مجله میکرب شناسی پزشکی ایران
سال ۵ شماره ۷، زمستان ۱۳۹۰ صفحات ۳۴- ۲۹

بکارگیری روش P-CEIA در تشخیص سریع سالمونلا در فرآورده های لبنی

رحمان شکری[۱*]، بهمن تبرایی[۲]، صدیقهٔ حاتمی[۱]، امید نیلچی زاده رهبر[۱]

۱) بخش تولید فرآورده های دارویی نوترکیب، انستیتو پاستور ایران، مجتمع کرج،
۲) بخش تولید واکسن های باکتریایی، انستیتو پاستور ایران، مجتمع کرج،
* نویسندهٔ رابط: رحمان شکری، بخش تولید فرآورده های دارویی نوترکیب، انستیتو پاستور، کیلومتر ۲۵ اتوبان تهران-کرج، مجتمع تولیدی تحقیقاتی، کد پستی15111-31599، تلفاکس: ۰۲۶۱۶۱۰۱۶۴۲

Rshokri_54@yahoo.com
shokrei@gmail.com

چکیده :

زمینه و اهداف: این تحقیق به منظور شناسایی و تشخیص سریع گونه های مختلف سالمونلا در فرآورده های لبنی مورد استفاده قرار گرفت. از آنجائیکه روشهای مرسوم کشت باکتریایی و الایزا(Ab-EIA=Antibody-Enzyme Immuno Assay) در تشخیص باکتریهای پاتوژن نظیر سالمونلا زمان بر بوده و هزینه های بالایی را به خود اختصاص می دهند، لذا در این تحقیق از روش Polymixin – Coated Polyester Cloth in EIA (P-CEIA) ، جهت مقایسه با روش های فوق استفاده گردید.

روش بررسی: برای مقایسهٔ دو روش Ab-EIA و P-CEIA ، رقت های مختلف سالمونلا تیفی موریوم Ra-30 در پپتون واتر بافر شده (pH=7.4,BPW) تهیه گردید. همچنین ده نمونهٔ شیر و خامهٔ مشکوک به سالمونلا با دو روش فوق مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: بررسی نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که با استفاده از سویهٔ استاندارد سالمونلا تیفی موریوم Ra-30، حساسیت روش P-CEIA، معادل 10^6 cfu/mL است، در حالیکه این میزان در روش Ab-EIA، 10^5cfu/ml بود. پس از تیمار حرارتی در حضور دترجنت سدیم دزوکسی کولات حساسیت دو روش با هم برابر گردید. ضمناً از ده نمونه مشکوک شیر و خامه در روش Ab-EIA بترتیب ۵ و ۳ نمونهٔ مثبت و در روش P-CEIA، نیز بترتیب ۶و۳ نمونهٔ مثبت مشاهده گردید. همچنین انجام روش P-CEIA در حدود ۱۴ ساعت، زمان کمتری را نسبت به Ab-EIA به خود اختصاص داد.

نتیجه گیری: بررسی یافته ها در این تحقیق نشان داد که روش P-CEIA، روشی سریع، مقرون به صرفه و پایدار برای تشخیص سالمونلاها در فرآورده های لبنی می باشد.

کلید واژه ها: سالمونلا، P-CEIA، پلی میکسینB

مقدمه :

گونه های مختلف سالمونلا یکی از معضلات بهداشتی در مصرف مواد غذایی آلوده به ویژه در فرآورده های لبنی و گوشتی در سراسر جهان به شمار می روند. به طوری که در سالهای اخیر موارد سالمونلوزیس در انسان، ناشی از مصرف مواد غذایی رو به افزایش است(۳،۲). از این رو تشخیص سالمونلاها یکی از فاکتورهای مهم کنترل کیفی فرآورده های غذایی در کارخانجات تولید کننده می باشد. همچنین روش تشخیص سریع و مقرون به صرفه در این مراکز از اهمیت فوق العاده ای برخوردار است.

روش های مرسوم تشخیص سالمونلا مانند روش کشت بر روی محیط های مغذی ویا روش الایزا اغلب دارای مشکلات خاص خود می باشند .بعنوان مثال در روش کشت ، محیط های مغذی اغلب پرهزینه و زمانبر می باشد و این قضیه در موارد حاد از قبیل آلودگی فرآورده های غذایی که زمان عامل مهمی می باشد ، ایجاد مشکل می نماید.

روش الایزا علاوه بر هزینه بر بودن، ناپایدار نیز می باشد و همچنین عدم یکنواختی کیفیت آنتی بادی در بچ های مختلف ارزیابی نتایج حاصله را با مشکل مواجه می سازد.

بنابراین ارایهٔ روش سریع ، ساده و ارزان برای تشخیص سالمونلاهادر مواد غذایی از الزامات کنترل کیفی می باشد.از این جهت روش

P-CEIA (Polymyxin – Cloth Enzyme Immunoassay) برای این منظور توسعه یافت. این روش بر پایهٔ استفاده از پلی استر پوشش داده شده با پلی میکسین که برای جذب آنتی ژن های لیپوپلی ساکارید مناسب است ، استوار می باشد. در این روش از پلی میکسین B بجای آنتی بادی در شناسایی سالمونلا استفاده گردید . پلی میکسین B یک آنتی بیوتیک است که اثر کشندگی بر روی باکتریهای گرم منفی دارد . این ماده خیلی ارزانتر از آنتی بادی بوده و برخلاف آنتی بادیها که بسیار ناپایدار هستند پلی میکسین ها در pH های بین ۲ تا ۷ پایدار بوده و شکل خالص آن نیز براحتی در دسترس می باشد . همچنین پلی میکسین دارای قدرت چسبندگی اختصاصی به LPS سالمونلا است(۱۳). لذا با در نظر گرفتن این موارد،از پلی میکسین B بعنوان یک جایگزین برای آنتی بادیهای ناپایدار و گران ، استفاده شد.

مواد و روش ها :

در این تحقیق، سالمونلا تیفی موریوم Ra-30 از بخش واکسن های باکتریایی انستیتوپاستور ایران ابتیاع گردید. همچنین در روش الایزا(Ab-EIA)، کیت از شرکت Bio A.R.T تهیه شد.

آماده سازی نمونه :

ابتدا گونه سالمونلا تیفی موریوم سوش Ra-30 در پپتون واتر بافر شده(pH=7.4) کشت داده شد و در دمای 37^0C تا رسیدن به دانسیته 10^9 /ml باکتری، به مدت ۱۲ ساعت گرمخانه گذاری شد. سپس رقتهای مختلفی (10^2،10^4،10^5 ،10^6، 10^7 و10^8) تهیه گردید. از هر کدام از این رقتها 1mL در هر لوله آزمایش ریخته و به هر لوله 0.1 mL از محلول EDTA اضافه گردید و سپس بمدت ۱۰ دقیقه در دمای 100^0C حرارت داده شد. پس از سرد شدن در دمای اتاق جهت آزمایش به دو روش Ab-EIA و P-CEIA مورد استفاده قرار گرفتند. همچنین جهت افزایش حساسیت روش P-CEIA، نمونه های مشکوک و سویهٔ استاندارد سالمونلا تیفی موریوم در حضور سدیم دزوکسی کولات0.1% به مدت ده دقیقه در دمای 100^0C حرارت داده شدو سپس با هر دو روش مورد بررسی قرار گرفتند.

روش Ab-EIA :

مقدار 100 میکرولیتر از شاهد، کنترل منفی و کنترل مثبت را بترتیب در چاهکهای ابتدایی (از A1 تا C1) و ۱۰۰ میکرولیتر از هر نمونه به چاهک های بعدی اضافه گردید و در 37^0C به مدت ۳۰ دقیقه گرمخانه گذاری شد. پس از این مدت، چاهکها با ۲۰۰ میکرولیتر از بافر شستشو، سه مرتبه شستشو داده شدند. سپس مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محلول کونوژوگه به هر کدام از چاهکها باستثناء چاهک A1 (بلانک) افزوده شده و در 37^0C به مدت ۳۰ دقیقه گرمخانه گذاری گردید. سپس چاهکها مانند دفعهٔ قبل سه

بار شستشو داده شدند. پس از شستشوی مجدد، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوبسترای TMB(تترا متیل بنزیدین) به تمامی چاهکها اضافه گردید. چاهکها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق ($18-25^0C$) و در فضای تاریک نگهداری شد. سپس مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محلول متوقف کننده (Stop solution) به هر کدام از چاهکها اضافه گردید تا واکنش متوقف شود. شدت رنگ زرد ایجاد شده در میکروپلیت در طول موج 450 nm قرائت شد.

روش P.CEIA:

فاز جامد در این روش پلی استر می باشد . برای انجام آزمایش ، پلیت دی پلی استر با ٦٠ میلی لیتر از محلول پلی میکسین با غلظت mg/mL ۸ به مدت دو ساعت گرمخانه گذاری شد. بعد از این مدت، پلی میکسین های اضافی با سه بار شستشو با ۲۰۰ میکرولیتر از محلول PBS(pH=7.2) خارج گردید. سپس به هر یک از چاهک ها ٦٠ میکرولیتر از رقت های مختلف نمونه اضافه گردید و در 37^0C به مدت ۳۰ دقیقه گرمخانه گذاری شد. سپس چاهکها مانند دفعهٔ قبل سه بار شستشو داده شدند. پس از شستشوی مجدد، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوبسترای TMB(تترا متیل بنزیدین) به تمامی چاهکها اضافه گردید. چاهکها در دمای اتاق ($18-25^0C$) و در محل تاریک به مدت ۱۵ دقیقه نگهداری شد. بعد از این مدت، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محلول متوقف کننده (Stop solution) به هر کدام از چاهکها اضافه گردید تا واکنش متوقف شود. شدت رنگ آبی ایجاد شده در میکروپلیت در طول موج 370 nm قرائت شد.

مقایسه دو روش در نمونه های آلوده شیر :

ده نمونهٔ مشکوک شیر و خامه، طبق روش آماده سازی نمونه، تهیه و با استفاده از هر دو روش از نظر وجود سالمونلا بررسی گردیدند. در مورد این نمونه ها تنها از رقت 10^5استفاده گردید.

یافته ها :

جدول شمارهٔ ۱ نتایج روش Ab-EIA در مورد سوش میکروبی که با استفاده از دو روش: ۱- تیمار حرارتی + EDTA

جدول شمارهٔ 1: نتایج روش Ab-EIA بر روی سوش میکروبی

جذب نوری / رقت	10^2	10^4	10^5	10^6	10^7	10^8
جذب نوری 1	0.10	0.15	0.26	0.35	0.45	0.61
جذب نوری 2	0.12	0.15	0.25	0.38	0.44	0.65

1: تیمار حرارتی+ EDTA 2: تیمار حرارتی+ EDTA+ سدیم دزوکسی کولات

۲- تیمار حرارتی+ EDTA+ سدیم دزوکسی کولات آماده سازی شده است، را نشان می دهد. بر اساس کیت الایزا، نمونه های با جذب نوری بالاتر از 0.25، مثبت در نظر گرفته می شوند. بنابراین حداقل رقتی که قادر به آشکارسازی سالمونلا با هر دو روش آماده سازی می باشد 10^5cfu/ml است. در جدول شمارهٔ ۲ ، نتایج روش P-CEIA در مورد سوش میکروبی که با استفاده از دو روش تیمار، آماده سازی شده است نمایش داده شده است. در این روش در تیمار حرارتی + EDTA، حداقل رقتی که قادر به آشکارسازی سالمونلا می باشد 10^6cfu/ml است

جدول شمارهٔ2: نتایج روش P-CEIA بر روی سوش میکروبی

جذب نوری / رقت	10^2	10^4	10^5	10^6	10^7	10^8
جذب نوری 1	0.08	0.14	0.19	0.25	0.33	0.46
جذب نوری 2	0.12	0.18	0.27	0.35	0.42	0.62

1: تیمار حرارتی+ EDTA 2: تیمار حرارتی+ EDTA+ سدیم دزوکسی کولات

در حالیکه در تیمار حرارتی+ EDTA+ سدیم دزوکسی نتایج روش Ab-EIA بر روی ده نمونهٔ مشکوک شیر و ده نمونهٔ مشکوک خامه که در رقت 10^5cfu/ml و با روش تیمار حرارتی+ EDTA+ سدیم دزوکسی کولات آماده سازی شده اند در جدول شمارهٔ ۳ نشان داده شده

کولات این میزان به 10^5cfu/ml رسید.

است که در مورد شیر، ۵ نمونهٔ مثبت(نمونه های ۱، ۳، ٤، ٦ و ۹) و در مورد خامه، ۳ نمونهٔ مثبت(نمونه های ۲، ٤ و ٦) گزارش گردید.

جدول شمارهٔ3: نتایج روش Ab-EIA بر روی نمونه های مشکوک شیر و خامه

جذب نوری ـــــ شمارهٔ نمونه	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
جذب نوری در نمونهٔ شیر	0.41	0.09	0.65	0.44	0.24	0.49	0.17	0.11	0.78	0.06
جذب نوری در نمونهٔ خامه	0.10	0.28	0.19	0.65	0.06	0.45	0.21	0.02	0.16	0.11

در جدول شمارهٔ ٤، نتایج P-CEIA در مورد نمونه های مشکوک شیر و خامه که مانند روش Ab-EIA آماده سازی شده اند، نمایش داده شده است. با این روش، تعداد

٦ نمونهٔ شیر (نمونه های ۱، ۳، ٤،٥، ٦ و ۹) و ۳ نمونهٔ خامه (نمونه های ۲، ٤ و ٦)، مثبت گردید.

جدول شمارهٔ4: نتایج روش P-CEIA بر روی نمونه های مشکوک شیر و خامه

جذب نوری ـــــ شمارهٔ نمونه	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
جذب نوری در نمونهٔ شیر	0.40	0.07	0.67	0.47	0.27	0.65	0.20	0.10	0.75	0.10
جذب نوری در نمونهٔ خامه	0.12	0.26	0.23	0.64	0.09	0.49	0.19	0.05	0.16	0.13

بحث :

روش P-CEIA جهت تشخیص سالمونلا در مواد غذایی در سراسر جهان از اهمیت زیادی برخوردار است. بلیز(Blais)و همکاران در سال ۱۹۹۰، از پارچه پلی استر پوشش داده شده با پلی میکسین(P-CEIA)، جهت شناسایی آنتی ژن های لیپوپلی ساکاریدی سالمونلا تیفی موریوم استفاده نمودند(١٤). در تحقیقی دیگر بورتن(Burton) و همکاران در سال ۱۹۹۱،این روش را جهت سنجش نیمه کیفی سالمونلا در غذاهای فرآوری شده بکار بردند(۱۳). همچنین ونگ(Wang)وهمکاران در سال ۱۹۹۵، از روش مذکور جهت جداسازی سریع و مقرون به صرفه سالمونلا در تخم مرغ استفاده کردند و با

این روش دریافتند که تعداد خیلی کم سالمونلا انتریتیدیس(1–2cfu/ml) تلقیح شده به درون تخم مرغ قابل پیگیری است(۱۰). بلیز(Blais)و همکاران در سال۱۹۹۷، در یک تحقیق از روش تلفیقی (محیط های غنی کننده و روش P-CEIA)برای جداسازی سالمونلا در مواد غذایی، خوراک دام و نمونه های محیطی استفاده کردند و دریافتند که این روش تلفیقی قادر است که آلودگی نمونه های غذایی را در حدود 1–10cfu/ml مشخص کند(۸). ونگ(Wang)وهمکاران در سال ۱۹۹٦، در یک بررسی از آنتی سرم های تجاری در روش P-CEIA، به عنوان آنتی بادی شناساگر استفاده نمودند. آنها با این تحقیق پی بردند که با استفاده از P-CEIA،

شناسایی سالمونلا حتی در مقدار خیلی کم در نمونه های غذایی امکان پذیر است(۹). بر اساس منابع و مراجع موجود تاکنون استفاده از روش P-CEIA جهت شناسایی سالمونلا در مورد مواد غذایی در ایران گزارش نگردیده است.

در این مقاله رقت های مختلف میکروبی سالمونلا با دو روش Ab-EIA و P-CEIA بررسی شد. با توجه به اینکه بر اساس دستورالعمل کیت Ab-EIA، نمونه های با جذب نوری بالاتر از 0.25 مثبت و پایین تر از 0.25 منفی در نظر گرفته می شود. نتایج حاصله نشان داد که حداقل غلظت سلولی که روش Ab-EIA قادر به تشخیص آن است معادل 10^5 cfu/ml می باشد. در حالیکه در روش P-CEIA این رقت 10^6 cfu/mlاست. این مقادیر توسط ونگ(Wang)و همکاران در سال ۱۹۹۶، در مورد Ab-EIA، 10^6 cfu/ml و در مورد P-CEIA، 10^7 cfu/ml گزارش شده است(۹). بعبارت دیگر در این تحقیق حساسیت هر دو روش نسبت به داده های ونگ(Wang)و همکاران به میزان ۱۰ برابر بالاتر بود. اگرچه روش P-CEIA روشی ساده، سریع و ارزان است اما حساسیت آن نسبت به Ab-EIA کمتر است(۹). بنابراین جهت افزایش حساسیت این آزمون، بلیز(Blais) و همکاران، از تیمار حرارتی سالمونلا در سدیم دزوکسی کولات0.1% استفاده کردند(۱۵). در این تحقیق ما هم برای افزایش حساسیت، همین روش آماده سازی را بکار بردیم و یافته های آن، مطابق با نتایج گزارش شده توسط بلیز(Blais) و همکاران بود.

در مورد نمونه های شیر و خامه براساس رقت مورد استفاده ($۱۰^۵$ در هر دو روش و با تیمار حرارتی در حضور سدیم دزوکسی کولات) در روش Ab-EIA بترتیب ۵ و ۳ نمونه مثبت و در روش P-CEIA نیز بترتیب ٦ و ۳ نمونه مثبت بدست آمد .

بررسی نتایج حاصله از این مطالعه نشان می دهد که در بین سایر روش های EIA ، روش P-CEIA روشی است سریعتر ، ساده تر و ارزانتر. و می توان برای شناسایی بعضی دیگر از باکتریهای گرم منفی که پاتوژن غذایی می باشند (مانند کمپیلوباکتر) ، بکار برد . هزینه این روش خیلی کمتر (۱۰۰ برابر کمتر) از روش های دیگر EIA بوده و زمان آن نیز بسیار کوتاهتر (حدود١٤ ساعت کمتر) است . استفاده از صفحات پلی استر آغشته به پلی میکسین ، بخاطر پایداری آن ، معایب و مشکلات خاص روشهای دیگر EIA را بهمراه ندارد . با توجه به استفاده از بعضی دترجنت ها مانند سدیم دزوکسی کولات، حساسیت این روش نه تنها با روش های الایزا برابری می کند حتی در بعضی موارد نیز بیشتر است. ضمناًدر مواردی که تعداد زیادی نمونه باید آزمایش شوند ، از نظر زمانی و اقتصادی استفاده از روش P-CEIA نسبت به دیگر روشها ارجحیت دارد .

نتیجه گیری :

روش P-CEIA به دلیل صرفه جویی در هزینه و وقت و همچنین ساده تر بودن نسبت به روشهای دیگر از قبیل Ab-EIA و کشت ارجحیت دارد . بنابراین پیشنهاد می گردد که این روش، در مورد سایر فرآورده های غذایی و حتی شناسایی و تشخیص باکتری های گرم منفی دیگر نیز مور بررسی قرار گیرد.

فهرست مراجع :

1- Carrique-Mas JJ, Davies RH. Bacteriological detection of Salmonella enteritidis in eggs: a review. Rev Sci Tech 2008; 27(3):657-64.

2- Little CL, Rhoades JR, Hucklesby L, Greenwood M, Surman-Lee S, Bolton FJ, et al. Survey of Salmonella contamination of raw shell eggs used in food service premises in the United Kingdom, 2005

through 2006. J Food Prot 2008; 71(1):19-26.

3- Braden CR. Salmonella enterica serotype Enteritidis and eggs: a national epidemic in the United States. Clin Infect Dis 2006; 43(4):512-7.

4- Schroeder CM, Latimer HK, Schlosser WD, Golden NJ, Marks HM, Coleman ME, et al. Overview and summary of the Food Safety and Inspection Service risk assessment for Salmonella enteritidis in shell eggs, October 2005. Foodborne Pathog Dis 2006; 3(4):403-12.

5- Bauwens L, Vercammen F, Bertrand S, Collard JM, De Ceuster S. Isolation of Salmonella from environmental samples collected in the reptile department of Antwerp Zoo using different selective methods. J Appl Microbiol. 2006;101(2):284-9.

6- Matsumoto K, Sakata M, Iwahashi N, Kunitake M, Miyazaki M, Hirayama C. Poly(ethyleneimine)-immobilized-cloth enzyme immunoassay for the detection of Salmonella lipopolysaccharide. Immunol Invest 2003;32(1-2):3-15.

7- Pangloli P, Dje Y, Oliver SP, Mathew A, Golden DA, Taylor WJ, et al. Evaluation of methods for recovery of Salmonella from dairy cattle, poultry, and swine farms. J Food Prot. 2003;66(11):1987-95.

8- Blais BW, Pui Lan Chanb, Phillippea LM, Brooksc BW, Hayashib S and Yamazakib H. Assay of salmonella in enrichment cultures of foods, feeds and environmental samples by polymyxin-cloth enzyme immunoassay. Int J Food Microbiol 1997; 37(2-3): 183-188.

9- Wang H, Blais BW, Brooksc BW and Yamazakib H.Salmonella detection by polymyxin-cloth enzyme immunoassay using polyclonal and monoclonal detector antibodies. Int J Food Microbiol 1996; 29(1): 31-40.

10- Wang H, Blais BW and Yamazakib H.Rapid and economical detection of Salmonella entritidis in eggs by the polymyxin-cloth enzyme immunoassay. Int J Food Microbiol 1995; 24(3): 397- 406.

11- Haiyan W, Burton W. Blais BW, Hiroshi Y. A P-CEIA System for Salmonella O serogroup identefication. Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology 1994;3(2), 105–113.

12- Blais BW, Ong HY, Yamazaki H. Use of inexpensive O antisera as the detecting antibodies for Salmonella antigens in the polymyxin-cloth enzyme immunoassay. Int J Food Microbiol. 1993 26; 20(3):149-58.

13- Burton W, Blais BW, Yamazaki H; Application of polymyxin – coated polyester cloth to the semi-quantitation of salmonella in processed foods. Int J Food Microbiol 1991; 14(1): 43-49.

14- Blais BW, Yamazaki H; Use of polymyxin – coated polyester cloth in the enzyme immunoassay of salmonella lipopolysaccharide antigens. Int J Food Microbiol 1990; 11(3-4): 195-204.

15- Blais BW, Yamazaki H; Use of detergents in the preparation of salmonella samples for enzyme immunoassay on polymyxin – coated polyester cloth. Int J Food Microbiol 1990; 11(3-4): 329-36.