریوم* مهم‌ترین علت عفونت‌های منتقل شونده از طریق غذا است(۳). کنترل نمودن مواد غذایی از نظر وجود این پاتوژن‌ها، برای اطمینان از تأمین مواد غذایی سالم و به حداقل رساندن بیماری‌های ناشی از آن ضروری است(۲، ۵). روش‌های مرسوم برای تشخیص باکتری‌های پاتوژن در مواد غذایی معمولا بر اساس شناسایی باکتری با استفاده از محیط‌های کشت انتخابی، مشخصات مورفولوژی، تست‌های بیوشیمیایی و ایمونولوژی انجام می-شود. این روش‌ها زمان بر بوده و معمولا به ۴ تا ۷ روز زمان نیاز دارند(۹-۷). از طرفی حساسیت این روش‌ها پایین بوده و ممکن است قادر به شناسایی باکتری‌هایی که تعدادشان در نمونه کم است، نباشند(۱۰،۷). بنابراین روشی سریع با حساسیت و اختصاصیت بالا جهت شناسایی باکتری منتقل شونده از طریق مواد غذایی الزامی است. اخیراً با گسترش تکنیک‌های مولکولی، واکنش زنجیره ای پلیمراز به عنوان یک ابزار مهم در شناسایی ارگانیسم‌های بیماری‌زا در نمونه-های غذایی بکار می‌رود. روش PCR چندگانه امکان آنالیز چند ژن به طور همزمان در یک واکنش را فراهم ساخته و موجب صرفه‌جویی در زمان و مواد می‌گردد(۱۱). این مطالعه با هدف تشخیص توام *سالمونلا* و *اشریشیا کلی* O157:H7 در فرآورده‌های گوشتی و بررسی میزان آلودگی بر مبنای تکثیر دو ژن *rfbE* و *invA* با روش Multiplex PCR در استان زنجان انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

سویه‌های باکتریایی و شرایط رشد

سویه‌های کنترل استفاده شده در این مطالعه از کلکسیون میکروبی موسسه واکسن و سرم سازی کرج و انیستیتو پاستور ایران تهیه شد. سویه‌ها شامل *اشرشیا کلی* O157:H7 (ATCC 43889- ATCC 43890)، *سالمونلا انتریکا* سروتیپ تایفی‌موریوم (ATCC 13076)، *سالمونلا تایفی* (PTCC 1609)، *اشرشیا کلی* (ATCC 25922)، *باسیلوس سرئوس* (ATCC 49063)، *لیستریا مونوسایتوژنز* (ATCC 15313)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC 25923) بودند. جهت آماده سازی این سویه‌ها برای انجام PCR، ابتدا در محیط لوریا برتانی (LB) به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد گرماگذاری و سپس DNA آن ها با استفاده از کیت (سیناژن) استخراج گردید (۱۲) و تا قبل از انجام PCR چندگانه در فریزر نگهداری شد.

طراحی پرایمر

جهت طراحی پرایمرها از نرم افزارهای Gene Runner و Oligo استفاده شد. پرایمرهای طراحی شده توسط نرم‌افزار BLAST از نظر ساختار و شباهت با سایر میکروارگانیسم‌های مشابه بررسی و انتخاب شدند. پرایمرها بر

اساس غلظت ذکرشده توسط شرکت سازنده (Macrogen, Korea)، در آب مقطر تزریقی با غلظت ۱۰۰ پیکومول تهیه شده و سپس رقت ۱۰ پیکومول از آن غلظت جهت استفاده تهیه و در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در جدول ۱ توالی و مشخصات پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه ذکر شده است.

جدول۱. توالی‌های پرایمرهای استفاده شده برای تکثیر قطعات مورد نظر

نام باکتری	ژن هدف	اندازه محصول (bp)	توالی پرایمر (5´_3´)	دمای اتصال (°C)
سالمونلا	*invA*	۲۹۱	F: TAC TTA ACA GTG CTC GTT TAC	۶۱/۸
			R: ATA AAC TTC ATC GCA CCG TCA	۵۹/۵
اشرشیا کلی O157:H7	*rfbE*	۷۱۷	F: CGA GTA CAT TGG CAT CGT	۶۵/۱
			R: ATT GCG CTG AAG CCT TTG	۶۷/۷

جمع آوری و آماده سازی نمونه‌ها

جهت بررسی میزان آلودگی نمونه‌های گوشتی در استان زنجان، تعداد ۷۴ نمونه (همبرگر دست ساز) به صورت تصادفی از نواحی مختلف استان زنجان جمع آوری گردید. به منظور آماده سازی نمونه‌ها، ۲۵ گرم از هر نمونه به همراه ۲۲۵ میلی‌لیتر محیط مولرهینتون براث به طور کامل یکنواخت سازی و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری گردید. بعد از غنی سازی نمونه‌ها، جهت بررسی از نظر آلودگی با هردو روش کشت و PCR چندگانه مورد آزمایش قرار گرفت. یک میلی‌لیتر از هر سوسپانسیون غنی شده باکتری محیط مک کانکی آگار کشت و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. بعد از ۲۴ ساعت کلنی‌ها از نظر وجود *اشرشیاکلی* O157:H7 و *سالمونلا* با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین جهت انجام PCR چندگانه، از سوسپانسیون فوق استخراج DNA با استفاده از کیت سیناژن انجام شد(۱۲). کمیت وکیفیت DNA استخراج شده به دو روش اسپکتوفوتومتری با طول موج ۲۶۰ نانومتر و الکتروفورز روی ژل آگارز ۱ درصد مورد ارزیابی قرار گرفت.

بهینه سازی شرایط Multiplex PCR

طراحی پرایمرهای اختصاصی برای توالی ژن‌های *rfbE* *اشریشیاکلی* و *invA* *سالمونلا* به گونه‌ای انجام شد که محصولات با اندازه‌های متفاوت و قابل تفکیک از یکدیگر و همچنین شرایط انجام Multiplex PCR را داشته باشند. جهت بهینه‌سازی واکنش پارامترهایی که مورد ارزیابی قرار گرفتند، دمای اتصال پرایمرها، غلظت نهایی پرایمرها، غلظت $MgCl_2$، غلظت dNTP و غلظت آنزیم *Taq* DNA بودند. واکنش با حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر، شامل ۱۰ نانوگرم برمیکرولیتر DNA الگو، ۰/۵-۰/۱ میکرومولار از هر پرایمر ریورس و فوروارد، ۰/۲-۰/۰۲ میلی مولار dNTP، ۱-۴ میلی‌مولار $MgCl_2$، ۵ میکرولیتر PCR buffer 10X، ۲-۰/۵ واحد آنزیم *Taq* DNA پلیمراز انجام شد. PCR با روش استاندارد و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی در دستگاه ترمال‌سایکلر گرادیانت (اپندورف، آلمان) تحت شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت شدن اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ چرخه واسرشت شدن در دمای ۹۵ درجه به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال در ۴ دمای مختلف ۵۵، ۵۸، ۶۱ و ۶۴ درجه سانتی‌گراد یک دقیقه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. محصول

DNA در بافر TBE با غلظت استاندارد و بر روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز گردید و با DNA safe stain رنگ آمیزی و در دستگاه ژل داک مورد بررسی قرار گرفت(۱۱).

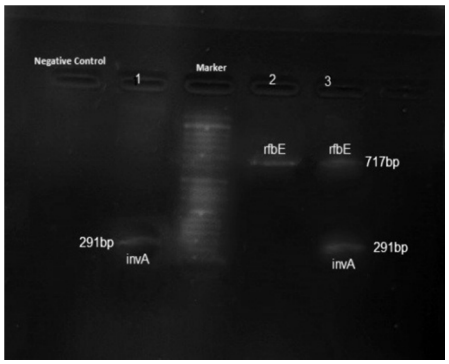
تلقیح باکتری به نمونه‌ها به صورت مصنوعی

همبرگرهای دست‌ساز پس از جمع‌آوری با استفاده از پرتودهی رادیواکیتو استریل شدند. به منظور اطمینان از عدم آلودگی، نمونه‌ها با استفاده از کشت و تست‌های بیوشیمیایی مورد بررسی قرار گرفت. جهت آماده سازی نمونه‌ها، ۲۵ گرم از همبرگرهای دست ساز استریل با ۲۲۵ میلی‌لیتر مولرهینتون براث هموژنیزه شد. سپس از سویه‌های باکتری *سالمونلا* و *اشرشیاکلی* O157:H7 رقت‌های مختلف 10^{2}، 10^{4}، 10^{6} و 10^{8} واحد تشکیل کلنی بر میلی لیتر تهیه گردید. در هر سوسپانسیون تهیه شده از هر نمونه همبرگر، مقدار یک میلی لیتر از رقت‌های تهیه شده اضافه شد و در زمان‌های ۱۲، ۱۸ و ۲۴ ساعت و در ۳۷ درجه‌سانتی‌گراد گرماگذاری گردید. سپس در هر کدام از زمان‌های گرماگذاری، یک میلی لیتر از سوسپانسون باکتری برداشته و جهت انجام PCR چندگانه، DNA آن ها استخراج گردید(۱).

یافته‌ها

بهینه‌سازی شرایط Multiplex PCR

با اعمال شرایط مختلف دمایی و بکارگیری غلظت-های مخلف واکنش‌گرهای PCR، غلظت نهایی هر یک از پرایمرهای فوروارد و ریورس ۰/۴ میلی‌مولار، غلظت ۲ میلی‌مولار $MgCl_2$ ، غلظت ۰/۲ میلی‌مولار dNTP و غلظت آنزیم *Taq* DNA پلیمراز ۱ واحد بهینه‌سازی گردید. جهت یافتن بهترین دمای اتصال، ابتدا تکثیر هر ژن به تنهایی در دماهای مختلف انجام شد و پس از به دست آوردن بهترین شرایط و دمای مشترک این بار هر دو پرایمر به صورت همزمان PCR چندگانه انجام شد که در نهایت دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد به عنوان بهترین دما از جهت کیفیت باندها و عدم مشاهده باندهای غیر اختصاصی انتخاب شد. اندازه محصول PCR پیش‌بینی شده برای ژن *rfbE*، ۷۱۷ bp و برای ژن *invA*، ۲۹۱ bp بود (شکل ۱). جهت کنترل منفی واکنش از آب مقطر به جای DNA الگو در واکنش تکثیر استفاده شد.



شکل ۱. تکثیر ژن‌های *invA* سالمونلا و *rfbE* اشرشیا کلی O157:H7. ستون ۱: ژن *invA* در *سالمونلا* در اندازه ۲۹۱ bp، ستون ۲:ژن *rfbE* در *اشرشیا کلی* در اندازه ۷۱۷ bp ، ستون ۳: تکثیر همزمان ژن‌های *invA* و *rfbE* ، ستون Marker: مارکر ۵۰ bp

بررسی اختصاصیت Multiplex PCR

اختصاصیت واکنش با استفاده از سویه‌های کنترل مثبت و منفی مورد بررسی قرار گرفت. سویه‌های کنترل مثبت شامل *اشرشیاکلی* O157:H7 و *سالمونلا* بودند که نتایج واکنش برای آن ها مثبت بود. هم چنین از چهار سویه کنترل منفی شامل *باسیلوس سرئوس*، *اشرشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *لیستریا مونوسایتوژنز* استفاده شد که از نظر وجود ژن‌های *rfbE* و *invA* منفی بودند و هیچ واکنش غیر اختصاصی مشاهده نشد. نتایج حاصل از سویه های کنترل در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول۲. سویه‌های باکتریایی استفاده شده در اختصاصیت PCR چندگانه

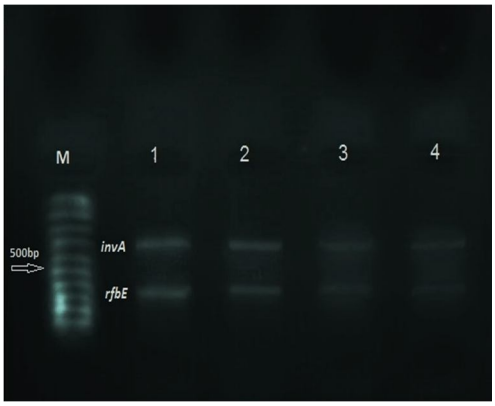
باکتری	منبع	نتایج PCR چندگانه	
		rfbE	*invA*
اشرشیاکلی O157:H7	ATCC 43889	+	–
اشرشیاکلی O157:H7	ATCC 43890	+	–
سالمونلا	ATCC 13076	–	+
سالمونلا	PTCC 1609	–	+
اشرشیاکلی	ATCC 25922	–	–
لیستریا مونوسایتوژنز	ATCC 15313	–	–
باسیلوس سرئوس	ATCC 49063	–	–
استافیلوکوکوس اورئوس	ATCC 25923	–	–

بررسی حساسیت Multiplex PCR

به منظور ارزیابی حساسیت تست در نمونه‌های غذایی، رقت‌های مختلف $۱۰^{۲}$، $۱۰^{۴}$، $۱۰^{۶}$ و $۱۰^{۸}$ واحد تشکیل کلنی بر میلی لیتر از باکتری‌های *اشرشیا کلی* O157:H7 و *سالمونلا* تهیه و به همبرگرهای دست‌ساز تلقیح و در ۳۷ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد. سپس در زمان‌های مختلف ۱۲، ۱۸، ۲۴ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. از نمونه های استریل به عنوان کنترل منفی تست استفاده شد. نتایج حاصل از ۲۴ ساعت انکوباسیون در شکل ۲ نشان داده شده است. جدول ۳ نتایج آزمون PCR حاصل از تلقیح سویه‌های استاندارد به نمونه‌های گوشتی را در زمان‌های مختلف انکوباسیون نشان می‌دهد. PCR چندگانه توانست به درستی هر دو پاتوژن غذایی را در کمترین غلظت ($۱۰^{۲}$ واحد تشکیل کلنی بر میلی لیتر) شناسایی کند.

جدول ۳. نتایج آزمون PCR چندگانه حاصل از تلقیح سویه‌های استاندارد به نمونه‌های گوشتی در زمان‌های انکوباسیون ۱۲، ۱۸ و ۲٤ ساعت

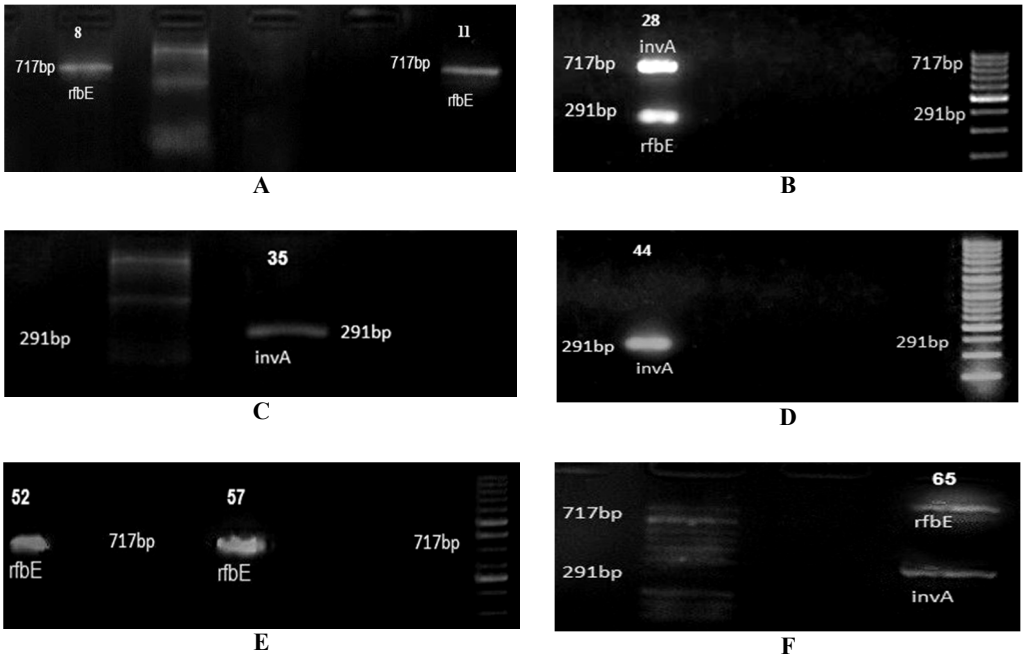
باکتری	زمان انکوباسیون (ساعت)	رقت(واحد تشکیل کلنی بر میلی لیتر)	نتایج PCR چندگانه
اشرشیاکلی O157:H7 (ATCC 43890)	۱۲	$۱۰^{۲}$	–
	۱۲	$۱۰^{۴}$	–
	۱۲	$۱۰^{۶}$	–
	۱۲	$۱۰^{۸}$	–
	۱۸	$۱۰^{۲}$	–
	۱۸	$۱۰^{۴}$	–
	۱۸	$۱۰^{۶}$	–
	۱۸	$۱۰^{۸}$	–
	۲۴	$۱۰^{۲}$	+
	۲۴	$۱۰^{۴}$	+
	۲۴	$۱۰^{۶}$	+
	۲۴	$۱۰^{۸}$	+
سالمونلا (ATCC 13076)	۱۲	$۱۰^{۲}$	–
	۱۲	$۱۰^{۴}$	–
	۱۲	$۱۰^{۶}$	–
	۱۲	$۱۰^{۸}$	–
	۱۸	$۱۰^{۲}$	–
	۱۸	$۱۰^{۴}$	–
	۱۸	$۱۰^{۶}$	–
	۱۸	$۱۰^{۸}$	–
	۲۴	$۱۰^{۲}$	+
	۲۴	$۱۰^{۴}$	+
	۲۴	$۱۰^{۶}$	+
	۲۴	$۱۰^{۸}$	+



شکل۲. حساسیت تشخیص PCR چندگانه در نمونه‌های تلقیح شده با غلظت‌های مختلف باکتری‌های *اشرشیا کلی* O157:H7 و *سالمونلا* بعد از ۲٤ ساعت گرماگذاری. ستون ۱: غلظت 10^8 واحد تشکیل کلنی بر میلی لیتر ، ستون ۲: غلظت واحد تشکیل کلنی بر میلی لیتر 10^6، ستون ۳: غلظت 10^4 واحد تشکیل کلنی بر میلی لیتر و ستون ٤: غلظت 10^2 واحد تشکیل کلنی بر میلی لیتر ، ستون M: مارکر ۱۰۰bp.

بررسی نمونه‌های همبرگر از نظر آلودگی به *اشرشیا کلی* O157:H7 و *سالمونلا*

پس از بهینه‌سازی شرایط واکنش PCR چندگانه در سویه‌های استاندارد، وجود یا عدم وجود ژن‌های هدف در باکتری‌های مورد نظر موجود در نمونه‌های همبرگر بررسی گردید. در مجموع ۷۴ نمونه مورد بررسی قرار گرفت که از این تعداد ۶ نمونه (۸ درصد) دارای ژن *rfbE* بودند که نشان دهنده وجود باکتری *اشرشیا کلی* O157:H7 بود. هم چنین ۴ نمونه (۵/۴ درصد) دارای ژن *invA* بودند که معرف حضور باکتری *سالمونلا* در نمونه‌ها بود. در دو نمونه (۲/۷ درصد) نیز هردو ژن در نمونه‌ها یافت شد که نشان دهنده آلودگی همزمان به دو باکتری *اشرشیاکلی* O157:H7 و *سالمونلا* بود (شکل۳). نتایج حاصل از PCR چندگانه با استفاده از کشت و آزمون‌های بیوشیمیایی نیز تأیید شد.



شکل۳. شناسایی *اشرشیا کلی* O157:H7 و *سالمونلا* در نمونه‌های همبرگر به روش PCR چندگانه. تصاویر A, E: نمونه‌های همبرگر که از نظر ژن rfbE مثبت بودند، تصاویر C, D: نمونه‌های همبرگر که از نظر ژن *invA* مثبت بودند، تصاویر B, F: نمونه‌های همبرگر که از نظر هر دو ژن *rfbE* و *invA* مثبت بودند.

بحث

اشرشیاکلی O157:H7 و *سالمونلا* از جمله خطرناک‌ترین پاتوژن‌های باکتریایی منتقل شونده از طریق غذا هستند که سالانه موجب بیماری و حتی مرگ می‌شوند، علاوه بر این ضررهای اقتصادی زیادی به صنایع غذایی وارد می‌کنند(۵، ۱۳). روش‌های مرسوم که جهت شناسایی پاتوژن‌های غذایی استفاده می‌شوند زمان بر بوده و عموماً از حساسیت پایینی برخوردار است. بنابراین به کارگیری روشی سریع و قابل اطمینان جهت شناسایی پاتوژن‌های مواد غذایی ضروری به نظر می‌رسد(۱۴). در این مطالعه به طور همزمان از دو ژن *rfbE* و *invA* جهت شناسایی *اشرشیاکلی* O157:H7 و *سالمونلا* در فراورده های گوشتی استان زنجان با روش PCR چندگانه استفاده شد. در یک PCR چندگانه، بیش از یک توالی هدف با استفاده از چندین جفت پرایمر در یک واکنش می‌تواند تکثیر پیدا کند. انتخاب جفت پرایمرها در واکنش PCR چندگانه برای تشخیص همزمان پاتوژن‌های منتقله از مواد غذایی با حساسیت بالا و هم چنین جلوگیری از واکنش متقاطع از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. جفت پرایمرهای طراحی شده در این مطالعه شامل *rfbE*-F/R برای ردیابی توالی bp ۷۱۷ از ژن *rfbE* *اشرشیا کلی* O157:H7 می‌باشد. ژن rfbE یکی از مهم‌ترین ژن‌های ویرولانس این باکتری است که ژن پنجم کلاستر *rfb* بوده و مسئول کد کردن آنتی ژن O157 در *اشرشیا کلی* O157:H7 است(۳، ۱۵،۱۶). از آن‌جایی که این ژن در تمامی مراحل رشد باکتری، از اوایل فاز لگاریتمی تا انتهای فاز سکون نسخه برداری می شود، به عنوان یک مارکر مناسب برای شناسایی این باکتری بحساب می‌آید. هم چنین این ژن برای این باکتری اختصاصی بوده و سروتیپ O157 را از سایر سروتیپ ها جدا می‌کند(۳، ۱۵). ژن *rfbE* به عنوان ژن مرجع برای ردیابی و تشخیص *اشرشیاکلی* O157:H7 در فراورده های غذایی در مطالعات مختلف ذکر شده است. موسوی و همکاران دو سویه استاندارد *اشرشیاکلی* O157:H7 را به طور مصنوعی به نمونه‌های گوشتی، فرآورده‌های لبنی و آب آشامیدنی تلقیح کردند و با روش PCR بر مبنای تکثیر ژن *rfbE* به تشخیص باکتری پرداختند که از حساسیت و ویژگی بالایی برخوردار بود(۳). این مورد با مطالعه ما مطابقت داشت که باکتری‌ها به ۷۴ نمونه گوشتی تلقیح شد و حساسیت و اختصاصیت تشخیص بررسی شد. در مطالعات دیگری که از ژن *rfbE* برای شناسایی سروتیپ‌های O157 استفاده شده است، اتصال متقاطع با بعضی سروتیپ های غیر O157 دیده شده که باعث شناسایی غیر اختصاصی ارگانیسم شده است(۱۵، ۱۷). دومین جفت پرایمر طراحی شده در این مطالعه، *invA*-F/R برای ردیابی توالی bp ۲۹۱ از ژن *invA* *سالمونلا* بود. ژن *invA* یکی از ژن های کروموزومی ویرولانس *سالمونلا* و کدکننده پروتئینی در غشا داخلی باکتری است که مسئول تهاجم به سلول‌های اپی تلیال میزبان است(۱۸). این ژن دارای توالی‌های منحصر به فردی در این جنس بوده و به عنوان یک هدف مناسب برای PCR با پتانسیل تشخیص بالا اثبات شده است(۱۹). مطالعات دیگری نیز با استفاده از این ژن به شناسایی *سالمونلا* در نمونه های غذایی پرداختند، نتایج حاصل از آن ها نشان داده که ژن *invA* تنها برای این جنس اختصاصی بوده و از حساسیت بالایی برخوردار می‌باشد(۲۲-۲۰). یک فاکتور مهم در ارزیابی تست‌های بر پایه PCR، اختصاصیت توالی DNA انتخاب شده برای جنس و سویه هدف می‌باشد. نتایج نشان داد که این دو جفت پرایمر در واکنش PCR چندگانه به طور مستقل از هم به خوبی عمل می کنند. برای ارزیابی اختصاصیت واکنش در این مطالعه از سایر باکتری هایی که ممکن است از فرآورده های غذایی جدا شوند از جمله *باسیلوس سرئوس*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *لیستریا مونوسایتوژنز* و *اشرشیا کلی* (سروتیپ غیر O157) به عنوان کنترل منفی استفاده شد. نتایج حاصل از این آزمایش‌ها نشان داد که پرایمرهای طراحی شده تنها با ژن‌های هدف خود باند تشکیل داده و هیچ گونه باند غیر اختصاصی با سایر سویه‌ها ایجاد نکردند. برای تعیین حساسیت واکنش

PCR چندگانه در نمونه‌های غذایی، همبرگرهای دست ساز استریل با غلظت‌های مختلف (10^2-10^8 واحد تشکیل کلنی بر میلی لیتر) از هر دو پاتوژن هدف به طور مصنوعی آلوده و در زمان‌های ۱۲، ۱۸، ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. DNA استخراج شده از این نمونه ها با استفاده از PCR چندگانه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که بعد از ۲۴ ساعت غنی‌سازی، واکنش PCR چندگانه قادر بود به درستی حضور هر دو پاتوژن را در نمونه-های تلقیح شده در کمترین غلظت باکتری‌ها (10^2 واحد تشکیل کلنی بر میلی لیتر) شناسایی کند. به طور مشابهی در مطالعه کیم و همکارانش که به تشخیص همزمان پنج پاتوژن غذایی *لیستریا منوسایتوژنز*، *اشرشیاکلی*، *باسیلوس سرئوس*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سالمونلا* در شیرکم چرب پرداختند، بعد از ۱۸ ساعت انکوباسیون در غلظت 10^2 واحد تشکیل کلنی بر میلی لیتر تمامی پاتوژن ها قادر به شناسایی بودند(۲۳). هم‌چنین در مطالعه که یانگ و همکاران بر روی چندین فراورده غذایی انجام داده بود، هر سه پاتوژن مورد مطالعه از جمله *اشرشیاکلی* O157:H7 ، *سالمونلا تایفی موریوم* و *لیستریامونوسایتوژنز* به طور همزمان در غلظت 10^2 واحد تشکیل کلنی بر میلی لیتر قابل شناسایی بودند(۲۴). گوین و همکاران نیز پاتوژن‌های اشرشیا *کلی* O157:H7، *سالمونلا* و *لیستریا مونوسایتوژنز* را در غلظت 10^1 واحد تشکیل کلنی بر میلی لیتر و با حساسیت بالا در نمونه‌های غذایی شناسایی کردند(۱۱). حساسیت‌های بالاتر می‌تواند به علت تفاوت در روش‌های غنی‌سازی باشد. محیط‌های غنی شده به بالا رفتن جمعیت زندهٔ باکتری‌ها و در نهایت افزایش حساسیت تست کمک می‌کند(۳).

نتیجه‌گیری

واکنش PCR چندگانه، برای شناسایی هر دو ژن *rfbE* و *invA* *اشرشیاکلی* O157:H7 و *سالمونلا* در نمونه‌های غذایی از اختصاصیت و حساسیت بالای برخوردار است. از این رو، به عنوان یک ابزار غربال‌گری سریع و قابل اعتماد در آزمایشگاه‌های تشخیصی مواد غذایی جهت شناسایی همزمان پاتوژن‌های منتقله از راه غذا و نیز کنترل آلودگی‌های مواد غذایی می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله نویسندگان از کلیه کسانی که در انجام این پژوهش همکاری و مساعدت نمودند صمیمانه سپاس‌گزاری می نمایند.

منابع

1.Germini A, Masola A, Carnevali P, Marchelli R. Simultaneous detection of *Escherichia coli* O175: H7, *Salmonella* spp., and *Listeria monocytogenes* by multiplex PCR. Food Control. 2009; 20(8):733-8.

2. Law JW-F, Ab Mutalib N-S, Chan K-G, Lee L-H. Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations. Front microbiol. 2015; 5:770.

3.Mousavi SL, Rasooli I, Nazarian S, Amani J. Simultaneous detection of *Escherichia coli* O157: H7, toxigenic *Vibrio cholerae*, and *Salmonella typhimurium* by multiplex PCR. Arch Clin Infect Dis. 2009; 4(2):97-103.

4.Chen J, Tang J, Liu J, Cai Z, Bai X. Development and evaluation of a multiplex PCR for simultaneous detection of five foodborne pathogens. J Appl Microbiol. 2012; 112(4):823-30.

5.Suo B, He Y, Tu S-I, Shi X. A multiplex real-time polymerase chain reaction for simultaneous detection of *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157, and *Listeria monocytogenes* in meat products. Foodborne Pathog Dis. 2010; 7(6):619-28.

6.Kawasaki S, Fratamico PM, Kamisaki-Horikoshi N, Okada Y, Takeshita K, Sameshima T, et al. Development of the Multiplex PCR Detection Kit for

Salmonella spp., *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* O157: H7. Jpn Agric Res Q: JARQ. 2011; 45(1):77-81.
7.Rathnayaka R, Nguyen T. Simultaneous detection of four food borne Bacterial pathogens by metal hydroxide immobilised multiplex PCR method. Tropical Agric Res Extension. 2010; 12(1).
8.Kim JS, Lee GG, Park JS, Jung YH, Kwak HS, Kim SB, et al. A novel multiplex PCR assay for rapid and simultaneous detection of five pathogenic bacteria: *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, and *Vibrio parahaemolyticus*. J Food Prot. 2007; 70(7):1656-62.
9.Kawasaki S, Fratamico PM, Horikoshi N, Okada Y, Takeshita K, Sameshima T, et al. Evaluation of a multiplex PCR system for simultaneous detection of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* O157: H7 in foods and in food subjected to freezing. Foodborne Pathog Dis. 2009; 6(1):81-9.
10.Lee N, Kwon KY, Oh SK, Chang H-J, Chun HS, Choi S-W. A multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Escherichia coli* O157: H7, *Bacillus cereus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, and *Staphylococcus aureus* in Korean ready-to-eat food. Foodborne Pathog Dis. 2014; 11(7):574-80.
11.Nguyen TT, Van Giau V, Vo TK. Multiplex PCR for simultaneous identification of *E. coli* O157: H7, *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes* in food. 3 Biotech. 2016; 6(2):205.
12.Peeridogaheh H, Valinejad Z, Pourfarzi F. Evaluation of three DNA extraction methods for detection of *brucella* DNA in human serum samples. (AMUJ). 2012; 14(6, Suppl 3):40-8.
13.Sharma VK, Carlson SA. Simultaneous detection of *Salmonella* strains and *Escherichia coli* O157: H7 with fluorogenic PCR and single-enrichment-broth culture. Appl Environ Microbiol. 2000; 66(12):5472-6.
14.Omiccioli E, Amagliani G, Brandi G, Bruce IJ, Magnani M. Simultaneous direct detection of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157 in milk samples by magnetic extraction and multiplex PCR. J Rapid Methods Autom Microbiol. 2009; 17(2):195-213.
15.Jeshveen S, Chai LC, Pui CF, Radu S. Optimization of multiplex PCR conditions for rapid detection of *Escherichia coli* O157: H7 virulence genes. Int Food Res J. 2012; 19(2):461-6.
16.Wang H, Zhang C, Xing D. Simultaneous detection of *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* O157: H7, and *Listeria monocytogenes* using oscillatory-flow multiplex PCR. Microchimica Acta. 2011; 173(3-4):503-12.
17.Chapman P, Siddons C, Malo AC, Harkin M. A one-year study of *Escherichia coli* O157 in raw beef and lamb products. Epidemiol Infect. 2000; 124(02):207-13.
18.Upadhyay BP, Utrarachkij F, Thongshoob J, Mahakunkijcharoen Y, Wongchinda N, Suthienkul O, et al. Detection of *Salmonella invA* gene in shrimp enrichment culture by polymerase chain reaction. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2010; 41(2):426-35.
19.Shanmugasamy M, Velayutham T, Rajeswar J. InvA gene specific PCR for detection of *Salmonella* from broilers. Vet World. 2011; 4(12):562-4.
20.Lei I-F, Roffey P, Blanchard C, Gu K. Development of a multiplex PCR method for the detection of six common foodborne pathogens. J Food Drug Anal. 2008; 16(4):37-43.
21.Tavakoli HR, Najafi A, Ahmadi A. Rapid, specific and concurrent detection of *Listeria, Salmonella* and *Escherichia coli* pathogens by multiplex PCR in Iranian food. Afr J Microbiol Res. 2010; 4(23):2503-7.
22.Jeyasekaran G, Raj KT, Shakila RJ, Thangarani AJ, Sukumar D, Jailani VAK. Rapid detection of *Salmonella enterica* serovars by multiplex PCR. World J Microbiol Biotechnol. 2011; 27(4):953-9.
23.Kim J-H, Rhim S-R, Kim K-T, Paik H-D, Lee J-Y. Simultaneous Detection of *Listeria* monocytogenes, *Escherichia coli* O157: H7, *Bacillus cereus*, *Salmonella* spp., and *Staphylococcus aureus* in Low-fatted Milk by

treatment and multiplex PCR assay for simultaneous detection of viable *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli* O157: H7 and *Listeria monocytogenes* in food products. Food Microbiol. 2013; 34(2):418-24.

Multiplex PCR. Korean J Food Sci An. 2014; 34(5):717.

24.Yang Y, Xu F, Xu H, Aguilar ZP, Niu R, Yuan Y, et al. Magnetic nano-beads based separation combined with propidium monoazide