مقایسه کارآیی اتیدیوم مونوآزید (EMA) و پروپیدیوم مونوآزید (PMA)در شمارش سلول های زنده پاتوژن به روش PCR زمان واقعی در سیستم های مدل غذایی

مریم عزیزخانی[1*]، فهیمه توریان [1]

۱- اسنادیار، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تخصصی فناوری های نوین آمل، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۷/۰۳/۱۴ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۰/۱۹)

چکیده

تکنیک PCR علاوه بر DNA سلول های زنده، سلول های مرده را نیز شمارش می کند و این امر قضاوت در مورد کیفیت میکربی نمونه های غذایی را دچار مشکل می نماید. هدف این مطالعه مقایسه تکنیک های اتیدیوم مونوآزید-qPCR و پروپیدیوم مونوآزید-qPCR در شمارش سلول های پاتوژن (*اشرشیاکلی، استافیلوکوکوس ارئوس، انتروکوکوس فیکالیس و لیستریامونوسیتوجنس*) در نمونه های شیر کم چرب و پرچرب، پنیر لاکتیکی (کم چرب) و پنیر پروسس (پرچرب) بود. نسبت‌های مختلف از پاتوژن های زنده و کشته شده توسط حرارت به نمونه های غذایی تلقیح گردید. پس از جداسازی پلت باکتریایی و تیمار باEMA و PMA، PCR کمی انجام شد. آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون توکی جهت تحلیل داده ها بکار رفت. در نمونه شیر کم چرب، طی تیمار با EMA، کاهش ۱۸، ۲۰، ۲۳ و ۳۰ درصدی در شمارش *اشرشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس، انتروکوکوس فکالیس و لیستریامونوسیتوجنس* در مقایسه با کشت معمولی مشاهده شد. همچنین در تیمار با PMA در همین نمونه کاهش ۶، ۳، ۸ و ۱۲ درصدی در شمارش *اشرشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس، انتروکوکوس فکالیس و لیستریامونوسیتوجنس* به دست آمد. در نمونه های غذایی پرچرب مانند پنیر پروسس در تیمار با EMA، کاهش ۲۰، ۲۷، ۳۰ و ۲۵ درصدی و در تیمار با PMA کاهش ۹، ۶، ۱۰ و ۵ درصدی در تعداد، به ترتیب، *اشرشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس، انتروکوکوس فکالیس و لیستریامونوسیتوجنس* مشاهده گردید. درجه بازداری EMA و PMA از تولید سیگنال در باکتری های مختلف متفاوت بود و درصد چربی نمونه ها تاثیر معناداری ($p>0/05$) بر کارآرایی EMA و PMA نداشت.

کلید واژگان: اتیدیوم مونوآزید، پاتوژن، پروپیدیوم مونوآزید، پی سی آر، سیستم های مدل غذایی

*مسئول مکاتبات: m.azizkhani@ausmt.ac.ir

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-16]

۱- مقدمه

تا قبل از دو دهه گذشته، شمارش و تشخیص میکروارگانیسم ها صرفا بر اساس کشت در محیط های مختلف کشت و با صرف زمان طولانی جهت رشد میکروارگانیسم انجام می شد. با ابداع تکنیک واکنش زنجیره ای پلیمراز(PCR) ، که امکان تکثیر و تعیین کمیت حتی مقادیر اندک DNA و در نتیجه شمارش تعداد جزئی میکروارگانیسم ها را فراهم می سازد، روش های مولکولی به عنوان تکنیک های سریع، قابل اعتماد و مستقل از کشت میکربی وارد حوزه میکروبیولوژی شدند[۱]. یکی از نواقص تکنیک نوین PCR فقدان قابلیت تمایز بین سلول های زنده و مرده به علت باقیماندن DNA در محیط پس از مرگ سلول است. اتیدیوم مونوآزید (EMA) و پروپیدیوم مونوآزید (PMA)در انجام PCR جهت برطرف نمودن این مشکل به کار فته اند و به نظر می رسد با به کار گیری این ترکیبات، تکنیک PCRقادر به ایجاد تمایز بین سلول های زنده و آسیب دیده می باشد [۲]. به نظر می رسد رنگ های آلی EMA وPMA قادر به نفوذ به غشای سیتوپلاسمی سلول های زنده نمی باشند [۳]، لذا تنها با DNA محافظت نشده واکنش داده و یا صرفا وارد سلول هایی با غشای آسیب دیده شده و در برابر تابش نور با برقراری پیوند کووالانت به DNA ژنومیک متصل می شوند، بخش آزید نیز به رادیکال نیترن تبدیل می شود [٤]. DNA متصل شده به رنگ، فاقد توانایی تکثیر در چرخه های PCR است، بنابراین سلول های مرده جستجو و شمارش نمی شوند [۳]. نتایج مطالعات Wagner و همکاران (۲۰۱۵) نشان داد که تیمار سلول های باکتریایی و قارچی با EMA و PMA قبل از مرحله استخراجDNA ، با هدف حذف انتخابی DNA سلول های زنده از سلول های فاقد تمامیت دیواره سلولی موجب کاهش عمده در تعداد DNA استخراج شده می گردد [۱]. مطالعه دیگری نیز در خصوص استفاده از EMA و PMA جهت تمایز ذرات ویروسی عفونت زا (فعال) و غیرعفونت زا (غیر فعال) پس از تیمار با حرارت، اشعه ماوراء بنفش و کلرین انجام شده است. نتایج نشان داد که تیمار با EMAو PMA روشی ساده و ارزان قیمت جهت بررسی تاثیر کلرین بر ویروس ها می باشد [۵]. همچنین کیفیت غیرفعال سازی حرارتی نوروویروس انسانی در ماده غذایی با به کارگیری PCR کمی در ترکیب با EMA و PMA مورد ارزیابی قرار گرفته است. مطابق نتایج مطالعه، در همه تیمارهای حرارتی، تیتر نوروویروس پس از تیمار با PMA نسبت به تیمار با EMA کاهش بیشتری داشته است [٦].

با وجود اینکه روش EMA/PMA-PCR در چندین مطالعه به کار رفته اند و تکنیک در سطح آزمایشگاهی شناخته شده است اما هنوز در بخش های نظارتی با هدف کنترل، و پایش وضعیت میکربی نمونه های غذایی عرضه شده در بازار مصرف به کار نرفته است. به نظر می رسد علت این امر، نامعلوم بودن تاثیر متغیرهای مختلف مانند ترکیب و ماهیت ماده غذایی بر کارآیی تکنیکEMA/PMA-PCR باشد، لذا مطالعات گسترده تری در راستای ارزیابی کفایت روش فوق در انواع مواد غذایی نیاز است. هدف از انجام این مطالعه مقایسه تکنیک های- EMA PCRو PMA-PCR در شمارش سلول های پاتوژن (*اشرشیاکلی* O157:H7، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *انتروکوکوس فکالیس* و *لیستریامونوسیتوجنس*) در نمونه های شیر کم چرب و پرچرب، پنیر لاکتیکی (کم چرب) و پنیر پروسس (پرچرب) بود.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- جمع آوری نمونه

نمونه های شیر کم چرب و پرچرب، پنیر لاکتیکی (کم چرب) و پنیر پروسس (پرچرب) به صورت تصادفی از فروشگاه های شهر آمل تهیه شد. نمونه ها در کنار کیسه یخ به آزمایشگاه منتقل و تا زمان انجام آزمایشات در یخچال در دمای ۱±٤ درجه سانتیگراد (کمتر از ۲٤ ساعت) نگهداری شدند.

۲-۲- سویه های باکتریایی

اشرشیاکلی O157:H7 (ATCC 35218) ، *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC 29213)، *انتروکوکوس فکالیس* (ATCC 9854) و *لیستریا مونوسیتوژنز* (PTCC 1163) از مجموعه کشتهای میکربی انستیتو پاستور (تهران، ایران) تهیه و در این مطالعه به کار رفت. باکتری ها در محیط تریپتیک سوی براث در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۱۸ ساعت کشت و به روش کشت

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-16]

در محیط تریپتیک از سوی آگار در شرایط گرمخانه گذاری مشابه شمارش شدند.

۲-۳- مواد شیمیایی

کلیه مواد شیمیایی (EMA، PMA، پپتون، قرص رینگر) و محیط های کشت ائوزین متیلن بلو، برد پارکر آ گار، بایل اسکولین آ گار و پالکام آ گار از شرکت مرک (دارمستاد، آلمان) تهیه شد.

۲-٤- تلقیح باکتریایی ماده غذایی به طور مصنوعی

ابتدا بار میکربی اولیه نمونه ها بررسی گردید. سپس، جهت تعیین حساسیت واکنش پی سی آر کمی باEMA و PMA، نسبت‌های مختلف از سلول‌های زنده و کشته شده توسط حرارت به طور مصنوعی (۷۰ درجه سانتیگراد) به نمونه ها تلقیح شد. تلقیح باکتریایی نمونه‌ها به صورت زیر انجام گرفت: به ۲۵ گرم از نمونه ها به صورت اسپتیک ۲۲۵ میلی لیتر محلول آب پپتونه بافری شده در یک کیسه پلاستیکی استریل دارای فیلتر جانبی افزوده و با استفاده از دستگاه پالسیفایر یکنواخت شد (میکروژن بیوپروداکتس، سوری، انگلستان). مخلوط حاصل از قسمت فیلترشده برداشته و در قسمت های ۳۰ میلی لیتری تقسیم شد. هر قسمت با مخلوطی از سلول‌های زنده و کشته شده به صورت زیر تلقیح شد: ۱۰۰ درصد سلول‌های زنده، ۷۵ درصد سلول‌های زنده و ۲۵ درصد سلول‌های مرده، ۵۰ درصد سلول‌های زنده و ۵۰ درصد سلول‌های مرده، ۲۵ درصد سلول‌های زنده و ۷۵درصد سلول‌های مرده و ۱۰۰ درصد سلول‌های مرده. یک کنترل منفی تلقیح نشده در هر آزمایش در نظر گرفته شد [۷].

۲-۵- شمارش باکتری نمونه ها در محیط کشت

نسبت ۱ به ۱۰ از نمونه ها در محلول رینگر استریل تهیه شد، از رقت های مختلف آن بر روی محیط های کشت اختصاصی (ائوزین متیلن بلو برای *اشرشیاکلی*، برد پارکر آگار برای *استافیلوکوکوس اورئوس*، بایل اسکولین آگار برای *انتروکوکوس فکالیس* و پالکام آگار برای *لیستریا مونوسیتوژنز*) کشت و در نهایت شمارش گردید.

۲-٦- تیمار با اتیدیوم مونوآزید و پروپیدیوم مونوآزید

جهت بررسی تاثیر تیمار اتیدیوم مونوآزید و پروپیدیوم مونو آزید در حذف انتخابی سیگنال های حاصل از DNA سلول های صدمه دیده و مرده در PCR کمی، ابتدا سوسپانسیون نمونه ها با نسبت ۱ به ۱۰ در محلول رینگر در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه در ٤ درجه سانتیگراد سانتریفوژ و پلت باکتریایی جداسازی گردید. سپس، EMA و PMA در دی متیل سولفوکساید ٪۲۰ جهت به دست آوردن محلول استوک ۱۰۰ 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 ۱۰۰ میکرومول افزوده شد. پس از افزودن EMA و PMA، نمونه ها به مدت ۵ ثانیه ورتکس شده، به مدت ۱۰ دقیقه در تاریکی در دمای اتاق قرار گرفته و برای افزایش نفوذ EMA و PMA به داخل سلول تکان داده شدند. سپس، جهت فعال سازی EMA و PMA و اتصال آنها به DNA، نمونه ها به مدت ۳۰ دقیقه با استفاده از سیستم فعال سازی نوری در معرض نور هالوژن قرار گرفتند (نمونه ها هر ۵ دقیقه به آرامی تکان داده شدند). پس از ایجاد اتصالات عرضی از طریق القای نوری، سلول ها در ۷۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه در ٤ درجه سانتیگراد سانتریفوژ شده و محلول رویی دور ریخته شد. پلت به دست آمده برای جداسازی DNA مورد استفاده قرار گرفت [۷].

۲-۷- استخراج DNA

محلول استخراج Tripure (روشه، ایالات متحده) جهت استخراج DNA به کار رفت و کلیه مراحل مطابق دستورالعمل شرکت تولید کننده انجام شد.

۲-۸- انجام PCR کمی

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 روند افزایشی ۱ درجه سانتیگراد در دقیقه اعمال شد. واکنش Real Time PCR جهت جستجوی پاتوژن های باکتریایی با استفاده

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-16]

از پرایمرهای جدول ۱ و محلول SYBR Green Power (ایالات متحده،Applied Biosystems) انجام شد، مستر میکس تهیه شده شامل پرایمرهای forward وreverse 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، ٤٠ چرخه در ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ ثانیه و ٦٠ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه.

Table 1 Primers used in qPCR

Primer	Sequence (5'→3')	Reference
Listeria monocytogenes		
hlyA-F	5′-GTCTGCAAAGCAATCCGCTGCAAATAAA-3′	[9]
hlyA –R	5′-CTGTGTCCACGAGTTGGTTGATTA G-3′	
Escherichia coli		
she-F	5′-GAGGCGAATGATTATGACTG-3′	[9]
she –R	5′-ACTTCAGGTACCTCAAAGAG-3′	
Staphylococcus aureus		
sec-F	5′-TTTTTGGCACATGATTTAATTT-3′	[10]
sec –R	5′-CAACCGTTTTATTGTCGTTG-3′	
Enterococcus faecalis		
gel-F	5′- GAAACTAGTTAAGGAAGGAGTTAATTGTTTGATGAAG- 3′	[11]
gel –R	5′ -CTTCTGCAGTTTCATTCATTGACCAGAACAGATTC- 3′	

۲-۹- تجزیه و تحلیل آماری

از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و مقایسه چندتایی توکی جهت تعیین وجود اختلاف آماری میان نتایج تعیین کمیت ژن های هدف در نمونه های تیمار شده و شاهد استفاده شد. داده ها با استفاده از نرم افزار SPSSنسخه ۲۲، مورد آنالیز قرار گرفت. جهت اطمینان از تکرارپذیری نتایج، تیمار نمونه ها در سه تکرار انجام شد.

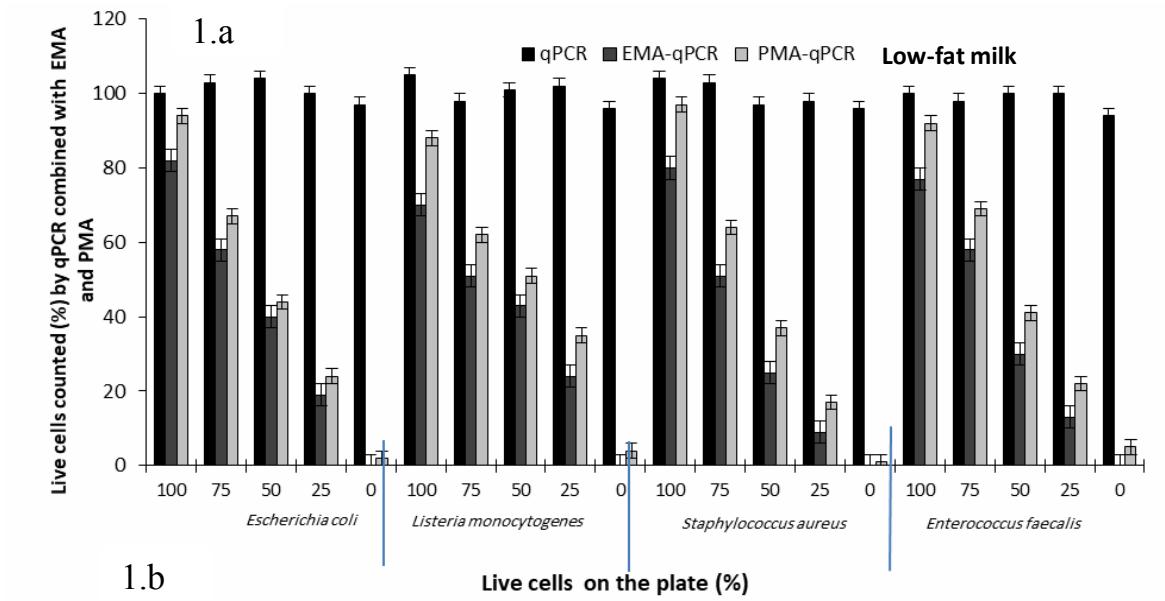
۳- یافته ها

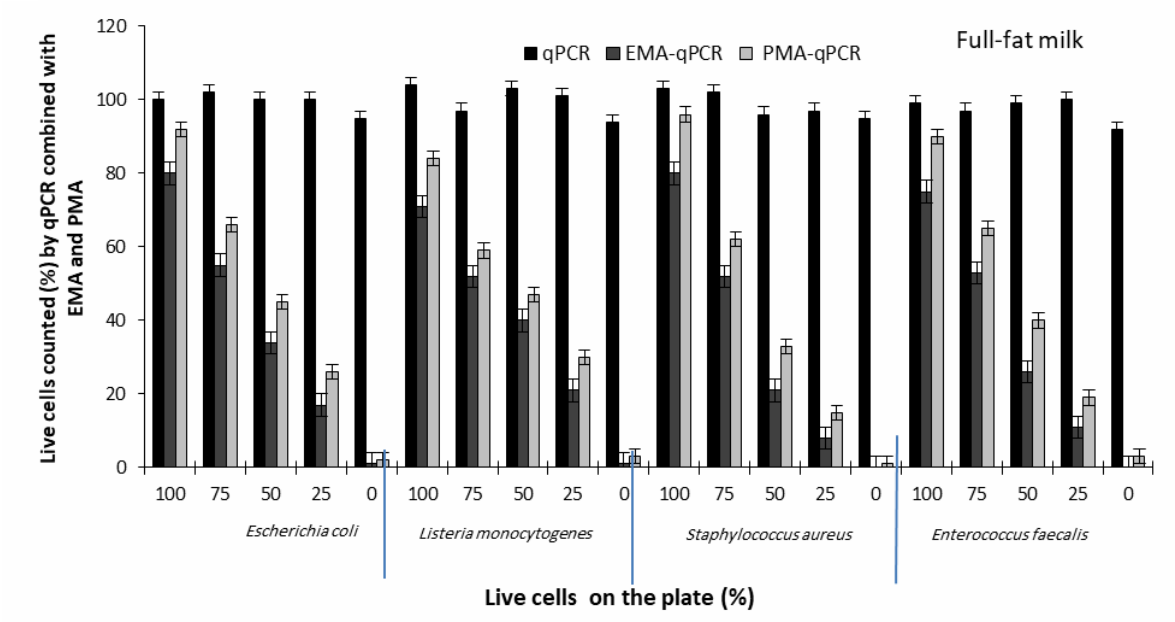
نتایج تیمار نمونه ها با EMA و PMA قبل از انجام PCR در تمایز سلول های زنده از مرده با نتایج qPCR و شمارش در محیط کشت مقایسه شد (شکل ۱). یافته ها نشان داد که تیمار سلول های باکتریایی با EMA و PMA قبل از استخراج DNAو سپس انجام qPCR موجب بازداری از ارسال سیگنال از DNA سلول های آسیب دیده می گردد. در نمونه شیر کم چرب، با تیمار EMA قبل از استخراجDNA ، کاهش ۱۸، ۲۰، ۲۳ و ۳۰ درصدی در شمارش، به ترتیب، *اشرشیاکلی* O157:H7، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *انتروکوکوس فکالیس* و *لیستریامونوسیتوجنس* در مقایسه با کشت معمولی مشاهده شد(p<۰/۰۵). در تیمار با PMA در همین نمونه کاهش ٦، ۳، ۸ و ۱۲ درصدی در نتایج شمارش، به ترتیب، (*اشرشیاکلی*O157:H7، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *انتروکوکوس فکالیس* و *لیستریامونوسیتوجنس* در مقایسه با کشت معمولی به دست آمد(p<۰/۰۵). در نمونه های غذایی پرچرب مانند پنیر پروسس در تیمار باEMA ، کاهش ۲۰، ۲۷، ۳۰ و ۲۵ درصدی و در تیمار با PMA کاهش ۹، ٦، ۱۰ و ۵ درصدی در بررسی تعداد، به ترتیب، اشرشیاکلیO157:H7 ، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *انتروکوکوس فکالیس* و *لیستریامونوسیتوجنس* در مقایسه با کشت معمولی مشاهده گردید(p<۰/۰۵).

همانطور که از نتایج برمی آید، درجه بازداری ترکیبات فوق از تولید سیگنال در باکتری های مختلف متفاوت بوده و به نظر می

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-16]

رسد درصد چربی در نمونه ها تاثیر معناداری بر میزان عملکرد با EMA وPMA نداشته است(p>۰/۰۵). آنالیز آماری نتایج حاصله، اختلاف معناداری را بین داده های qPCR و داده های EMA-qPCRو PMA-qPCR نشان داد (p<۰/۰۵)، همچنین، نتایج EMA-qPCR و PMA-qPCR نیز با یکدیگر اختلاف معنادار داشته (p<۰/۰۵) و در تکنیک EMA-qPCRتعداد کمتری سلول شمارش گردید.





[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-16]

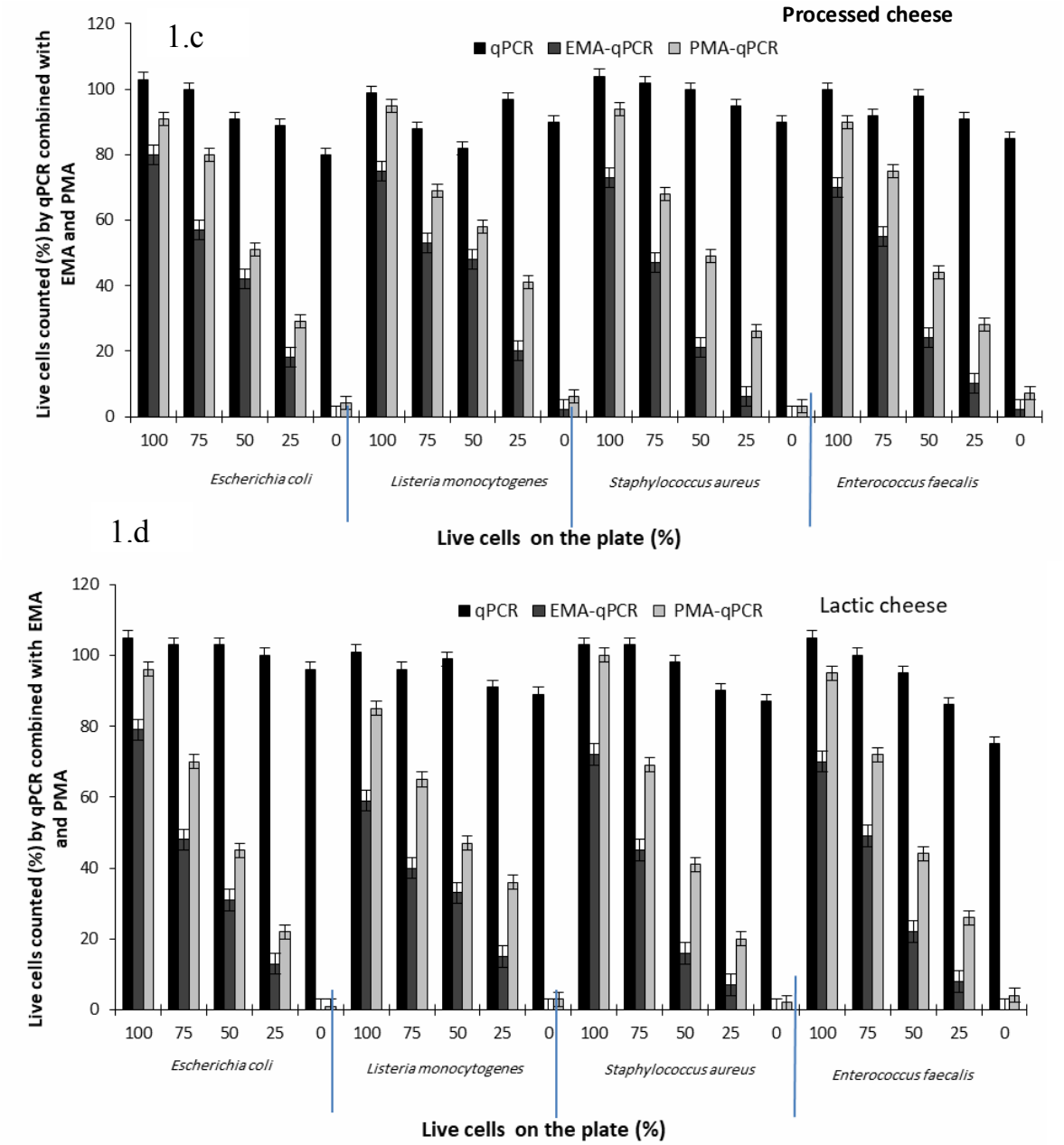


Fig 1 Bacterial counts (Mean ± SD) in milk and cheese samples obtained form qPCR, EMA-qPCR and PMA-qPCR.

٤- بحث

در این مطالعه تکنیک های EMA -PCR و PMA-PCR در شمارش سلول های پاتوژن واجد دیواره سلولی (*اشرشیاکلی* O157:H7، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *لیستریامونوسیتوجنس*) در نمونه های شیر و پنیر پروسس مورد بررسی قرار گرفت، طبق نتایج مطالعات پیشین این روش ها در مورد نمونه های بالینی با موفقیت به کار رفته اند [١٤-١٢].

مطابق نتایج حاصله، qPCR نتایج مثبت کاذبی را در خصوص سلول هایی که تحت تخریب کامل حرارتی قرار گرفته بودند ارائه داده است، لیکن در نمونه های تیمار شده با دو رنگ آلی در نمونه شیر کم چرب، تیمار EMA قبل از استخراج DNA ، باعث کاهش ١٨، ٢٠، ٢٣ و ٣٠ درصدی در شمارش *اشرشیاکلی*

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-16]

O157:H7، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *انتروکوکوس فکالیس* و *لیستریامونوسیتوجنس* در مقایسه با کشت معمولی گردیده و تیمار با PMA در همین نمونه کاهش ٦، ۳، ۸ و ۱۲ درصدی در نتایج شمارش پاتوژن های فوق را حاصل نموده است. در نمونه های غذایی پرچرب مانند پنیر پروسس در تیمار باEMA ، کاهش ۲۰، ۲۷، ۳۰ و ۲۵ درصدی و در تیمار با PMA کاهش ۹، ٦، ۱۰ و ۵ درصدی در بررسی تعداد، به ترتیب، *اشرشیاکلی*O157:H7 ، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *انتروکوکوس فکالیس* و *لیستریامونوسیتوجنس* در مقایسه با کشت معمولی به دست آمد. در پژوهش های دیگر نیز کاهش میزان DNA استخراج شده یا کاهش سیگنال دریافتی طی واکنش PCR پس از تیمار با EMA و PMA گزارش شده است. در همین راستا، در پژوهش Wagnerو همکاران (۲۰۱۵) افزایش سریعی در میزان فلورسنس طی qPCR و PMA-qPCR مشاهده شد و در EMA-qPCRافزایش جزیی و کندی برای همه میکروارگانیسم های مورد مطالعه گزارش گردید[۱] که نشان دهنده کارآیی بیشتر PMA نسبت به EMA در تفکیک سلول های زنده از مرده می باشد. در مطالعه حاضر، تفاوت معناداری میان نتایج حاصل از qPCRوPMA-qPCR ، qPCRو EMA-qPCR و نیز EMA-qPCRو PMA-qPCR مشاهده شد. تفاوت در درجه بازداری EMA و PMA از ارسال سیگنال توسط سلول های باکتریایی می تواند به ساختار ثانویه ژنومی سلول های مورد مطالعه مربوط باشد. علاوه براین، کارآیی تیمار با رنگ قبل از qPCRبه اندازه قطعه تکثیر شده بستگی دارد زیرا تنها قطعات بزرگ سلول های کشته شده و آسیب دیده تحت تاثیر عوامل بازدارنده در PCR قرار می گیرند [۱٦-۱۵].

کاهش سیگنال دریافتی از DNA نمونه های تیمار شده با EMAو PMA در مقایسه با کشت معمولی، قابلیت این ترکیبات را در حذف انتخابی DNA سلول های غیرزنده تائید می نماید. در گزارش Nocker و همکاران (۲۰۰٦)، به تفاوت در تاثیر EMA وPMA ، به طور مثال تفاوت در میزان نفوذ به DNAسلول های سالم و آسیب دیده اشاره شده است. نتایج این مطالعه ثابت نمود که PMA برای گستره وسیعی از گونه های باکتریایی قابل کاربرد بوده و دارای مزیت هایی نسبت به EMA می باشد چرا که EMA قادر به نفوذ به برخی سلول های زنده باکتریایی می باشد. با وجود اینکه پمپ های انتقال به طور پیوسته EMA را از سلول های دارای متابولیسم فعال به خارج می رانند، اما حتی مقدار اندک EMA باقیمانده می تواند منجر به از دست رفتن مقدار قابل توجهی DNA گردد[۳]، لذا به نظر می رسد پایین تر بودن نتایج شمارش با EMA-qPCR در مطالعه حاضر مربوط به از دست دادن بخشی از DNA باکتری های سالم در اثر واکنش با EMA باشد.

حذف DNA آزاد خارج سلولی با استفاده از EMA وPMA ، توسط Wagner و همکاران (۲۰۰۸) مورد بررسی قرار گرفت. علیرغم کاهش قابل ملاحظه در میزان DNA باکتریایی استخراج شده پس از تیمار با EMA وPMA ، این تکنیک ها موجب حذف کامل DNA همه سلول های آسیب دیده و مرده در مورد برخی از باکتری ها در محیط های خاص نشد و در مواردی نتایج مثبت کاذب به دست آمد. این محققان اظهارداشتند که این نتایج مثبت کاذب می تواند مربوط به بالا بون دانسیته سلولی اولیه باشد [۸].

تاثیر تیمار با EMA و PMA بر بازده کلی استخراج DNA در باکتری ها، قارچ ها و جلبک های خاک توسط Wagner و همکاران (۲۰۱۵) مورد بررسی قرار گرفت [۱]. نتایج نشان داد که تیمار با EMA و PMA با هدف حذف انتخابی DNA سلول های فاقد تمامیت دیواره سلولی موجب کاهش میزان DNAاستخراج شده می گردد. در مطالعه ای، تاثیر PMA-PCR بر جستجوی سریع و اختصاصی باکتری های انتروباکتریاسه در شیر پاستوریزه مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان دهنده شمارش موفقیت آمیز سلول های زنده انتروباکتریاسه در شیر پاستوریزه (در مقایسه با PCR بدون به کارگیری PMA) بود، همچنین این روش بدون نیاز به خالص سازی DNA انجام گردید [17]. نتایج مطالعه Chen و همکاران (۲۰۱۸) در ارزیابی روش سریع جستجوی سلول های زنده *استافیلوکوکوس ارئوس* در شیر بیانگر کارآیی ۹۸/٤٤ درصدی تکنیک PMA-qPCR در این رابطه در مقایسه با PMA معمولی بوده است [18].

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-16]

۵-نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که تیمار با EMA و PMA علاوه بر سریع تر و دقیق تر بودن نسبت به روش کشت معمولی، حساسیت qPCR را در تمایز سلول های زنده از مرده و آسیب دیده و نیز جستجو و شمارش سلول های زنده پاتوژن در نمونه های مواد غذایی افزایش می دهد. این دو ترکیب به راحتی و صرفا با استفاده از یک منبع نوری به DNA های فاقد پوشش اتصال یافته و آنها را در واکنش PCR غیرفعال می سازند. همچنین ماهیت ماده غذایی از جمله میزان چربی آن تاثیری بر عملکرد EMA و PMA ندارد. در این مطالعه کارآیی EMA نسبت به PMA در بازداری از تولید سیگنال توسط DNA سلول های آسیب دیده بیشتر بوده است. لیکن با توجه به اینکه در برخی مطالعات به عدم کارآیی این دو ترکیب در رابطه با برخی میکروارگانیسم ها اشاره شده، انجام مطالعات گسترده تر در رابطه با پاتوژن های غذایی مختلف به طور اختصاصی جهت ارزیابی کارآیی تکنیک پیشنهاد می گردد.

٦- سپاسگزاری

این طرح تحقیقاتی با استفاده از اعتبارات ویژه پژوهشی (گرنت شماره ۸/٤۳۷/پ) دانشگاه تخصصی فناوری های نوین آمل انجام گردیده است.

۷- منابع

[1] Wagner, A.O., Praeg, N., Reitschuler, C., Illmer, P. 2015. Effect of DNA extraction procedure, repeated extraction and ethidium monoazide (EMA)/propidium monoazide (PMA) treatment on overall DNA yield and impact on microbial fingerprints for bacteria, fungi and archaea in a reference soil. Applied Soil Ecology, 93, 56–64.

[2] Nocker, A., Camper, A.K. 2006. Selective removal of DNA from dead cells of mixed bacterial communities by use of ethidium monoacide. Applied Environmental Microbiology, 72, 1997–2004.

[3] Nocker, A., Cheung, C.Y., Camper, A.K. 2006. Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. Journal of Microbiological Methods, 67, 310–320.

[4] Trevors, J. 2012. Can dead bacterial cells be defined and are genes expressed after cell death? Journal of Microbiological Methods, 90, 25–28.

[5] Leifels, M., Jurzik, L., Wilhelm, M., Hamza, I.A. 2015. Use of ethidium monoazide and propidium monoazide to determine viral infectivity upon inactivation by heat, UV-exposure and chlorine. International Journal of Hygiene and Environmental Health, 218 (8), 686–693.

[6] Jeong, M.I., Park, S.Y., Ha, S.D. 2017. Thermal inactivation of human norovirus on spinach using propidium or ethidium monoazide combined with real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. Food Control, 78, 79-84.

[7] Elizaquivel, P., Sanchez, G., Selma, M.V., Aznar, R. 2012. Application of propidum monoazide-qPCR to evaluate the ultrasonic inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-cut vegetable wash water. Food Microbiology, 30, 316-320.

[8] Wagner, A.O., Malin, C., Knapp, B.A., Illmer, P. 2008. Removal of Free Extracellular DNA from Environmental Samples by Ethidium Monoazide and Propidium Monoazide. Applied Environmantal Microbiology, 2537–2539.

[9] Kerényi, M., Allison, H. E., Bátai, I., Sonnevend, Á., Emödy, L., Plaveczky, N., et al. 2005. Occurrence of hlyA and sheA genes in extraintestinal *Escherichia coli* strains. Journal of Cliniacal Microbiology, 43(6), 2965-2968.

[10] Fischer, A., Francois, P., Holtfreter, S., Broker, B., et al. 2009. Development and evaluation of a rapid strategy to determine enterotoxin gene content in Staphylococcus aureus. Journal of Microbiological Methods, 77, 184-190.

[11] Waters, C.M., Antiporta, M.H., Murray, B.E., Dunny, G.M. 2003. Role of the Enterococcus faecalis GelE Protease in Determination of Cellular Chain Length, Supernatant Pheromone Levels, and Degradation of Fibrin and Misfolded Surface

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-16]

Proteins. Journal of Bacteriology, 185(12), 3613–3623.

[12] van Frankenhuyzen, J.K., Trevors, J.T., Flemming, C.A., Lee, H., Habash, M.B. 2013. Optimization validation, and application of a real-time PCR protocol for quantification of viable bacterial cells in municipal sewage sludge and biosolids using reporter genes and Escherichia coli. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 40, 1251–1261.

[13] Shi, H., Xu, W., Luo, Y., Chen, L., Liang, Z., Zhou, X., Huang, K. 2011. The effect of various environmental factors on the ethidium monazite and quantitative PCR method to detect viable bacteria. Journal of Applied Microbiology, 111 (5), 1194–1204.

[14] Elizaquivel, P., Aznar, R., Sanchez, G. 2014. Recent developments in the use of viability dyes and quantitative PCR in the food microbiology field. Journal of Applied Microbiology, 116 (1), 1–13.

[15] Soejima, T., Schlitt-Dittrich, F., Yoshida, S. 2011. Polymerase chain reaction amplification length-dependent ethidium monoazide suppression power for heat-killed cells of Enterobacteriaceae. Analytical Biochemistry, 418, 37–43.

[16] Martin, B., Raurich, S., Garriga, M., Aymerich, T. 2013. Effect of amplicon length in propidium monoazide quantitative PCR for the enumeration of viable cells of salmonella in cooked ham. Food Analytical Methods, 6, 683–690.

[17] Soejima, T., Minami, J., Iwatsuki, K. 2012. Rapid propidium monoazide PCR assay for the exclusive detection of viable Enterobacteriaceae cells in pasteurized milk. Journal of Dairy Science, 95(7), 3634-3642.

[18] Chen, Z., Dexin, Z., Nan, L., Jianjun, D., Feng, X.,Yuan, J., Baoguang, L. 2018. An improved assay for rapid detection of viable Staphylococcus aureus cells by incorporating surfactant and PMA treatments in qPCR. BMC Microbiology, 18: 132.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-16]

Comparing Efficacy of Ethidium Monoazide (EMA) and Propidium Monoazide (PMA) qPCR in Live Pathogen Quantifying by Real-Time PCR in Food Model Systems

Azizkhani, M. [1*], Tooryan, F. [1]

1. Assistant Professor, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran

(Received: 2018/06/03 Accepted:2019/01/09)

PCR quantifies dead cells beside live cells and this makes the judgment of microbial quality of food samples complicated. The objective of this study was comparing the efficacy of ethidium monoazide-qPCR and propidium monoazide-qPCR in quantifying live pathogen cells (*E.coli, Staphylococcus aureus, Enterococcus fecalis* and *Listeria monocyogenes*) by real time PCR, in low-fat and high-fat milk, lactic cheese (low-fat) and processed cheese (high-fat). Different proportions of live and heat killed pathogen cells were inoculated into food samples. After separating bacterial pellets, EMA and PMA treatments qPCR was conducted. One-way ANOVA followed by Turkey's Multiple Comparison tests were applied to analyze the data. In low-fat milk, EMA treatment resulted in 18, 20, 23 and 30% decrease in cell count of *E.coli, S.aureus, E. fecalis* and *L. monocyogenes*, respectively, compared to conventional culturing. Also, following treatment by PMA, 6, 3, 8 and 12% decrease in cell count was obtained for *E.coli, S.aureus, E. fecalis* and *L. monocyogenes*, respectively, compared to conventional culturing. In high-fat samples as processed cheese, a reduction of 20, 27, 30 and 25% in EMA treatment and 9, 6, 5 and 10% in PMA treatment was observed in cell count of *E.coli, S.aureus, E. fecalis* and *L. monocyogenes* , respectively. The inhibitory potential of EMA and PMA against signal emission was variable in different bacterial species and the fat content of the samples exerted no significant effect ($p>0.05$) on PMA and EMA functionality.

Keywords: Ethidium monoazide, Food model system, Pathogen, PCR, Propidium monoazide

* Corresponding Author E-Mail Address: m.azizkhani@ausmt.ac.ir

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-16]