طب‌نظامی
پاییز ۱۳۸٤، شماره ۷ (۳)
صفحات: ۲۳۸-۲۳۱

شناسایی کلستریدیوم بوتولینوم تیپA، B و E با استفاده از Multiplex PCR

مجتبی سعادتی[۱].Ph.D، شهرام نظریان[۲].M.Sc، محمود تولایی[۳].Ph.D، جعفر امانی[۴].M.Sc و هادی شیرزاد[۵].M.D

آدرس مکاتبه: دانشگاه امام حسین (ع) - دانشکده علوم پایه - گروه علوم زیستی - تهران - ایران

تاریخ اعلام وصول: ۱۳۸٤/۶/۱۹ تاریخ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۸٤/۹/۳۰ تاریخ اعلام قبولی مقاله: ۱۳۸٤/۱۱/۱۸

خلاصه

مقدمه: باکتری کلستریدیوم بوتولینوم قادر به تولید اسپور بوده و می‌تواند با تولید سم کشنده باعث بیماری فلج شل و یا بوتولیسم شود. تشخیص بوتولیسم با یافتن سم و یا باکتری در نمونه غذای مشکوک امکان‌پذیر است. روش استاندارد برای یافتن سم استفاده از حیوان آزمایشگاهی می‌باشد. این روش بسیار حساس و اختصاصی ولی پر هزینه، زمان بر و پر زحمت بوده، نیاز به استفاده از حیوان آزمایشگاهی دارد و تنها تعداد معدودی از نمونه‌ها را می‌توان در یک زمان مورد بررسی قرار داد. روش‌های دیگری از جمله استفاده از آنتی‌بادی‌ها در سیستم تشخیص الیزا جهت تشخیص توکسین به کار رفته ولی با توجه به وجود واکنش متقاطع بین تیپ‌های این باکتری کمتر مورد توجه قرار گرفته است. در این تحقیق برای شناسایی تیپ‌های A، B و E کلستریدیوم بوتولینوم که در انسان ایجاد بیماری می‌کنند، از روش Multiplex PCR استفاده شد.

مواد و روش کار: تأیید اولیه تیپ‌های باکتریایی کلستریدیوم بوتولینوم مورد استفاده در این تحقیق با روش بیوشیمیایی و نیز Bioassay صورت گرفت. جهت شناسایی بوسیله PCR، سه جفت پرایمر با دمای ذوب نزدیک به هم طراحی گردید. هر پرایمر به طور اختصاصی برای ژن سم بوتولینیوم تیپ‌های A، B و E عمل نموده و این سه جفت پرایمر قادر بود به طور هم‌زمان سه سروتیپ را شناسایی نماید.

نتایج: بزرگی محصول PCR تیپ‌های A, B و E به ترتیب۷۸۲، ۲۰۵ و ۳۸۹ جفت باز بود که با روش هضم آنزیمی نیز صحت محصول PCR تأیید شد. باکتری کلستریدیوم پرفرنجنس به عنوان کنترل منفی مورد استفاده قرار گرفت و نتایج PCR آن با پرایمرهای طراحی شده منفی بود.

بحث: این روش سریع، حساس و دقیق بوده و از آن در جهت شناسایی سه تیپ بیماریزای انسانی باکتری کلستریدیوم بوتولینوم می‌توان استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: شناسایی، کلستریدیوم بوتولینوم، Multiplex PCR assay

---

۱- استادیار - دانشگاه امام حسین (ع) - نویسنده مسئول
۲- فوق لیسانس سلول مولکولی - دانشگاه امام حسین (ع)
۳- استادیار - دانشگاه امام حسین (ع)
۴- فوق لیسانس سلول مولکولی - دانشگاه امام حسین (ع)
۵- پزشک عمومی - دانشگاه امام حسین (ع)

مقدمه

کلستریدیوم بوتولینوم (Clostridium botulinum) عامل نوعی مسمومیت غذایی به نام بوتولیسم (botulism) می‌باشد که در سراسر جهان پراکنده است [۱، ۲]. این باکتری، یک باسیل گرم مثبت، بی‌هوازی، اسپوردار و خاکزی است که ضمن رشد تولید توکسین نموده که قوی‌ترین ماده سمی شناخته شده می‌باشد که مقدار کشندگی آن در انسان تقریباً یک تا دو میکروگرم است [۳].

توکسین‌های کلستریدیوم بوتولینوم، بر اساس خصوصیات آنتی‌ژنی به هفت تیپ A تا G تقسیم می‌گردد [۴، ۵]. تیپ‌های A، B و E و گاهی F اغلب در انسان ایجاد بیماری می‌کنند و تیپ‌های C و D مسئول بروز بیماری در حیوانات می‌باشند. بر اساس نوع توکسین تولید شده، سویه‌های کلستریدیوم بوتولینوم در گروه یک تا پنج تقسیم می‌شود که گروه یک و دو اصلی‌ترین پاتوژن‌های انسانی به شمار می‌آیند [۶].

گروه یک شامل انواع پروتئولیتیک A، B و F و گروه دو شامل انواع غیرپروتئولیتیک B، E و F است. این دو گروه به طور کامل از لحاظ خصوصیات فنوتیپی شامل نیازمندی‌های حرارتی، پروفایل بیوشیمیایی و تولید متابولیت‌ها با یکدیگر متفاوت می‌باشند [۶]. وقوع مکرر اپیدمی‌های محدود و منطقه‌ای ناشی از این مسمومیت در ایران و نیز پتانسیل بالای این توکسین‌ها در کشندگی افراد و نیز توانایی این سم در تبدیل آن به‌عنوان سلاح جنگی، ضرورت استفاده از روشی سریع و دقیق برای شناسایی سم بوتولینوم اجتناب‌ناپذیر است.

تشخیص بوتولیسم بر اساس تعیین نوروتوکسین و باکتری‌های کلستریدیوم بوتولینوم در بیماران یا نمونه غذای مشکوک می‌باشد [۷، ۸]. روش استاندارد برای تعیین تیپ توکسین سنجش حیاتی حیوانی است؛ بدین گونه که با تزریق سرم بیمار یا باقیمانده غذا به درون صفاق موش، مرگ حیوان رخ می‌دهد [۹، ۱۰] که این امر مستلزم هزینه و صرف وقت می‌باشد؛ ضمن این که با محدودیت‌های اخلاقی در استفاده از حیوانات آزمایشگاهی نیز همراه می‌باشد. در روش شناسایی الیزا نیز از آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال برای تشخیص تیپ‌های سموم بوتولیسم استفاده شده است. از معایب این روش وجود واکنش متقاطع بین آنتی‌بادی تولید شده علیه این سموم می‌باشد که می‌تواند باعث بروز اشکال در تعیین توکسین گردد. جداسازی و شناسایی متداول کلستریدیوم بوتولینوم مشکل است، مگر این‌که سم تولید شده توسط باکتری در سنجش حیوانی به تأیید برسد. آزمون‌های بیوشیمیایی تجاری در تشخیص ارگانیسم‌های هر دو گروه کلستریدیوم بوتولینوم با توفیق چندانی همراه نبوده است [۱۱].

یکی از روش‌های شناسایی عوامل بیماری‌زا، استفاده از روش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) Polymerase Chain Reaction می‌باشد که از سرعت و حساسیت بسیار بالایی برخوردار است. در مورد کلستریدیوم بوتولینوم، چندین روش مبتنی بر PCR جهت تشخیص در طی دهه گذشته گزارش شده است [۱۲، ۱۴] که بر اساس تعیین ژن نوروتوکسین بوتولینوم (BoNT) عمل می‌نمایند [۱۵]. در بیشتر این پروتکل‌ها، از یک جفت پرایمر اختصاصی جهت شناسایی ژن تولید کننده توکسین استفاده می‌گردد و بیش از یک سروتیپ در هر لحظه قابل ردیابی نیست. در نتیجه، در یک بررسی نمونه نامشخص، تعیین هر تیپ کلستریدیوم بوتولینوم نیازمند انجام چندین آزمایش است که خود مستلزم صرف وقت و هزینه بیشتری می‌باشد. برای کاربرد بیشتر و دقیق‌تر تکنیک PCR در تشخیص، روش‌های تغییر یافته‌ای از آن به‌وجود آمده است که می‌توان به روش Multiplex PCR اشاره کرد. در این روش برخلاف PCR معمولی، از چندین جفت پرایمر اختصاصی جهت هدف‌های مختلف در یک واکنش تکثیری استفاده می‌شود. این امکان وجود دارد که بیش از یک سروتیپ کلستریدیوم بوتولینوم مورد شناسایی قرار گیرد. طی مطالعات گذشته، کاربرد مفید Multiplex PCR در تعیین سایر باکتری‌های بیماری‌زا گزارش شده است [۱۵، ۱۶]. با این وجود هنوز استفاده از این روش در تعیین سروتیپ‌های کلستریدیوم بوتولینوم در دست بررسی است. هدف از این تحقیق شناسایی تیپ‌های مختلف بیماری‌زای انسانی کلستریدیوم بوتولینوم بود که با استفاده از روش Multiplex PCR نسبت به شناسایی این باکتری با استفاده از ژن‌های هدف، که همان ژن‌های کد کننده توکسین بوتولینوم است، اقدام گردید.

مواد و روش کار

مواد: آنزیم Taq DNA polymerase، آنزیم‌های محدودگر و شاخص وزن مولکولی 100 bp DNA ladder از شرکت فرمنتاز خریداری شد. همچنین Tris-base، EDTA، dNTP، $MgCl_2$، RNase، کلروفرم، فنل، اسید بوریک، اتیدیوم بروماید و لیزوزیم از شرکت سیناژن تهیه گردید.

سویه‌های باکتری: در این مطالعه از سویه‌های کلستریدیوم بوتولینوم تیپ‌های A و B جدا شده از بیمار، تیپ E (جدا شده از ماهی‌های دریای خزر) و کلستریدیوم پرفرنجنس تیپ A (موسسه تحقیقاتی سرم سازی رازی) استفاده شد. این سویه‌ها با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی و آزمون خنثی‌سازی سم (bioassay) مورد تأیید قرار گرفتند [۱۸، ۱۹، ۲۰].

تهیه DNA الگو: پس از کشت باکتری در محیط Cooked meat در شرایط بی‌هوازی، استخراج کروموزوم به روش لیز قلیایی انجام شد [۲۱، ۲۲]. در این روش، DNA ژنومیک به‌دست آمده بر روی ژل آگاروز یک درصد بررسی و پس از تعیین غلظت با روش ژل و اسپکتروفتومتری در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر برای مراحل بعدی، مورد استفاده قرار گرفت. جهت PCR مستقیم از کشت باکتری، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون کشت جمع‌آوری و به آن ۵۰ میکرولیتر بافر TE (Tris-EDTA) اضافه شد. نمونه به مدت ۵ دقیقه در حرارت ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت، سپس سانتریفوژ شده و از محلول رویی جهت PCR استفاده شد.

پرایمرها: پرایمرهای مورد استفاده مربوط به توالی‌های غیر مشابه ژن کد کننده توکسین باکتری در سویه‌های بیماری‌زای انسانی بود (جدول ۱). سنتز پرایمرها، پس از بررسی لازم جهت اختصاصی بودن آنها، به شرکت MWG-Biotech آلمان سفارش داده شد.

جدول ۱: اطلاعات مربوط به پرایمرهای مورد استفاده

پرایمر	سکانس پرایمر	جایگاه بر روی ژن کدکننده سم	اندازه قطعه
A_f	AGCTACGGAGGCAGCTATGTT	۱۷۸۸ -۱۸۰۸	۷۸۲ جفت باز
Ar	CGTATTTGGAAAGCTGAAAAGG	۲۵۶۹ -۲۵۴۸	
B_f	CAGGAGAAGTGGAGCGAAAA	۴۳۴-۴۵۳	۲۰۵جفت باز
B_r	CTTGCGCCTTTGTTTTCTTG	۶۳۸ -۶۱۹	
E_f	CCAAGATTTTCATCCGCCTA	۱۵۶-۱۷۵	۳۸۹جفت باز
E_r	GCTATTGATCCAAAACGGTG	۵۴۴-۵۲۵	

واکنش PCR: اجزای واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱ میکرولیتر از DNA الگو، ۱ میکرولیتر از آنزیم Taq DNA polymerase (10U/µl)، ۰/۸ میکرولیتر از هر پرایمر (20pmol/µl)، ۰/۲ میکرو مولار از مخلوط دزوکسی نوکلئوتیدهای تری‌فسفات (۲/۵ میلی‌مولار)، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR x ۱۰، ۱/۵ میکرولیتر از نمک $MgCl_2$ (۵۰ میلی‌مولار) با یکدیگر مخلوط شدند. واکنش PCR در ۲۷ سیکل در دمای اتصال ۶۰ درجه سانتی گراد مطابق جدول ۲ انجام شد. جهت بررسی محصول PCR، ۵ میکرولیتر از آن بر روی ژل آگاروز یک درصد انتقال داده شد و با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و مشاهده گردید [۲۳].

جدول ۲: نحوه اجرای واکنش PCR

	مرحله	درجه حرارت	زمان	تعداد سیکل‌ها
۱	دناتوره کردن اولیه	۹۴ درجه	۵ دقیقه	۱ سیکل
۲	دناتوره کردن	۹۴ درجه	۱ دقیقه	۲۵سیکل
	اتصال	۶۰ درجه	۳۰ ثانیه	
	تکثیر	۷۲ درجه	۳۰ ثانیه	
۳	تکثیر نهایی	۷۲ درجه	۵ دقیقه	۱ سیکل

هضم آنزیمی محصول PCR: جهت تأیید محصول PCR، با بررسی ژن هدف، آنزیم‌های محدودگر مناسب برای هر محصول شناسایی و محصولات با آنزیم‌های مورد نظر برش داده شدند.

بررسی حساسیت واکنش PCR: جهت بررسی میزان حساسیت واکنش PCR، علاوه بر تهیه رقت‌های متوالی از سوسپانسیون کشت باکتری، از DNA الگو رقت‌های مختلف تهیه و واکنش PCR انجام گرفت.

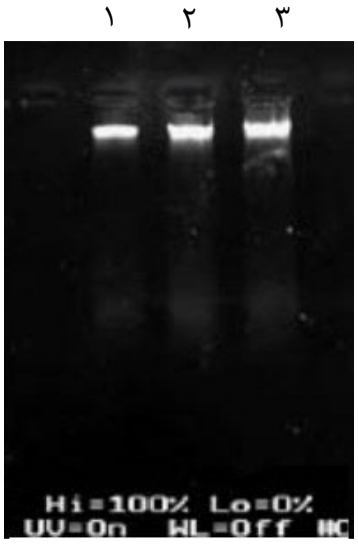
تعیین ویژگی واکنش PCR: به منظور بررسی واکنش متقاطع بین سویه‌های مختلف کلستریدیوم، با استفاده از DNA کروموزومی کلستریدیوم پرفرنجنس و نیز با استفاده از پرایمرهای اختصاصی کلستریدیوم بوتولینوم، واکنش PCR انجام شد. این واکنش بین تیپ‌های مختلف بوتولینوم نیز مورد بررسی قرار گرفت.

جهت اطمینان از حساسیت و ویژگی واکنش PCR، در فواصل زمانی معین و همچنین در طول یک روز و با تغییر مواد مورد استفاده در آزمایشات، چندین بار واکنش Mono PCR و Multiplex PCR برای تیپ‌های A, B و E بوتولینوم انجام گرفت و نتایج مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج

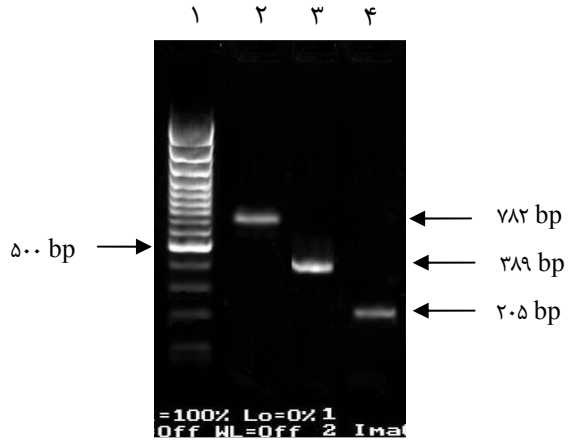
پس از کشت باکتری، سوسپانسیون حاوی تعداد مشخص تحت روش لیز قلیایی برای جداسازی DNA کروموزومی قرار گرفت و سپس کیفیت DNA استخراج شده بر روی ژل آگاروز یک درصد بررسی شد. همان طور که در شکل ۱ دیده می‌شود DNA استخراج شده عاری از RNA بوده و از کیفیت مناسبی جهت انجام PCR برخوردار است. ستون ۱ مربوط به DNA استخراج شده از باکتری کلستریدیوم بوتولینوم تیپ A می‌باشد. در ستون ۲ و ۳، DNA کروموزومی تیپ B و E که از سوسپانسیون کشت باکتری تخلیص شده، نشان داده شده است.

پس از سنتز پرایمرها، خلوص آنها بر روی ژل پلی آکریل آمید ۱۰ درصد بررسی و عدم آلودگی احتمالی تأیید شد. برای انجام واکنش PCR، هر سویه به طور جداگانه با پرایمرهای اختصاصی خود در واکنش PCR قرار داده شد (شکل ۲). در واکنش PCR جداگانه برای هر تیپ قطعات ۷۸۲، ۳۸۹ و ۲۰۵ جفت باز که به ترتیب مربوط به تیپ‌های A، E و B کلستریدیوم بوتولینوم می‌باشند، مشاهده گردید.



شکل ۱: استخراج DNA کروموزومی کلستریدیوم بوتولینوم تیپ های A، B و E (ژل آگاروز ۱ درصد)

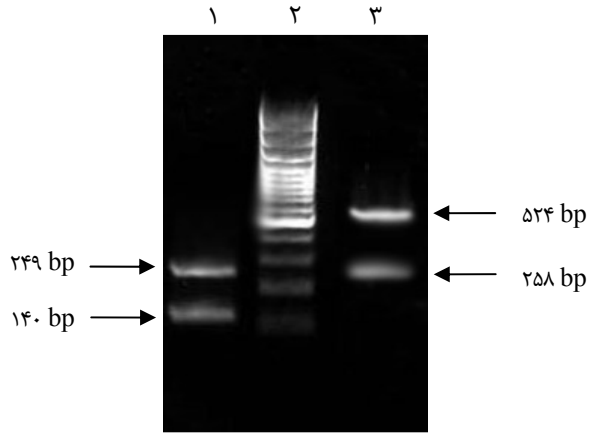
ردیف ۱- DNA کروموزومی استخراج شده از سوسپانسیون کشت باکتری تیپ A
ردیف ۲- DNA کروموزومی استخراج شده از سوسپانسیون کشت باکتری تیپ B
ردیف ۳- DNA کروموزومی استخراج شده از سوسپانسیون کشت باکتری تیپ E



شکل ۲: بررسی PCR از تیپ‌های A، B و E کلستریدیوم بوتولینوم (ژل آگاروز ۱ درصد)

ردیف ۱- نشانگر اندازه 100 bp DNA Ladder
ردیف۲- محصول PCR از تیپ A کلستریدیوم بوتولینوم
ردیف۳- محصول PCR از تیپ E کلستریدیوم بوتولینوم
ردیف۴- محصول PCR از تیپ B کلستریدیوم بوتولینوم

به منظور تأیید قطعات به دست آمده از واکنش PCR، پس از بررسی محصولات بر روی ژل آگاروز، محصول PCR تیپ‌های A و E با آنزیم محدودگر برش داده شدند. در شکل ۳ قطعات حاصل از برش آنزیمی محصولات PCR نشان داده شده است. ردیف ۱ مربوط به برش محصول PCR تیپ E (۳۸۹ جفت باز) با آنزیم محدودگر MnlI می‌باشد که دو قطعه ۱۴۰ و ۲۴۹ جفت بازی مورد نظر دیده می‌شود. در ردیف ۳ نیز اثر آنزیم BclI بر قطعه ۷۸۲ جفت بازی محصول PCR تیپ A مشاهده می‌گردد. طول قطعات حاصل از برش ۲۵۸ و ۵۲۴ جفت باز بود. به منظور کنترل طول قطعات حاصل از برش از نشانگر اندازه 100 bp DNA ladder استفاده شد (ستون ۲).



شکل ۳: آنالیز آنزیمی محصولات PCR با آنزیم‌های محدودگر MnlI و BclI(ژل آگاروز ۱/۵ درصد)

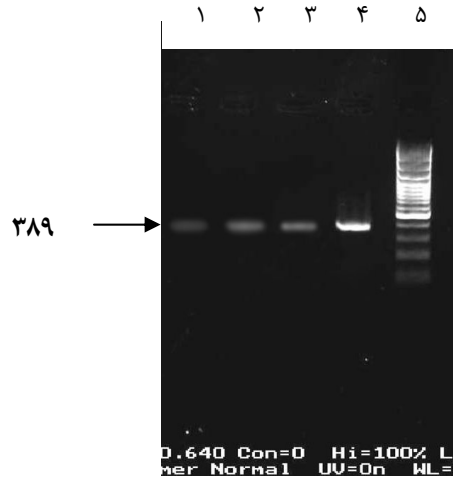
ردیف۱- برش محصول PCR تیپ E با آنزیم MnlI (طول قطعات ۱۴۰ و ۲۴۹ جفت باز)

ردیف۲- نشانگر اندازه 100 bp DNA Ladder

ردیف۳- برش محصول PCR تیپ A با آنزیم محدودگر BclI (طول قطعات ۲۵۸ و۵۲۴ جفت باز)

پس از تأیید محصولات PCR، میزان حساسیت و ویژگی واکنش برای تیپ‌های مختلف بررسی شد. ژنوم هر تیپ با پرایمرهای اختصاصی تیپ‌های دیگر در واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفت. همچنین از ژنوم و سلول باکتری کلستریدیوم پرفرنجنس نیز در واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی کلستریدیوم بوتولینوم استفاده شد که تمامی واکنش‌ها منفی بودند و اختصاصی بودن تست مورد استفاده مشخص گردید.

برای تعیین میزان حساسیت از DNA الگوی تیپ E، رقت‌های ۱/۱۰ تهیه و به‌عنوان الگوی PCR استفاده شد. در این آزمایش واکنش PCR با رقت‌های مختلف از غلظت ۱۰۰ نانوگرم در یک میکرولیتر از DNA الگو انجام گردید و یک صدم نانو گرم از DNA الگو مورد شناسایی قرار گرفت. در ردیف‌های ۱تا ۴ محصول PCR با رقت‌های ۱/۱۰، ۱/۱۰۰، ۱/۱۰۰۰، ۱/۱۰۰۰۰ DNA الگو مشاهده می‌شود (شکل ۴).



شکل ۴: بررسی میزان حساسیت PCR در تشخیص تیپ E کلستریدیوم بوتولینوم (ژل آگاروز ۱٪)

ردیف ۱- محصول PCR با رقت ۱/۱۰۰۰۰ DNA الگو

ردیف ۲- محصول PCR با رقت ۱/۱۰۰۰ DNA الگو

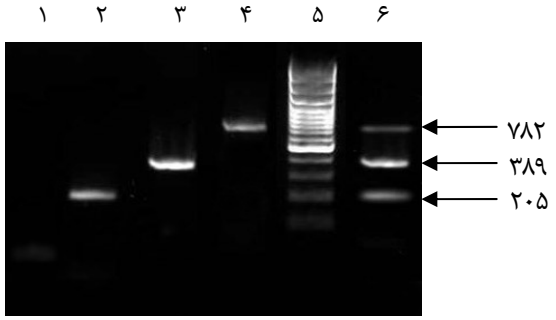
ردیف ۳- محصول PCR با رقت ۱/۱۰۰ DNA الگو

ردیف ۴- محصول PCR با رقت ۱/۱۰ DNA الگو

ردیف۵- نشانگر اندازه 100 bp DNA Ladder

به منظور شناسایی هر سه تیپ A, B و E کلستریدیوم بوتولینوم به طور مجزا و نیز همزمان، واکنش PCR به‌طور جداگانه برای هر تیپ و همچنین به‌صورت Multiplex برای هر سه جفت تیپ انجام شد که نتایج در شکل ۵ آورده شده است. جهت بررسی ویژگی و اختصاصی بودن واکنش PCR از DNA الگوی کلستریدیوم پرفرنجنس با پرایمرهای اختصاصی بوتولینوم استفاده شد، که واکنش PCR منفی بود (ستون ۱). در واکنش PCR جداگانه برای هر تیپ، قطعات ۲۰۵،۳۸۹،۷۸۲ جفت بازکه مربوط به تیپ‌های A، E و B کلستریدیوم بوتولینوم می‌باشند، نیز مورد

بررسی قرار گرفته است (ستون ۲، ۳ و ۴). جهت تسریع در شناسایی نیز واکنش Multiplex PCR برای هر سه تیپ باکتری انجام شد که در ستون ۶ نشان داده شده است. به منظور بررسی حساسیت و ویژگی واکنش PCR، چندین بار واکنش Mono PCR و Multiplex PCR برای تیپ‌های A, B و E بوتولینوم انجام گرفت و نتایج به‌دست آمده حاکی از تکرار پذیری واکنش‌های فوق بدون تغییر بود.



شکل ۵: بررسی Multiplex PCR از تیپ‌های A، B و E کلستریدیوم بوتولینوم (ژل آگاروز ۱ درصد)
ردیف۱- واکنش Multiplex PCR با DNA کلستریدیوم پرفرنجنس
ردیف ۲- محصول Multiplex PCR از تیپ B کلستریدیوم بوتولینوم
ردیف۳- محصول Multiplex PCR از تیپ E کلستریدیوم بوتولینوم
ردیف۴- محصول Multiplex PCR از تیپ A کلستریدیوم بوتولینوم
ردیف۵- نشانگر اندازه 100 bp DNA Ladder
ردیف۶- محصول Multiplex PCR از تیپ‌های A، B و E کلستریدیوم بوتولینوم

بحث

کلستریدیوم بوتولینوم عامل ایجاد کننده مسمومیت بوتولیسم در انسان و حیوانات می‌باشد. با توجه به وجود اسپور باکتری در مناطق مختلف و احتمال آلودگی مواد غذایی و محیط به باکتری و احتمال استفاده از آن در حملات بیولوژیکی و بیوتروریستی، شناسایی عامل ایجاد مسمومیت از اهمیت خاصی برخوردار است.

سنجش بیولوژیک از روش‌های مهم در تشخیص کلستریدیوم بوتولینوم در نمونه‌های غذایی، کلینیکی و محیطی می‌باشد. هر چند این روش یک روش استاندارد است، اما خالی از اشکال نبوده و دارای معایب زیادی می‌باشد. یکی از این معایب طولانی بودن زمان تست سنجش بیولوژیک بوده، به طوری که ۲۴ تا ۷۲ ساعت زمان نیاز است تا بتوان جواب قطعی این تست را مشاهده کرد [۱۱، ۱۲]. یکی دیگر از معایب سنجش بیولوژیک مرگ‌های غیر اختصاصی حیوان آزمایشگاهی است که می‌تواند باعث تشخیص غیر واقعی گردد. در ضمن آنتی‌بادی‌های موجود اغلب پلی‌کلونال بوده که باعث بروز واکنش‌های غیر اختصاصی آنتی‌بادی- آنتی‌ژن شده و گاهی نیز تعیین تیپ توکسین را دچار اختلال می‌کند. نکته مهم دیگر اینکه امروزه سویه‌هایی از باکتری مزبور شناسایی شده‌اند که توانایی تولید توکسین تیپ‌های دیگر را دارا می‌باشند که با چنین تستی امکان تشخیص آنها با مشکل مواجه می‌شود [۱۷]. در بسیاری از موارد، شناسایی باکتری به‌عنوان خطر اولیه و هشداری برای رفع آلودگی محیط یا مواد غذایی است و می‌تواند در جلوگیری از ایجاد مسمومیت مؤثر باشد.

از آنجا که روش‌های فوق‌الذکر قادر به شناسایی باکتری کلستریدیوم بوتولینوم نیستند و با توجه به لزوم تشخیص سریع و اختصاصی تیپ‌های مختلف کلستریدیوم بوتولینوم جهت جلوگیری از شیوع مسمومیت و مرگ و میر افراد، استفاده از روشی آسان و قابل اطمینان ضروری به نظر می‌رسد. آنچه که باید مد نظر قرار گیرد، استفاده از تکنیکی است که دو ویژگی حساسیت و اختصاصی بودن را برای شناسایی عوامل دارا باشد. تکنیک PCR دارای چنین امتیازاتی است [۱۵]. در این روش امکان شناسایی کلستریدیوم بوتولینوم که به فرم رویشی یا اسپور در محیط یا مواد غذایی وجود داشته و پتانسیل تولید توکسین را دارا باشد، وجود دارد [۱۲]. این روش همچنین امکان جداسازی کلستریدیوم‌های غیر توکسیک از کلستریدیوم‌های توکسیک را که از لحاظ فنوتیپی و ژنوتیپی بسیار به هم شباهت دارند، فراهم می‌سازد. روش Multiplex PCR که در این تحقیق استفاده گردید، روش بسیار مؤثر و کاربردی در شناسایی کلستریدیوم بوتولینوم به شمار می‌رود که امکان شناسایی همزمان هر سه تیپ بیماری‌زای کلستریدیوم بوتولینوم را فراهم آورده است. از مزایای مهم این روش تشخیص سریع در مدت زمان کوتاه است، به گونه‌ای که پس از آماده نمودن نمونه، در عرض کمتر از سه ساعت، شناسایی و تعیین تیپ بیماری‌زای انسانی کلستریدیوم بوتولینوم امکان‌پذیر است.

جهت اختصاصیت واکنش برای هر سه تیپ باکتری، پرایمرها باید

از روی نواحی کاملاً غیر مشابه ژن‌های کد کننده توکسین طراحی شوند. جهت بررسی عدم اتصال پرایمرها به یکدیگر و اتصال غیر اختصاصی آنها به ژن کدکننده توکسین از نرم‌افزارهای DNAsis و Oligo استفاده شد. نتایج حاصله از این بررسی‌ها نشان دهنده دمای مناسب اتصال پرایمرها و نیز عدم واکنش متقاطع بین آنها و اتصال غیر اختصاصی به سویه‌های دیگر می‌باشد.

در این تحقیق به منظور شناسایی هر سه تیپ A، B و E کلستریدیوم بوتولینوم به‌طور مجزا و نیز همزمان، از واکنش PCR به‌طور جداگانه برای هر تیپ و همچنین به صورت Multiplex برای هر سه تیپ استفاده شد که قطعات ۷۸۲، ۳۸۹ و ۲۰۵ جفت باز که به ترتیب مربوط به تیپ های A، E و B کلستریدیوم بوتولینوم بود به دست آمد.

نتایج این تحقیق با گزارش لیندرستوم و همکارانش در سال ۲۰۰۱ مطابقت دارد [۱۵]. جهت تأیید محصولات PCR با بررسی‌های انجام شده آنزیم‌های مناسب برای برش محصولات PCR تیپ های A و E انتخاب گردید. محصول PCR تیپ E (۳۸۹ جفت باز) با آنزیم محدودگر MnlI برش داده شد که دو قطعه ۱۴۰ و ۲۴۹ جفت بازی مورد نظر مشاهده گردید. اثر آنزیم BclI بر قطعه ۷۸۲ جفت بازی محصول PCR تیپ A دو قطعه ۲۵۸ و ۵۲۴ جفت باز بودکه محصولات PCR تیپ A و E مورد تأیید قرار گرفت. اما در خصوص محصول PCR تیپ B، این امر به دلیل کوچک بودن طول قطعه و نیز عدم وجود محل برش آنزیم محدودگر مناسب، میسر نگردید. استفاده از روش هضم آنزیمی در سایر مقالات موجود در زمینه تشخیص بوتولینوم با PCR گزارش نشده است. از معایب احتمالی در واکنش PCR وجود مهارکننده‌ها است که می‌تواند باعث ایجاد خطای کاذب در حین واکنش گردد. با توجه به گزارش سنگ بروم و همکارانش در سال ۲۰۰۰ [۲۴] در خصوص وجود ممانعت کننده‌های واکنش PCR جهت انجام PCR مستقیم از کشت باکتری، پس از جوشاندن محیط کشت از سانتریفوژ با دور پایین استفاده شد تا لاشه باکتری ته‌نشین شده و از بروز اشکالات احتمالی در واکنش PCR جلوگیری شود. با توجه به نتایج مثبت این تحقیق می‌توان با تهیه کیت تشخیص سریع کلستریدیوم بوتولینوم نسبت به شناسایی سویه تولیدکننده توکسین در نمونه‌های مواد غذایی و محیطی قبل از تولید سم اقدام نمود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از ریاست محترم دانشگاه امام حسین(ع)، جناب آقای دکتر احمد فضائلی، به جهت در اختیار قرار دادن امکانات پژوهشی دانشگاه تقدیر و تشکر می‌گردد.

منابع

1- Hielm SE, Hyytia AB, Andersin H and Korkeala HA. High prevalence of Clostridium botulinum type E in Finnish freshwater and Baltic Sea sediment samples. J Appl Microbiol 1998;84:133–137.

2- Huss HH. Distribution of Clostridium botulinum. Appl Environ. Microbiol 1980;39:764–769.

3- Lalli G, Bohnert S, Deinhardt K and Schivao G. The joinery of tetanus and botulinum neurotoxins in neurons. TRENDS in Microbiology 2003;11:431-437.

4- Park JB, Simpson LL. Inhalational poisoning by botulinum Toxin and inhalation vaccination with its heavy chain component. Infection Immunity 2003;71:1147-1154.

5- Turton K, Chaddock JA and Acharya R. Botulinum and tetanus neurotoxins: structure, function and therapeutic utility. TRENDS Biochem Sci 2002;27:552-559.

6- Hatheway CL. Toxigenic clostridia. Clin Microbiol Rev 1990;3:66–98.

7- Ferreira JL, Eliasberg SJ, Edmonds P and Harrison MA. Comparison of the mouse bioassay and enzyme-linked immunosorbent assay procedures for the detection of type A botulinal toxin in food. J Food Protect 2004;67:203-206.

8- Ferreira JL, Maslanka S, Johnson E and Goodnough M. Detection of botulinal neurotoxins A, B, E, and F by amplified enzyme-linked immunosorbent assay: collaborative study. J AOAC Int 2003;86:314-31.

9- Ferreira JL, Noah CW, Wong PC, Colvert RM, Smith DR and Hatheway CL. Detection of Clostridium botulinum toxins using the ELISA. In: Program and Abstracts of the 109th AOAC International Meeting. 1995;7-B-004, p. 22.

10- Saadati M, Salimyan J and Ebrahimi F. Production of chicken antibody (IgY) against botulinum neurotoxin type A for therapeutic usage. The 18th Congress of Clinical Chemistry And Laboratory Medicine. Kyoto, Japan, 2002 October.p.20-25.

11- Lindstrom MH, Jankola S, Hielm E and Korkeala H. Identification of Clostridium botulinum with API 20 A, Rapid ID 32 A and Rapid ANA II. FEMS Immunol Med Microbiol

six type A strains of Clostridium botulinum that contain type B toxin gene sequences. FEMS Microbiol Letters 2004;231:159-64.

۱۸- سعادتی مجتبی، سلیمیان جعفر، ابراهیمی فیروز، موسوی میرلطیف. تولید آنتی‌توکسین علیه سم بوتولیسم تیپ A. پنجمین کنگره ایمونولوژی و آلرژی ایران. ۱۳۷۹. صفحه: ۴۱.

۱۹- سعادتی مجتبی، مینایی محمدابراهیم، نظریان شهرام. تعیین تیپ E توکسین کلستریدیوم بوتولینوم با روش‌های آزمایش خنثی‌سازی در شرایط in vivo (تزریق به موش آزمایشگاهی)، آزمایش الیزا و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز PCR.دومین همایش سراسری پدافند جنگ‌های نوین، ابعاد علمی و راه‌کارها. ۱۳۸۲. صفحه:۱۶.

۲۰- سعادتی مجتبی، سلیمیان جعفر، ابراهیمی فیروز، بهمنی میرزا خلیل، گندمی ابوالفضل. ارزیابی آنتی‌بادی Y (IgY) تولید شده علیه سم بوتولینوم تایپ A در مدل حیوانی. مجله پژوهشی حکیم. دوره هفتم، شماره سوم. ۱۳۸۳. صفحات: ۵۱-۴۴.

21- Rapley R. The nucleic acid protocols handbook. Human Press Inc. 2000.p.29-31.

22- Johnson JR. Development of polymerase chain reaction–based assays for bacterial gene detection. J Microbial Methods 2000;41:201-9.

23- Sangburm K, Ronald GL and Sangryeol R. Inhibitory effects of collagen on the PCR for detection of clostridium perfringens. Appl Environ Microbiol 2000;66:1213–1215.

1999;24:267–274.

12- Aranda E, Rodrı´guez M, Asensio MA and Co´rdoba JJ. Detection of Clostridium botulinum types A, B, E and F in foods by PCR and DNA probe. Lett Appl Microbiol 1997;25:186–190.

13- Braconnier A, Broussolle V, Nguyen-The C and Carlin F. Screening for Clostridium botulinum types A, B, and E in cooked chilled foods containing vegetables and raw material using polymerase chain reaction and molecular probes. J Food Protec 2001;64:201-207.

14- Campbell KD, Collins M and East AK. Gene probes for identification of the botulinal neurotoxin gene and specific identification of neurotoxin types B, E, and F. J Clin Microbiol 1993;31:2255–2262.

15- Lindstrom M and Keto L. Multiplex PCR assay for detection and identification of Clostridium botulinum types A, B, E, and F in food and fecal material. Appli Envir Micobio 2001;67(12):5694–5699.

16- Dahlenborg M, Borch E and Radstro P. Development of a combined selection and enrichment PCR procedure for Clostridium botulinum types B, E, and F and its use to determine prevalence in fecal samples from slaughtered pigs. Appli Envir Micobio 2001;67(10):4781-4788.

17- Kirma N, Ferreira JL and Baumstark BR. Characterization of