

تشخیص سریع مولکولی لیستریامونوسایتوژنز در سس های صنعتی سرد ایران

عاطفه شاه حسینی*^۱، پیمان مهستی شتربانی^۱، افشین اخوندزاده بستی^۲

۱. گروه صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات، تهران، ایران

۲. گروه صنایع غذایی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: باکتری لیستریامونوسایتوژنز به عنوان یک عامل بیماری زای قابل انتقال از طریق مواد غذایی و مسئول ایجاد بیماری در انسان شناخته شده است. این باکتری عامل مننژیت، سقط جنین و مسمومیت غذایی در انسان است. سس-های صنعتی به عنوان یک ماده غذایی پرطرفدار روز به روز مصرف بیشتری در بین عامه مردم پیدا کرده اند. این ماده غذایی، بستر مناسبی برای ایجاد مسمومیت های غذایی می باشد. بنابراین آلودگی با لیستریامونوسیتوژنز تهدیدی برای سلامتی به ویژه افراد با سرکوب سیستم ایمنی محسوب می گردد. هدف از این مطالعه تشخیص سریع مولکولی لیستریامونوسایتوژنز در سس های صنعتی سرد ایران است.

مواد و روش ها: تعداد ۲۵ نمونه از سس های صنعتی از بازار ایران جمع آوری گردید. DNA نمونه ها به روش استاندارد فنل/کلروفرم استخراج شد. تست PCR تشخیص لیستریامونوسایتوژنز با استفاده از پرایمرهای اختصاصی بهینه و از جهت ویژگی و حد تشخیص (LOD) بررسی شد. همه نمونه ها از جهت حضور لیستریامونوسایتوژنز با استفاده از تست بهینه PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند.

یافته ها: تست PCR بهینه و محصول bp ۲۲۶ در ژل آگاروز ۲٪ مشاهده شد. LOD تست در حد ۱۰ enome/reaction به دست آمد و در آزمون ویژگی به غیر از لیستریا مونوسایتوژنز با هیچ نمونه ای آمپلیکون مشاهده نگردید. از ۲۵ نمونه سس، ۴ عدد از نظر لیستریامونوسایتوژنز مثبت گردید.

نتیجه گیری: تکنیک PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، بسیار دقیق و سریع تر نسبت به متدهای سنتی برای تشخیص لیستریا مونوسایتوژنز عمل می نماید. نتایج این پژوهش نشان می دهد که تکنیک PCR روشی مناسب جهت پایش میکروارگانیسم ها در مواد غذایی هم چون سس ها می باشد.

واژه های کلیدی: سس، مسمومیت، لیستریامونوسایتوژنز، تشخیص

مقدمه:

تأمین سلامت غذا در کنار تلاش برای تهیه غذا، اهمیتی دو چندان دارد. به دلایل متعدد، بیماری های منتقله از غذا امروزه در دنیا رو به گسترش است و همه ساله موجب ابتلاء و مرگ و میر تعداد قابل توجهی از مردم می شود.

نویسنده مسئول:

دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات، تهران، ایران

پست الکترونیکی: ati.shahhosseiny@gmail.com

تاریخ دریافت: ۲۸/۱۳۹۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۱/۲۷

لیستریوزیس بیماری مشترک انسان و حیوان است که عامل آن لیستریا مونوسیتوژنز است. علت نام گذاری این باکتری از دید تعداد منوسیت ها در حیوانات آزمایشگاهی است (۹). لیستریا مونوسیتوژنز می تواند عامل عفونت در انسان باشد. این باکتری از معدود میکروارگانیسم هایی است که می تواند از جفت عبور کرده و آثار سوء از جمله تولد زودرس نوزاد با عفونت سیستمی ایجاد کند. هم-چنین باکتری لیستریا مونوسیتوژنز در زنان حامله می-تواند به سقط جنین نیز منجر شود. این میکروارگانیسم از راه مواد غذایی منتقل می شود (۱۶).

ماینوز با خوراکی هایی از قبیل پاستا، سیب زمینی، تخم مرغ، جوجه و یا تن ماهی مخلوط می شود، بیش تر رشد می کند. سس ها انواع گوناگونی دارند مانند: سس گوجه فرنگی (کچاب)، سس چیلی، سس خردل، سس ماینوز (سس تاتار)، سس سفید (سس قارچ) و سس سویا (۱،۱۳).

در سال ۱۳۹۲ جمیله نوروزی و همکارانش به بررسی ارزیابی ژن atc A در لیستریا مونوسایتوتوزن جداسازی شده از لبنیات پرداختند. این پژوهش به منظور بررسی حضور ژن atc A در گونه های لیستریای جداسازی شده، و با روش PCR و به صورت مقطعی - توصیفی بر روی ۷۰ نمونه انجام شد و در مجموع ۱۰ مورد آلودگی لیستریا مونوسایتوتوزن مشاهده گردید. در تمامی نمونه های مثبت مورد بررسی، ژن atc A به صورت ۱۰۰٪ مشاهده گردید. امیر شاکریان به بررسی لیستریا مونوسایتوتوزن به عنوان یک عامل بالقوه بیماری زا در گوشت طیور پرداخت (۱۱). در این پژوهش تعداد ۱۰۰ نمونه گوشت ماهی و ۱۰۰ نمونه گوشت مرغ جمع آوری شد. این نمونه ها در محیط لیستریا به مدت ۴۸ ساعت غنی شده و سپس بر روی محیط های کشت اختصاصی لیستریا کشت داده شد و پرگنه های مشکوک به لیستریا شناسایی گردید. در این مطالعه، ۵ نمونه آلوده به باکتری شناخته شد و از ۱۰۰ نمونه گوشت ماهی هیچ نمونه ای مثبت نگردید. در سال ۱۳۹۲ گیتا اسلامی و همکارانش به بررسی جداسازی و تشخیص ژن های inB، prfA، atcA، لیستریا مونوسایتوتوزن در بانوان مبتلا به سقط جنین مراجعه کننده به مرکز درمانی دانشگاهی به روش PCR پرداختند. در این مطالعه سوآب های واژن از ۹۶ زن دچار سقط جنین را در محیط TSB مخمردار به مدت حداقل ۱ ماه در دمای یخچال غنی سازی شد و سپس DNA باکتری استخراج گردیده و حضور ژن های ویروالانس مونوسایتوتوزن به نام- های inB، act A، prf A با تکنیک PCR انجام شد و در نهایت لیستریا مونوسایتوتوزن در خانم های دچار سقط جنین، ۱۲/۵٪ مشاهده گردید.

احسان شاملو آقاخانی و همکارانش در سال ۱۳۹۱ به بررسی شیوع گونه های لیستریا در شیرخام عرضه شده در سطح شهر اصفهان پرداختند. در این مطالعه ۹۱ نمونه شیرخام جمع آوری شده توسط روش PCR مورد مطالعه قرار گرفت، که در نهایت ۵ نمونه آلوده به لیستریا بود که

جداسازی لیستریا مونوسایتوتوزن از مواد غذایی با روش کشت و شناسایی آن با روش های بیوشیمیایی نیازمند ۷-۸ روز زمان می باشد. از این رو وجود روش های سریع و کاربردی برای شناسایی این باکتری در مواد غذایی نیازی ضروری است (۱۲). زمان نقش بسیار عمده ای در تشخیص آلودگی دارد، چرا که با مشخص شدن آلودگی می توان در جهت از بین بردن آن و جلوگیری از سرایت آن به نمونه های دیگر و اپیدمی شدن آن تلاش کرد. پس هر چه زمان تشخیص کم تر باشد احتمال موفقیت در مبارزه با آلودگی بالا می رود. در تست های PCR زمان تشخیص بین ۱ تا ۴ ساعت می باشد (۴). در حال حاضر متداول ترین روش تشخیص لیستریا مونوسایتوتوزن کشت می باشد. ولی به دلیل وقت گیر بودن، راندمان پایین (به دلیل تعداد کم باکتری) و مشکل در تشخیص افتراقی از سایر باکتری ها اقتضا می نماید که مکانیسم تشخیصی دیگری مورد پژوهش و ارزیابی قرار گیرد (۳). برای غلبه بر محدودیت های موجود در تست های تشخیص سنتی، روش های بر پایه DNA (DNA-based)، برای تشخیص گونه های مختلف میکروبی بیماری زا گسترش و توسعه یافته اند. یکی از این روش های تشخیص مولکولی، استفاده از تکنیک PCR می باشد (۱).

سس ماینوز را می توان یک امولسیون نیمه جامد حاصل از مخلوط روغن های نباتی خوراکی، زرده تخم مرغ یا تخم مرغ کامل، سرکه یا آلبیمو و سایر افزودنی ها نظیر، نمک، ادویجات و گلوکز با توجه به نوع فرآورده تولیدی دانست، به طوری که حداقل مقدار روغن خوراکی آن ۵۰ درصد باشد. اسید استیک با اختصاص دادن ۰/۲۹ تا ۰/۵ درصد کل محصول به خود، به عنوان اسید غالب، PH فرآورده را بین ۴-۳/۶ تثبیت می کند. سس های صنعتی به عنوان یک ماده غذایی پرطرفدار روز به روز مصرف بیشتری در بین عامه مردم پیدا کرده اند. این ماده غذایی، بستر مناسبی برای ایجاد مسمومیت های غذایی می باشد. سس های سالاد از نظر ترکیب هایی کامل شبیه ماینوز هستند. با این تفاوت که محصول نهایی حاوی حداقل ۳۰ درصد روغن خوراکی می باشد. به علاوه اسید استیک، اسید عمده آن، ۱/۲ - ۰/۹ درصد از کل محصول را تشکیل می دهد به طوری که PH بین ۳/۲ تا ۳/۹ می باشد. به طور وسیع از صمغ ها جهت پایداری و تغییر ویژگی های رئولوژیک در سس ها استفاده می کنند. باکتری در غذاهایی که سس

جدول ۱: مشخصه های پرایمرهای مورد استفاده در تست تشخیص

PCR

نام آغازگر	توالی آغازگر	طول قطعه تکثیری	زن هدف
Flmono2 26	5'- TGTTAATGAACCTACAGGA CCTTC-3'	226 bp	16SrR NA
Rlmono2 26	5'- TAGTCTACATCACCTGAG ACAGA-3'		

بررسی محصول PCR

جهت آشکارسازی محصول PCR یا آمپلیکون، روش متداول و سریع الکتروفورز ژل آگارز و رنگ آمیزی با SYBR Safe (سینا کلون) استفاده شد.

کلونینگ محصول PCR :

محصول PCR، توسط روش T/A Cloning و با استفاده از کیت کلونینگ (Thermo scientific Cot.No.:K1213) کلونینگ شامل ۳ مرحله می شود. چسباندن محصول PCR به پلازمید یا وکتور PTZ57R (لایگیشن)، و سپس وارد کردن پلازمیدهای نوترکیب به میزبان *E. coli* JM107 (ترانسفورماسیون)، و در نهایت مرحله سوم که انتخاب کلون هاست که از طریق غربالگری سفید و آبی توسط XGAL و IPTG صورت گرفت.

تعیین حد تشخیص (LOD) تست PCR :

بدین منظور، با استفاده از DNA استخراج شده از سویه استاندارد لیستریا مونوسیتوژنز که میزان غلظت آن با دستگاه نانودراپ اندازه گرفته شده بود، و تعداد کپی نامبر آن از طریق فرمول Genome Copy Number (GCN) مشخص شده بود استفاده گردید. از DNA مورد نظر با غلظت مشخص، رقت های مختلف تهیه کرده و آزمون PCR در کنار کنترل مثبت و منفی بر روی آن ها گذاشته شد.

تعیین ویژگی (Specificity) تست PCR:

برای تأیید ویژگی آزمون PCR، از DNA های استافیلوکوکوس اورئوس، کمپیلوباکتر ججونی، سودوموناس آئروجیوزا، اشرشیاکلی، بروسلا آبورتوس، ویبریوکلا، *Salmonella spp* و *Shigella spp* به همراه نمونه های کنترل مثبت و منفی استفاده شد.

۴ نمونه آن مربوط به لیستریا مونوسیتوژنز بود. هدف از این مطالعه بررسی لیستریا مونوسیتوژنز و تشخیص سریع مولکولی آن در سس های صنعتی سرد ایران است.

مواد و روش ها :

تهیه سوش و استخراج DNA :

سویه استاندارد لیستریا مونوسیتوژنز PTCC1163، تهیه و DNA آن به روش (Sinaclon: DN8117C) *DNG-Plus* استخراج گردید.

بهینه نمودن تست PCR :

پرایمر مورد استفاده در این پژوهش جهت شناسایی لیستریا مونوسیتوژنز بر اساس تارگت ژن 16SrRNA انتخاب گردید. با استفاده از این پرایمرها یک قطعه ۲۲۶ bp برای *L. monocytogenes* تکثیر می گردد (۷). بررسی نرم افزاری این پرایمر در nblast، نشان داد که سکانس های انتخاب شده برای شناسایی لیستریا مونوسیتوژنز مناسب می باشند. (جدول شماره ۱).

جهت بهینه کردن تکنیک PCR، غلظت و حجم مناسب اجزای مورد نیاز این متد، خصوصاً غلظت پرایمرها- dNTP- آنزیم، بررسی و ارزیابی شد که در نهایت مقادیر مورد نیاز در یک تست PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر به- دست آمد. مقدار واکنش گرما در تست تشخیص مولکولی PCR عبارت بودند از: آب دوبار تقطیر ۱۴ میکرولیتر، ۲/۵ میکرولیتر 10X PCR Buffer، ۰/۷۵ میکرولیتر $MgCl_2$ (50 mM)، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs (10 mM)، پرایمرهای جلویی و عقبی هر کدام نیم میکرو لیتر (۰/۲ μM) و ۰/۳ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase (1.5 Unit).

همچنین پروفایل دمایی از طریق روش گرادیانت در یک بازه دمایی ۱۵ درجه ای، جهت تکثیر تارگت ژن 16SrRNA، بهینه گردید. دمای مرحله annealing برای تارگت ژن 16SrRNA، ۶۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه به دست آمد.

جمع آوری نمونه

تعداد ۲۵ نمونه سس با برندهای مختلف از فروشگاه‌ها و خرده‌فروشی‌ها جمع‌آوری و در دمای مناسب به آزمایشگاه منتقل گردید. استخراج DNA از نمونه‌های جمع‌آوری شده با استفاده از روش استاندارد فنل/کلروفرم صورت گرفت.

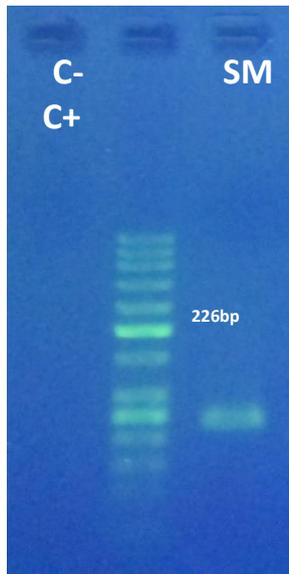
روش استخراج DNA از سس:

ابتدا در یک لوله فالکون سس و آب مقطر را مخلوط نموده تا سس رقیق شود. دو عدد لوله فالکون را برداشته و ۲۵۰ ماکرولیترا سس رقیق شده و ۲۵۰ ماکرولیترا آب مقطر با هم مخلوط کرده و ورتکس شدند. در این مرحله لوله‌های ۱/۵ سی سی به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوشانیده شدند. بعد از جوشاندن، ۵۰۰ ماکرولیترا محلول فنل/کلروفرم به سس اضافه و اینورت کرده و به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰ آر پی ام سانتریفیوژ شدند. بعد از عمل سانتریفیوژ مایع رویی که حاوی DNA است، به لوله دیگر منتقل شد. دوباره به لوله‌ها ۵۰۰ ماکرولیترا فنل/کلروفرم اضافه کرده و سپس ۱۰ بار اینورت شده و به دستگاه سانتریفیوژ (۱۰ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰ آر پی ام) منتقل شد. سپس رسوب‌دهی با ایزوپروپانول و شستشو با الکل ۷۰٪ انجام و در نهایت پس از خشک کردن DNA، آن را در بافر TE حل نمودند.

یافته‌ها

بهینه نمودن تست PCR:

پس از بهینه کردن تست PCR از جهت اجزا و پروفایل حرارتی با استفاده از پرایمر اختصاصی ژن *16SrRNA*، طبق برنامه حرارتی مناسب، یک دور PCR در مورد آن‌ها اجرا شد و DNA سویه استاندارد در کنار نمونه کنترل منفی و سایز مارکر DNA Ladder 50 bp (Cot.No.SM0371) بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ مورد ارزیابی قرار گرفت. در الکتروفورز محصول PCR، باندهای اختصاصی حاصل از آمپلیکون مورد نظر (۲۲۶ جفت باز) قابل رویت بود (شکل ۱).



شکل ۱: آزمون بهینه شده PCR برای پرایمرهای تشخیص لیستریا مونوسیتوژنز
ستون C+: محصول PCR با اندازه ۲۲۶ جفت باز برای لیستریا مونوسیتوژنز *PTCC1163*
M: سایز مارکر 50 bp DNA Ladder (Thermo scientific)
ستون C-: کنترل منفی

تعیین حد تشخیص (LOD) تست PCR:

تست حساسیت PCR با تهیه رقت‌های متوالی از DNA لیستریا مونوسیتوژنز با استفاده از پرایمر *16SrRNA* انجام گرفت که نتایج حساسیت تست PCR نشان داد که با وجود ۱۰۰ کپی از DNA، تکثیر انجام می‌گیرد و در تیتراژهای کمتر از ۱۰۰ کپی از DNA، باندهای مشاهده نشد که نشان از حساسیت بالای تست می‌باشد (شکل ۲).



شکل ۲: تعیین حد تشخیص آزمون PCR برای شناسایی لیستریا مونوسیتوژنز
SM: سایز مارکر 1Kb DNA Ladder (Thermo scientific)
Cot.No.:SM1331

بستر مناسب، شرایط را برای رشد باکتری ها فراهم می- کند که در نهایت رشد آنها باعث به خطر انداختن سلامت مصرف کننده می شود. عدم آگاهی در مورد لیستریا، ضرورت اجرای برنامه آموزشی و اطلاع رسانی در زمینه ایمنی مواد غذایی را آشکار می کند. علاوه بر آن ضرورت و تدوین و اجباری شدن استاندارد جست و جوی لیستریا در مواد غذایی حساس، لازم به نظر می رسد (۱۰).

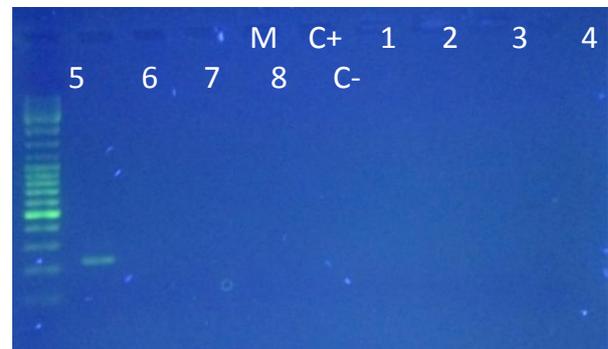
گونه های لیستریا شیوع گسترده ای در محیط دارند. این باکتری به طور معمول توسط مواد غذایی منتقل می شود به همین دلیل شناسایی زود هنگام آن در مواد غذایی در پیش گیری از موارد عفونت نقش یه سزایی دارد. این باکتری توانایی بالایی برای رشد در دامنه وسیعی از شرایط مانند دمای یخچال، PH پایین و غلظت بالای نمک را داراست که آن را قادر می سازد تا در محیط فرآوری غذا و هم چنین در خود غذا به راحتی رشد کند و زنده بماند و همین طور تعداد آن در غذاهای سالم و نگهداری شده به چند برابر برسد و باعث افزایش خطر آلودگی های غذایی شود. توانایی رشد لیستریا مونوسیتوژنز در دمای ۴-۰ درجه سانتی گراد و همین طور مقاومت به فشار اسمزی سبب اهمیت بررسی آن در مواد غذایی می شود (۱۵). این ویژگی منحصر به فرد باعث رشد آن در مواد غذایی نگهداری شده در یخچال می گردد. لیستریا مونوسیتوژنز می تواند باعث آلودگی لبنیات شود و به دلیل گستردگی مصرف این مواد در جوامع مختلف می تواند خطری برای بهداشت عمومی انسان ها به شمار رود. هر چند لیستریا در اثر پاستوریزاسیون از بین می رود، اما احتمال آلودگی پس از فرایند نیز وجود دارد (۱۷). به علت اهمیت لیستریا مونوسیتوژنز شناسایی آن در نمونه های مختلف و با روش های زیادی در سراسر دنیا صورت گرفته است. با توجه به این که در سالیان اخیر نقش این باکتری در ایجاد بیماری ها و عفونت های مختلف و نیز سقط جنین شناخته شده است، کوتاه شدن زمان تشخیص بسیار حائز اهمیت است (۱۴).

شناسایی میکروارگانیسم ها در مواد غذایی توسط کشت روشی زمان بر است به همین دلیل روش های مولکولی در سال های اخیر جایگزین روش های سنتی می گردد. جهت کنترل میکروبی و شناسایی افتراقی میکروارگانیسم ها در مواد غذایی با روش کشت، حداقل ۴ تا ۶ روز وقت لازم است (۲). تکنیک PCR روشی جدیدی برای شناسایی میکروارگانیسم ها ایجاد کرده است. نتایج پژوهش های

ستون ۱: نمونه کنترل مثبت، ستون ۲: تست PCR مثبت با ۱۰۰۰۰۰ ژنوم، ستون ۳: تست PCR مثبت با ۱۰۰۰۰ ژنوم، ستون ۴: تست PCR مثبت با ۱۰۰۰ ژنوم، ستون ۵: تست PCR مثبت با ۱۰۰ ژنوم، ستون ۶: تست PCR مثبت با ۱۰ ژنوم ستون ۷: تست PCR مثبت با ۱ ژنوم، ستون ۸: کنترل منفی

تعیین ویژگی تست PCR:

نتایج نشان دادند که آزمون PCR بهینه شده از اختصاصیت بسیار بالایی برخوردار است، به طوری که فقط با DNA باکتری لیستریا مونوسیتوژنز واکنش نشان داد و با DNA سایر میکروارگانیسم های مورد مطالعه هیچ واکنشی صورت نگرفت. (شکل ۳)



شکل ۳: آزمون PCR برای تعیین ویژگی لیستریا مونوسیتوژنز

M: سایز مارکر DNA ladder Mix (Thermoscientific), C+: کنترل مثبت (۲۲۶ bp) لیستریا مونوسیتوژنز
 ۱: *Staphylococcus aureus*, ۲: *Salmonella spp.*, ۳: *Campylobacter jejuni*
 ۴: *Pseudomonas aeruginosa*, ۵: *Escherichia coli*, ۶: *Brucella abortus*
 ۷: *Vibrio cholerae*, ۸: *Shigella spp.*, C-: کنترل منفی

بحث:

تأمین سلامت غذا در کنار تلاش برای تهیه غذا، اهمیتی دو چندان دارد. به دلایل متعدد، بیماری های منتقله از غذا امروزه در دنیا رو به گسترش است و همه ساله موجب ابتلاء و مرگ و میر تعداد قابل توجهی از مردم می شود (۸، ۱۵). سس های صنعتی به عنوان یک ماده غذایی پرطرفدار روز به روز مصرف بیشتری در بین عامه مردم پیدا کرده اند. سس مایونز را می توان یک امولسیون نیمه جامد حاصل از مخلوط روغن های نباتی خوراکی، زرده تخم مرغ یا تخم مرغ کامل، سرکه یا آبلیمو و سایر افزودنی ها نظیر نمک، ادویجات و گلوکز با توجه به نوع فرآورده تولیدی دانست. این ماده غذایی به دلیل داشتن

شد سپس لیستریا مونسایتوزنز توسط روش‌های بیوشیمیایی و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز مورد شناسایی و تأیید قرار گرفت و از ۹۱ نمونه شیر خام جمع آوری شده، ۵ نمونه آلوده به لیستریا بودند. نتایج این پژوهش نشان دهنده مزیت‌های روش PCR نسبت به روش‌های دیگر برای شناسایی می‌باشد.

نتیجه‌گیری:

در این مطالعه با استفاده از روش مولکولی PCR مشخص گردید که تعداد اندکی از نمونه‌های سس، حاوی مقادیر کمی از DNA باکتری لیستریا مونسایتوزنز است. در نتیجه روش مولکولی مورد استفاده در این مطالعه روش مناسب برای شناسایی میکروارگانیسم‌ها است که با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه، پیشنهاد می‌گردد که بدون نیاز به انجام کشت از روش PCR برای شناسایی لیستریا مونسایتوزنز در نمونه‌هایی مانند سس استفاده شود. همچنین به دلیل مصرف بالای غذاهای فست فودی و در پی آن مصرف بالای سس توسط جامعه امروزی، نظارت دقیق بر مراحل تولید، حمل و نقل و توزیع آن با هدف کاهش آلودگی باکتریایی ضروری به نظر می‌رسد.

سپاسگزاری:

بدین وسیله از موسسه دانش بنیان ایرانیان ژن فناوری (IGF) و پرسنل آن به خصوص خانم مهسا ملک محمدی، که امکانات علمی و آزمایشگاهی این پروژه را فراهم نمودند، تشکر و قدردانی می‌شود.

مختلف نشان می‌دهد که تکنیک PCR کفایت و حساسیت لازم را به منظور پایش میکروارگانیسم‌ها دارد. از این رو استفاده از این روش برای ارزیابی میکروارگانیسم‌ها در مواد غذایی پیشنهاد می‌شود. اگرچه روش‌های کشت به عنوان روش استاندارد برای ردیابی میکروارگانیسم‌ها در مواد غذایی مطرح است اما این روش‌ها به مدت زمان زیادی نیاز دارد و عوامل انسانی و مواد و تجهیزات سبب خطای قابل توجهی در نتایج حاصله از آن می‌گردد لذا پیشنهاد می‌شود از تکنیک PCR در شناسایی عوامل میکروبی و عفونی استفاده گردد (۵).

مطالعه‌های PCR بر روی لیستریا مونسایتوزنز در دهه ۹۰ آغاز شد. در سال ۱۹۹۶ جی بیکلی برای شناسایی لیستریا مونسایتوزنز از ژن تولید کننده لیستریولیزین استفاده کردند. علی نجفی و همکارانش در سال ۱۳۸۸ به بررسی تشخیص سریع مولکولی لیستریا مونسایتوزنز به روش PCR با استفاده از ژن hlyA پرداختند. در این مطالعه از ژن hly A برای شناسایی لیستریا مونسایتوزنز استفاده کردند، و در نهایت، نتایج این مطالعه نشان داد که روش PCR به کار رفته در این مطالعه از سرعت، اختصاصیت و حساسیت لازم برخوردار است (۲). نتایج این مطالعه حاکی از مزیت‌های روش PCR است.

امیر شاکریان و همکارانش به بررسی لیستریا مونسایتوزنز به عنوان یک عامل بالقوه بیماریزا در گوشت طیور پرداختند. در این تحقیق تعداد ۱۰۰ نمونه گوشت مرغ و ۱۰۰ نمونه گوشت ماهی از فروشگاه‌های عرضه مرغ ماهی در شهر کرد اخذ گردید. این نمونه در محیط غنی کننده لیستریا به مدت ۴۸ ساعت غنی شده و سپس بر روی محیط انتخابی لیستریا کشت داده شد. در پایان از ۱۰۰ نمونه مرغ، ۵ نمونه آلوده به این باکتری شناخته شد و از ۱۰۰ نمونه ماهی این باکتری جدا نگردید. در مطالعه حاضر با استفاده از روش PCR، شناسایی در مدت زمان کم‌تر (حدود ۴ ساعت) صورت می‌گیرد که این نشان از کارآمد بودن این روش در مقایسه با روش‌های دیگر است. در سال ۱۳۹۱ احسان شاملوآقاخانی و همکارانش به بررسی شیوع گونه‌های لیستریا در شیر خام عرضه شده در سطح شهر اصفهان پرداختند. در این مطالعه جداسازی توسط روش پیشنهادی سازمان کشاورزی آمریکا انجام

منابع:

۱. پورنجف، ا. لطف الهی، لیدا، ایراجیان، غ. اردبیلی، ع. صادقی کلانی، ب. تقی زاده ارمکی، م. (۱۳۹۲). تعیین فراوانی سویه های لیستریا منوسایتوژنز در نمونه های بالینی و غیر بالینی به روش فنوتیپی و تایید آن با روش PCR. مجله میکروب شناسی پزشکی ایران. سال ۷: شماره ۲.
۲. دکتر سلمان زاده اهرایی، س. دکتر زالی، م. دکتر رضایی حمامی، م. شناسایی لیستریا منوسایتوژنز در شیر توسط واکنش زنجیره ای پلی مراز، ۱۳۸۳، دانشگاه علوم پزشکی، شماره ۳، صفحات ۲۱۵ تا ۲۱۸.
۳. شاملو آقا خانی، ا. دکتر جلالی، م. دکتر میرلوحی، م. عبدی مقدم، ز. شیوع گونه های لیستریا د شیرام عرضه شده در سطح شهر اصفهان. سال ۱۳۹۱. مجله دانشگاه پزشکی اصفهان. شماره ۲-.
۴. شاه حسینی، محمد حسن. ۱۳۸۹. مبانی تشخیص مولکولی. تهران: دانشگاه آزاد شهر قدس.
۵. شاه حسینی، محمد حسن. (۱۳۸۹). واکنش زنجیره ای پلی مراز. تهران: دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر قدس.
۶. حسینی، م. مهر ۱۳۹۱. مقایسه دو روش MPN-PCR و MPN-cultur در تعیین تعداد باکتری لیستریا منوسایتوژنز در شیر. دانشکده دامپزشکی.
۷. مقصودی، ص. دوستی، ع. نیری، ه. چهلگردی، م. بررسی فراوانی ژن *ctpA* در باکتری های لیستریا منوسایتوژنز جدا شده از طیور به روش PCR. سال ۱۳۹۲. مجله دنیای میکروب. سال ششم. شماره چهارم. صفحات ۳۱۹-۳۱۲.
۸. مومنی، ح. شریف زاده، ع. بشیری، م. مطالعه فراوانی ژن حدت *hly A* باکتری لیستریا منوسایتوژنز در سبزیجات تازه با استفاده از واکنش زنجیره ای پلی مراز. سال ۱۳۹۳. مجله میکروب شناسی مواد غذایی. شماره ۳. صفحات ۵ تا ۱۵.
۹. نوروزی، ج. مرادی بیدهندی، س. شفیع، م. ارزیابی ژن *actA* در لیستریا منوسایتوژنز جدا شده از لبنیات. سال ۱۳۹۲. مجله دنیای میکروب ها. شماره ۳. صفحات ۲۴۶ تا ۲۵۳.
۱۰. نجفی، ع. قربانعلی زادگان، م. توکلی، ح. احمدی، ع. تشخیص سریع مولکولی لیستریا منوسایتوژنز به روش PCR با استفاده از ژن *hly A*. سال ۱۳۸۸. مجله میکروب شناسی پزشکی ایران. شماره ۳ و ۲. صفحات ۱۴ تا ۹.

11. Bassam, B. J. (1993). Automated "hot start" PCR using mineral oil and paraffin wax. *Biotechniques*, 14(1), 30-34.
12. Bell, C. and A. Kyriakides, *Listeria: a practical approach to the organism and its control in foods*. 2012: Springer Science & Business Media.
13. Bickley, J., et al., Polymerase chain reaction (PCR) detection of *Listeria monocytogenes* in diluted milk and reversal of PCR inhibition caused by calcium ions. *Letters in Applied Microbiology*, 1996. 22(2): p. 153-158.
14. Churchill, R.L., H. Lee, and J.C. Hall, Detection of *Listeria monocytogenes* and the toxin listeriolysin O in food. *Journal of Microbiological Methods*, 2006. 64(2): p. 141-170.
15. Kuhn, M. and W. Goebel, Identification of an extracellular protein of *Listeria monocytogenes* possibly involved in intracellular uptake by mammalian cells. *Infection and immunity*, 1989. 57(1): p. 55-61.
16. Levinson, W. and E. Jawetz, *Mycobacteria*. IN: *Medical Microbiology and Immunology. Examination and Board Review 5th edition*, New York, Lous Medical Books, 2010. 200: p. 157.
17. Vázquez-Boland, J.A., et al., *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical microbiology reviews*, 2001. 14(3): p. 584-640.
18. Ye, K., et al., Rapid detection of viable *Listeria monocytogenes* in chilled pork by real-time reverse-transcriptase PCR. *Food Control*, 2012. 25(1): p. 117-124.

