همایش ملی بهداشت و ایمنی غذا
شیراز - ۲۵ آبان ۱۳۹۱
National Congress On Food Hygiene and Safety
SHIRAZ - 16th NOV. 2012

certificate of attendance

گواهی می گردد

سرکار خانم فریبا قیامتی یزدی

در همایش ملی "بهداشت و ایمنی غذا" که تاریخ بیست و پنجم آبان ماه هزار و سیصد و نود و یک در شیراز برگزار گردید مقاله خود با عنوان:

کاربرد فیلوگرام ژنتیکی در ارزیابی تنوع باکتری های بیماریزا با تکیه بر نرم افزارهای Bioedit و CLC bio در فرآورده های لبنی محلی

را بصورت پوستر ارائه نمودند.

دبیر کل همایش
دکتر افشین افزای

مرکز تحقیقات و توسعه مواد غذایی وزارت کشاورزی کانادا - معاون دانشگاه مک گیل کانادا
و رئیس هیات داوران
دکتر ثریا آذرنیا

نایب رئیس انجمن علمی بهداشت مواد غذایی ایران
و دبیر کمیته علمی همایش
دکتر حمیدرضا قیصری

WORLD FOOD SAFETY ORGANISATION
IRAN REPRESENTATIVE

دانشکده دامپزشکی

کاربرد فیلوگرام ژنتیکی در ارزیابی

تنوع باکتری های بیماریزا با تکیه بر نرم افزار های Bioedit و CLC bio در فرآورده های لبنی محلی

فریبا قیامتی یزدی[1*]، مرتضی خمیری[2]، مسعود یاور منش[3]، یحیی مقصود لو[2]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
۲- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی ، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
۳- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی ، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

چکیده

امروزه مطالعات بیوانفورماتیکی، حوزه‌ی گسترده‌ای از تحقیقات بیولوژیکی را شامل می‌شوند. بیولوژی مولکولی و علم ژنتیک، مسائلی را در پیش دارند که دانش بیوانفورماتیک می تواند با به کار بردن این اطلاعات به حل آن‌ها بپردازد. ابزارها و روش‌های محاسباتی با استفاده از الگوریتم های مختلف، برای تجزیه و تحلیل این اطلاعات و به تصویر کشیدن یافته‌های بیولوژیکی به کار گرفته می شوند. یکی از مهمترین الگوریتم ها برای نشان دادن رابطه-ی خویشاوندی و تشابه ژنتیکی فلور میکروبی در محصولات غذایی مختلف، فیلوگرام ژنتیکی می‌باشد. بر این اساس ابتدا باکتری های بیماریزا (استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیا کلی و سالمونلا) از فرآورده های محلی به کمک روش های وابسته به کشت (برد پارکر آگار، ویولت رد بایل آگار و سالمونلا-شیگلا آگار) و آزمون های بیوشیمیایی (کاتالاز، کواگولاز، IMVIC و آنی سرم های پلی والان) مورد بررسی قرار می گیرد. پس از شناسایی اولیه باکتری های بیماریزا با استفاده از روش مولکولی (16SrRNA) نسبت به جداسازی و شناسایی دقیق ایزوله ها اقدام می شود. در انتها، پس از تعیین و اصلاح توالی ایزوله ها، با استفاده از نرم افزار های Bioedit و CLC bio فیلوگرام ژنتیکی باکتری های بیماریزا با کمک دو روش UPGMA و Neighbor Joining مورد ارزیابی قرار می گیرد.

کلید واژگان: فیلو گرام ژنتیکی، باکتری های بیماریزا، CLC bio، Bioedit، فرآورده های لبنی محلی

مقدمه

امروزه مطالعات بیوانفورماتیکی حوزه ی گستردهای از تحقیقات بیولوژی را دربردارند. بیولوژی مولکولی و علم ژنتیک مسائلی را در پیش دارند که دانش بیوانفورماتیک می تواند با بکار بردن این اطلاعات، به حل آنها بپردازد (۱). یکی از مهم ترین ابزار هایی که جهت تجزیه و تحلیل اطلاعات و به تصویر کشیدن یافته های بیولوژیکی از جمله تشابهات ژنتیکی میکروبی در محصولات غذایی به کار گرفته می شود، فیلوگرام ژنتیکی می باشد. از سوی دیگر بیماری های ناشی از غذاهای آلوده، به نگرانی مهمی در کشور های جهان بدل شده است. .هرساله حدود سی درصد از مردم در کشور های صنعتی از بیماری های ناشی از مصرف موادغذایی آلوده به میکروارگانیسم ها رنج می برند که در این میان فرآورده های بومی و سنتی به دلیل عدم برخورداری از فرآیند های ایمنی بخش نظیر پاستوریزاسیون، سهم عمده ای را به خود اختصاص می دهند(۳).

* مسئول مکاتبات: fariba_ghiamati@yahoo.com

در این تحقیق مروری، فرآیند ایزولاسیون میکروارگانیسم های پاتوژن از فرآورده های لبنی به منظور تهیه فیلوگرام ژنتیکی و تفسیر روابط خویشاوندی در بین آن ها مورد ارزیابی قرار می گیرد.

مواد و روش ها

محیط های کشت های(Baird Praker Agar (BPA),Modified Giolitti and Cantoni Broth(GCB و Brain-hearth Infusion Broth (BHIB) برای جداسازی و شناسایی استافیلوکوکوس اورئوس های کواگولاز مثبت[1]، محیط‌های کشت Violet Red Bile Agar (VRB) و Lactose Bile Brilliant Green Broth(LBG) برای جداسازی و شناسایی کلیفرم ها از جمله اشرشیا کلی و محیط کشت Salmonella-shigella Agar (SSA) برای جداسازی و شناسایی سالمونلا مورد استفاده قرار می گیرد (۵).

جهت شناسایی و تشخیص کلنی های سیاه استافیلوکوکی بر سطح محیط کشت برد پارکر از امولوسیون زرده تخم مرغ و تلوریت پتاسیم به میزان ۵٪ حجمی- حجمی استفاده شد. همچنین از آزمایش IMVIC به منظور شناسایی اشرشیا کلی استفاده شد.

تشخیص و جداسازی استافیلوکوکوس اورئوس

یک میلی لیتر از فرآورده ی لبنی مایع، یا یک گرم از سایر فرآورده ها را به ۱۰ میلی لیتر محیط کشت آبگوشت اصلاح شده ی جیولیتی و کانتونی اضافه می کنیم و یک سی سی محلول تلوریت پتاسیم ۱٪ که توسط فیلتر ۰/۲۲ استریل شده را به محیط استریل می افزاییم و به دقت محلول آگار یا پارافین را که به دمای ۴۴ تا ۴۷ درجه سلسیوس رسیده است، به گونه ای به محیط کشت اضافه می کنیم تا سطح محیط کشت تلقیح شده کاملا پوشانده شود. به عنوان روش جایگزین می توان از جار یا گرمخانه بی هوازی[2] نیز استفاده نمود (۵).

شیر تازه، ماست، پنیر محلی، کره و یا هر محصول محلی با توجه به ماهیت خود بایستی با رقیق کننده ی مناسب رقت سازی شود. بدین منظور برای شیر و ماست از سرم فیزیولوژی، برای پنیر از سیترات سدیم ۲٪ و برای کره می توان از سیترات سدیم و یا آب پپتونه به همراه توین[3] ۴۰ جهت امولسیفیه نمودن فاز روغنی و آبی استفاده نمود. لوله ها را به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری می کنیم. اگر محیط کشت تلقیح شده سیاه رنگ شد یا رسوب سیاه در آن ایجاد شد از آن توسط آنس بر سطح پلیت حاوی محیط کشت برد- پارکر که به میزان ۵٪ از امولوسیون زرده تخم مرغ- تلوریت پتاسیم به آن افزوده شده است، کشت خطی می دهیم (۵).

پس از پایان گرمخانه گذاری و ظاهر شدن پرگنه ها، کلنی های رشد کرده علامت گذاری سپس پرگنه ها از نظر مشخصات مورفولوژیکی و ویژگی های ظاهری (رنگ، قطر، محل قرار گرفتن (سطحی یا عمقی)، برآمدگی(صاف، محدب و مقعر) و شکل (کروی، بیضوی و چین خورده) مورد بررسی قرار می گیرند (۴).

کلنی های سیاه یا خاکستری براق و محدب (با قطر ۱ تا ۱/۵ میلی متر پس از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری و قطر ۱/۵ تا ۲/۵ میلی متر پس از مدت زمان ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری) با هاله شفاف که ممکن است به صورت جزئی کدر شده باشند، بعنوان استافیلوکوکس اورئوس انتخاب می شوند.

تست کوآگولاز

پس از تلقیح کلنی های سیاه رنگ به داخل لوله های حاوی محیط کشت BHIB و گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت واکنش سوسپانسیون یاد شده در مقابل پلاسمای خرگوش ارزیابی می شود. در صورت تشکیل لخته پس از ۶-۴ ساعت گرمخانه گذاری آزمایش کواگولاز مثبت در نظر گرفته می شود (۷).

تشخیص و جداسازی کلیفرم ها

کشت کلیفرم ها به صورت آمیخته[4] و با استفاده از محیط کشت VRB انجام می پذیرد.پس از گرمخانه گذاری به مدت ۲۴ ساعت در ۳۰ درجه سانتیگراد پرگنه های با هاله قرمز به محیط کشت LBG حاوی لوله دورهام منتقل می شود. تولید گاز، پس از گرمخانه گذاری وجود کلیفرم در نمونه را محرز می نماید (۷).

[1] -coagulase positive
[2] -Incubator under anaerobic
[3] -Tween 40
[4] -pour plate

آزمون IMVIC[1]

برای جداسازی و تشخیص کلیفرم ها(اشرشیا کلی از انتروباکتر) از آزمونIMVIC استفاده می شود. (۲)

جدول ۱: آزمون IMVIC جهت شناسایی کلیفرم ها

	ایندول (I)	متیل رد (MR)	ووگس پروسکوار (VP)	سیترات (C)
اشرشیا کلی	+	+	–	–
انتروباکتر آئروژنس	–	–	+	+

تشخیص و جداسازی سالمونلا

یکی از محیط های کشت مناسب برای جداسازی سالمونلا، شیگلا و اشرشیا کلی، محیطSSA می باشد این محیط شامل لاکتوز، نمک های صفراوی، فریک سیترات و قرمز خنثی می باشد. بر اساس شکل زیر اشرشیا کلی با تخمیر لاکتوز کلنی هایی به رنگ صورتی، سالمونلا با عدم تخمیر لاکتوز و تولیدگاز سولفید هیدروژن کلنی های سیاه وجنس شیگلا با عدم تولید سولفید هیدروژن و عدم تخمیر لاکتوز کلنی هایی بی رنگ در این محیط کشت ایجاد می کند (۵).

شکل ۱: a - کلنی های اشرشیا کلی. b- کلنی های جنس سالمونلا. c- کلنی های جنس شیگلا در محیط کشت-Salmonnella Shigella

استخراج DNA از جدایه های باکتریایی و تکثیر ناحیه ژن 16S rRNA

جدایه هایی که بر اساس نتایج آزمونهای بیوشیمیایی انتخاب می شوند برای تعیین دقیق جنس و گونه تحت آزمایش های مولکولی قرار می گیرند..به این منظورپس از استخراج DNA باکتری (جوشاندن یا استفاده از کیت) واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای universal (27F) جهت تکثیر ناحیه 16S rRNA انجام می پذیرد.

تعیین توالی و انجام Multialignment

[1] - Indol-Methyl Red- Voges proskuer-Citrat

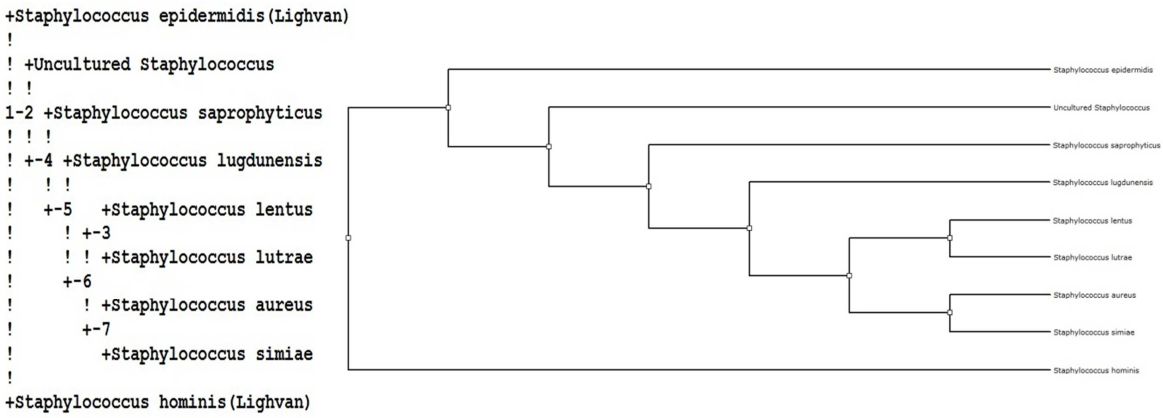
پس از انجام تعیین توالی ناحیه تکثیر شده (Macrogen)، ابتدا نسبت به ویرایش توالی مورد استفاده اقدام و سپس با گزینش توالی های مرجع از بانک ژن تشابه یا عدم تشابه توالی تکثیر شده از میکروارگانیسم های مورد شناسایی و میکروارگانیسم های مرجع مورد مقایسه قرار می گیرد. لازم به ذکر است که نرم افزارهای Bioedit و CLC bio با کمک روشClustalW Multiple Alignment قادر به انجام این مقایسه خواهند بود. بر این اساس در جدول زیر دو باکتری استافیلوکوکوس جدا شده از پنیر لیقوان با ۷ باکتری استافیلوکوکوس مرجع مورد مقایسه قرار گرفته است. نکته حائز اهمیت در انتخاب باکتری مرجع رعایت عوامل ایجاد تمایز بین باکتری های مختلف مثل منشاء باکتری، قابلیت بیماریزایی و میزان مقاومت به شرایط محیطی می باشد. این گونه طبقه بندی منجر به شناسایی و طبقه بندی دقیق باکتری جدا شده از ماده غذایی خواهد شد.

جدول۲: جنس و گونه میکروارگانیسم های شناسایی شده و مرجع(استافیلوکوکوس)

ردیف	جنس و گونه باکتری استافیلوکوکوس	مشخصه بارز
۱	Staphylococcus hominis (لیقوان)	عامل ایجاد بیماری در پوست و عفونت در بیماران
۲	Staphylococcus epidermidis (لیقوان)	فلور طبیعی و غیر بیماریزای پوست انسان
۳	Staphylococcus saprophyticus	ایجاد کننده عفونت در مجاری ادراری
۴	Staphylococcus lugdunensis	موجود روی پوست و جدا شده از عفونت های حاد
۵	Staphylococcus lentus	قادر به مصرف قند رافینوز- فلور محیطی
۶	Staphylococcus lutrae	موجود روی حیوانات وحشی (سمور) - فلور محیطی
۷	Staphylococcus aureus	عامل ایجاد مسمومیت استافیلوکوکال در انسان
۸	Staphylococcus simiae	موجود روی حیوانات وحشی (میمون)- فلور محیطی
۹	Uncultured Staphylococcus	استافیلوکوکوس غیر قابل کشت

تهیه درخت خویشاوندی ژنتیکی باکتری ها (Phylogenetic tree)

پس از مقایسه توالی های ویرایش شده میکروارگانیسم ها با استفاده از نرم افزارهای Bioedit و CLCbio وبا کمک دو روش UPGMA و Neighbor Joining Method نسبت به تهیه درخت خویشاوندی ژنتیکی باکتری ها اقدام خواهد شد. شکل زیر Phylogenetic tree حاصل از مقایسه باکتری های استافیلوکوکوس موجود در جدول ۲ می باشد. بر اساس شکل زیر استافیلوکوکوس های ایزوله شده از پنیر لیقوان (Staphylococcus hominis و Staphylococcus epidermidis) به ترتیب بیشترین شباهت را به Staphylococcus saprophyticus و Uncultured Staphylococcus دارد. براین اساس می توان نتیجه گرفت دو جدایه استافیلوکوکال موجود در پنیر لیقوان تا حدودی مخاطره آمیز بوده و اعمال شرایط بهینه در فرآیند تولید پنیر و رعایت بهداشت عمومی ضروری به نظ می رسد.



شکل۲: فیلوگرام ژنتیکی جدایه های استافیلوکوکال پنیر لیقوان و استافیلوکوکس های مرجع

منابع

[1]Caruana, R.,2008. A Non-Parametric EM-Style Algorithm for Imputing Missing Values. BMC Bioinformatics, 9(252). doi:10.1186/1471-2105-9-252.
[2]Harrigan W.F. 1998. Laboratory Methods in Food Microbiology. Academic Press: London, 100-118, 343-348.
[3].Albenzio, M., Corbo, M.R., Rehman, U.S., Fox, P.F., de Angelis, M., Corsetti, A., Sevi, A., Gobbetti, M., 2001. Microbiological and biochemical characteristics of Canestrato Pugliese cheese made from raw milk, pasteurized milk or by heating the curd in hot whey. International Journal of Food Microbiology 67, 35‐48.
[4]Ayad, E.H.E., Verheul, A., Engels, W.J., Wouters, J.T., Smit, G., 2001. Enhanced flavor formation by combination of selected lactococci from industrial and artisanal origin with focus on completion of a metabolic pathway. Journal of Applied Micriobiology 90, 59‐67.
[5]Cocolin, L., Aggio, D., Manzano, M., Cantoni, C., Comi, G., 2002. An application of PCRDGGE analysis to profile the yeast populations in raw milk. International Dairy Journal 12, 407‐411.
[6]Cogan, T.M., Barbosa, M., Beuvier, E., Bianchi-Salvadori, S., Cocconcelli, P.S., Fernandes, I., Gómez, J., Gómez, R., Kalantzopoulos, G., Lledda, A., Medina, M., Rea, M.C.,
[7].Rodríguez, E., 1997. Characterization of the lactic acid bacteria in artisan dairy products. Journal of Dairy Research 64, 409‐421.