مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی
دوره هفتم، شماره بیست و هفتم- تابستان ۱۳۹۶

Research Article
مقاله تحقیقی

تشخیص سریع مولکولی لیستریامنوسایتوژنزدر 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 بیماری‌زای قابل انتقال از طریق مواد غـذایی و مسـئول ایجاد بیماری در انسان شناخته شده است. این باکتری عامل مننژیت، سقط جنین و مسمومیت غذایی در انسان اسـت. سـس-های صنعتی به عنوان یک ماده غذایی پرطرفدار روز به روز مصرف بیش‌تری در بین عامه مردم پیدا کرده‌اند. این مـاده غـذایی، بستر مناسبی برای ایجاد مسمومیت‌های غذایی می باشد. بنابراین آلودگی با لیستریامونوسیتوژنز تهدیدی بـرای سـلامتی بـه ویژه افراد با سرکوب سیستم ایمنی محسوب می گردد. هدف از این مطالعه تشخیص سریع مولکـولی لیستریامونوسـایتوژنز در سس‌های صنعتی سرد ایران است.

مواد و روش‌ها : تعداد ۲۵ نمونه از سس‌هـای صـنعتی از بـازار ایـران جمـع آوری گردیـد. DNA نمونـه هـا بـه 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 نمونه‌ها از جهت حضور لیستریامونوسایتوژنز با استفاده از تسـت بهینـه PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند.

یافتـــه‌هـــا : تسـت PCR بهینـه و محصـول bp ۲۲۶ در ژل آگـاروز ۲٪ مشـاهده شـد. LOD تسـت در حـد ۱۰ enome/reaction به‌دست آمد و در آزمون ویژگی به غیر از لیستریا مونوسایتوژنز با هیچ نمونه‌ای آمپلیکون مشاهده نگردیـد. از ۲۵ نمونه سس، ۴ عدد از نظر لیستریامونوسایتوژنز مثبت گردید.

نتیجه‌گیری: تکنیک PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، بسیار دقیق و سریع‌تر نسبت بـه متـدهای سـنتی بـرای تشخیص لیستریا مونوسایتوژنز عمل می‌نماید. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که تکنیک PCR روشی مناسـب جهـت پـایش میکروارگانیسم‌ها در مواد غذایی هم‌چون سس‌ها می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: سس ، مسمومیت، لیستریامونوسایتوژنز ، تشخیص

مقدمه :

تأمین سلامت غذا در کنار تلاش برای تهیه غـذا، اهمیتـی دو چندان دارد. به دلایل متعدد، بیمـاری‌هـای منتقلـه از غذا امروزه در دنیا رو به گسترش است و همه ساله موجب ابتلاء و مرگ و میر تعداد قابل توجهی از مـردم مـی‌شـود.

نویسنده مسئول:
دانشگاه آزاد اسلامی ، واحد علوم تحقیقات ، تهران ، ایران
پست الکترونیکی:ati.shahhosseiny@gmail.com
تاریخ دریافت: ۲/۸/۱۳۹۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۱/۲۷

لیستریوزیس بیماری مشترک انسـان و حیـوان اسـت کـه عامل آن *لیستریا مونوسیتوژنز* است. علت نام‌گـذاری ایـن باکتری ازدیاد تعداد منوسیت‌ها در حیوانـات آزمایشـگاهی است (۹). *لیستریا مونوسیتوژنز* می‌تواند عامل عفونـت در انسان باشد. این باکتری از معـدود میکروارگانیسـم هـایی است که می‌تواند از جفت عبور کرده و آثـار سـوء ازجملـه تولد زودرس نوزاد با عفونت سیسـتمی ایجـاد کنـد. هـم-چنین باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* در زنان حامله مـی-تواند به سقط جنین نیز منجر شود. این میکروارگانیسم از راه مواد غذایی منتقل می‌شود (۱۶).

جداسازی *لیستریا مونوسیتوژنز* از موادغذایی با روش کشت و شناسایی آن با روش‌های بیوشیمیایی نیازمند ۷-۸ روز زمان می‌باشد. از این رو وجود روش‌های سریع و کاربردی برای شناسایی این باکتری در مواد غذایی نیازی ضروری است (۱۲). زمان نقش بسیار عمده‌ای در تشخیص آلودگی دارد، چرا که با مشخص شدن آلودگی می‌توان در جهت از بین بردن آن و جلوگیری از سرایت آن به نمونه‌های دیگر و اپیدمی شدن آن تلاش کرد. پس هر چه زمان تشخیص کم‌تر باشد احتمال موفقیت در مبارزه با آلودگی بالا می‌رود. در تستهای PCR زمان تشخیص بین ۱ تا ۴ ساعت می‌باشد (۴). در حال حاضرمتداول‌ترین روش تشخیص *لیستریا مونوسیتوژنز* کشت می‌باشد. ولی به دلیل وقت‌گیر بودن، راندمان پایین (به دلیل تعداد کم باکتری) و مشکل در تشخیص افتراقی از سایر باکتری‌ها اقتضا می‌نماید که مکانیسم تشخیصی دیگری مورد پژوهش و ارزیابی قرار گیرد (۳). برای غلبه بر محدودیت‌های موجود در تست‌های تشخیص سنتی، روش‌های بر پایه DNA (DNA-based)، برای تشخیص گونه های مختلف میکروبی بیماری‌زا گسترش و توسعه یافته‌اند. یکی از این روش‌های تشخیص مولکولی، استفاده از تکنیک PCR می‌باشد (۱).

سس مایونز را می‌توان یک امولسیون نیمه جامد حاصل از مخلوط روغن‌های نباتی خوراکی، زرده تخم مرغ یا تخم مرغ کامل، سرکه یا آبلیمو و سایر افزودنی‌ها 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 می‌کند. سس‌های 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 مسمومیت‌های غذایی می‌باشد. سس-های سالاد از نظر ترکیب‌هایی کامل شبیه مایونز هستند. با این تفاوت که محصول نهایی حاوی حداقل ۳۰ درصد روغن خوراکی می‌باشد. به علاوه اسید استیک، اسید عمده آن، ۱/۲- ۰/۹ درصد از کل محصول را تشکیل می‌دهد به طوری که PH بین ۳/۲ تا ۳/۹ می‌باشد. به طور وسیع از صمغ‌ها جهت پایداری وتغییر ویژگی های رئولوژیک در سس‌ها استفاده می‌کنند. باکتری در غذاهایی که سس مایونز با خوراکی‌هایی از قبیل پاستا، سیب زمینی، تخم مرغ، جوجه و یا تن ماهی مخلوط می‌شود، بیش‌تر رشد می‌کند. سس‌ها انواع گوناگونی دارند مانند: سس گوجه فرنگی (کچاب)، سس چیلی، سس خردل، سس مایونز (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 مونوسایتوژنز* جداسازی شده از لبنیات پرداختند. این پژوهش به منظور بررسی حضور ژن atc A در گونه‌های لیستریای جداسازی شده، و با روش PCR و به صورت مقطعی – توصیفی بر روی ۷۰ نمونه انجام شد و در مجموع ۱۰ مورد آلودگی *لیستریامونوسایتوژنز* مشاهده گردید. در تمامی نمونه‌های مثبت مورد بررسی، ژن atc A به صورت ۱۰۰ ٪ مشاهده گردید. امیر شاکریان به بررسی *لیستریا مونوسایتوژنز* به عنوان یک عامل بالقوه بیماری‌زا در گوشت طیور پرداخت (۱۱). در این پژوهش تعداد ۱۰۰نمونه گوشت ماهی و ۱۰۰ نمونه گوشت مرغ جمع آوری شد . این نمونه‌ها در محیط لیستریا به مدت ۴۸ ساعت غنی شده وسپس بر روی محیط‌های کشت اختصاصی لیستریا کشت داده شد و پرگنه‌های مشکوک به لیستریا شناسایی گردید. در این مطالعه، ۵ نمونه آلوده به باکتری شناخته شد واز۱۰۰ نمونه گوشت ماهی هیچ نمونه‌ای مثبت نگردید. در سال ۱۳۹۲ گیتا اسلامی و همکارانش به بررسی جداسازی و تشخیص ژن های inB ، prfA ، atcA ، *لیستریامونو سایتوژنز* در بانوان مبتلا به سقط جنین مراجعه کننده به مرکز درمانی دانشگاهی به روش PCR پرداختند. در این مطالعه سوآب‌های 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 ژن‌های ویرولانس مونوسایتوژنز به نام-های inlB ، act A ، prf A با تکنینک PCR انجام شد و در نهایت *لیستریا مونوسایتوژنز* در خانم‌های دچار سقط جنین، ۱۲/۵ ٪ مشاهده گردید.

احسان شاملو آقاخانی و همکارانش در سال ۱۳۹۱ به بررسی شیوع گونه‌های 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

۴ نمونه آن مربوط به لیستریامونوسایتوژنز بود. هدف از این مطالعه بررسی *لیستریا منوسایتوژنز* و تشخیص سریع مولکولی آن در سس‌های صنعتی سرد ایران است .

مواد و روش‌ها :

تهیه سوش و استخراج DNA :

سویه استاندارد *لیستریا مونوسایتوژنز 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 bp ۲۲۶ برای *L.monocytogenes* تکثیر می‌گردد (۷). بررسی نرم افزاری این پرایمر در nblast ، نشان داد که سکانس‌های انتخاب شده برای شناسایی *لیستریا مونوسیتوژنز* مناسب می‌باشند. (جدول شماره ۱).

جهت بهینه کردن تکنیک PCR، غلظت وحجم مناسب اجزای مورد نیاز این متد، خصوصا غلظت پرایمرها- dNTP –آنزیم، بررسی و ارزیابی شد که در نهایت مقادیر مورد نیاز در یک تست PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر به‌دست آمد. مقدار واکنش‌گرها در تست تشخیص مولکولی PCR عبارت بودند از: آب دوبار تقطیر ۱۴ میکرولیتر، ۲/۵ میکرولیتر 10X PCR Buffer، ۰/۷۵میکرولیتر $MgCl_2$ (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 درجه‌ای، جهت تکثیر تارگت ژن 16SrRNA، بهینه گردید . دمای مرحله annealing برای تارگت ژن 16SrRNA، ۶۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه به‌دست آمد.

جدول ۱: مشخصه‌های پرایمرهای مورد استفاده در تست تشخیص PCR

نام آغازگر	توالی آغازگر	طول قطعه تکثیری	ژن هدف
Flmono226	5`-TGTTAATGAACCTACAGGACCTTC-3`	226 bp	*16SrRNA*
Rlmono226	5`-TAGTTCTACATCACCTGAGACAGA-3`		

بررسی محصول PCR

جهت آشکارسازی محصول PCR یا آمپلیکون، روش متداول و سریع الکتروفورز ژل آگارز و رنگ‌آمیزی 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) کلون گردید. کلونینگ شامل ۳ مرحله می‌شود. چسباندن محصول PCR به پلازمید یا وکتور PTZ57R (لایگیشن)، و سپس وارد کردن پلازمیدهای نوترکیب به میزبان *Ecoli* JM107 (ترانسفورماسیون)، و در نهایت مرحله سوم که انتخاب کلون‌هاست که از طریق غربال‌گری سفید و آبی توسط XGAL و IPTG صورت گرفت.

تعیین حد تشخیص (LOD) تستPCR :

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، رقت‌های مختلف تهیه کرده و آزمون PCR در کنار کنترل مثبت و منفی بر روی آن‌ها گذاشته شد.

تعیین ویژگی (Specificity) تست PCR:

برای تأئید ویژگی آزمون PCR، از DNA های *استافیلوکوکوس اورئوس، کمپیلوباکترججونی، سودوموناس آئروجیوزا ، اشرشیاکلی، بروسلا آبورتوس ، ویبریوکلرا، Salmonella spp و Shigella spp* به همراه نمونه‌های کنترل مثبت و منفی استفاده شد.

جمع آوری نمونه

تعداد ۲۵ نمونه سس با برندهای مختلف از فروشگاه‌ها و خرده فروشی‌ها جمع آوری و در دمای مناسب به آزمایشگاه منتقل گردید. استخراج DNA از نمونه های جمع آوری شده با استفاده از روش استاندارد فنل/ کلروفرم صورت گرفت.

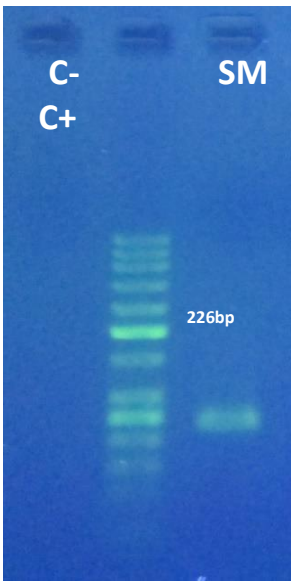
روش استخراج DNA از سس:

ابتدا در یک لوله فالکون سس و آب مقطر را مخلوط نموده تا سس رقیق شود. دو عدد لوله فالکون را برداشته و ۲۵۰ ماکرولیتر از سس رقیق شده و ۲۵۰ ماکرولیتر 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 ماکرولیتر 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 ماکرولیتر 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.

یافته ها

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 50 bp DNA Ladder (cot.No.SM0371) بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ مورد ارزیابی قرار گرفت. در الکتروفورز محصول PCR، باند اختصاصی حاصل از آمپلیکون مورد نظر(۲۲۶جفت باز) قابل رویت بود (شکل ۱).



شکل ۱: آزمون بهینه شده PCR برای پرایمرهای تشخیص *لیستریا مونوسایتوژنز*

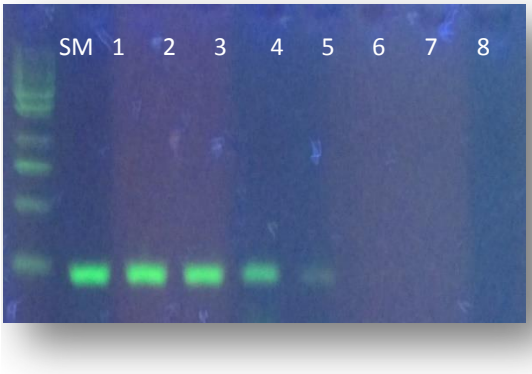
ستون +C: محصول PCR با اندازه ۲۲۶ جفت باز برای *لیستریا مونوسایتوژنز PTCC1163*

M: سایز مارکر (Thermo scientific) 50 bp DNA Ladder

ستون -C: کنترل منفی

تعیین حد تشخیص (LOD) تست PCR:

تست حساسیت PCR با تهیه رقت های متوالی از DNA *لیستریا مونوسیتوژنز* با استفاده از پرایمر *16SrRNA* انجام گرفت که نتایج حساسیت تست PCR نشان داد که با وجود ۱۰۰ کپی ازDNA ، تکثیر انجام می‌گیرد و در تیترهای کمتر از۱۰۰ کپی از DNA ، باندی مشاهده نشد که نشان از حساسیت بالای تست می‌باشد (شکل ۲).



شکل ۲: تعیین حد تشخیص آزمون PCR برای شناسایی *لیستریا مونوسایتوژنز*

SM: سایز مارکر (Thermo scientific) 1Kb DNA Ladder Cot.No.:SM1331)

ستون۱: نمونه کنترل مثبت، ستون۲: تست PCR مثبت با ۱۰۰۰۰۰ ژنوم، ستون۳: تست PCR مثبت با ۱۰۰۰۰ ژنوم، ستون۴: تست PCR مثبت با ۱۰۰۰ ژنوم، ستون۵: تست PCR مثبت با ۱۰۰ ژنوم، ستون۶: تست PCR مثبت با ۱۰ ژنوم ستون۷: تست PCR مثبت با ۱ ژنوم، ستون۸: کنترل منفی

تعیین ویژگی تست PCR :

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

شکل ۳: آزمون PCR برای تعیین ویژگی *لیستریا مونوسایتوژنز*
M: سایز مارکر DNA ladder Mix (Thermoscientific) ، C+: کنترل مثبت (۲۲۶ bp) *لیستریا مونوسایتوژنز*
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، بیماری‌های منتقله از غذا امروزه در دنیا رو به گسترش است و همه ساله موجب ابتلاء و مرگ و میر تعداد قابل توجهی از مردم می‌شود(۸،۱۵). سس‌های صنعتی به عنوان یک ماده غذایی پرطرفدار روز به روز مصرف بیش‌تری در بین عامه مردم پیدا کرده‌اند. سس مایونز را می‌توان یک امولسیون نیمه جامد حاصل از مخلوط روغن‌های 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 فراورده تولیدی دانست. این ماده غذایی به دلیل داشتن بستر مناسب، شرایط را برای رشد باکتری ها فراهم می‌کند که در نهایت رشد آنها باعث به خطر انداختن سلامت مصرف کننده می‌شود . عدم آگاهی در مورد لیستریا ، ضرورت اجرای برنامه آموزشی و اطلاع‌رسانی در زمینه ایمنی مواد غذایی را آشکار می‌کند. علاوه بر آن ضرورت و تدوین و اجباری شدن استاندارد جست و جوی لیستریا در مواد غذایی حساس، لازم به نظر می‌رسد (۱۰).

گونه‌های لیستریا شیوع گسترده‌ای در محیط دارند. این باکتری به طور معمول توسط موادغذایی منتقل می‌شود به همین دلیل شناسایی زود هنگام آن در مواد غذایی در پیش‌گیری از موارد عفونت نقش به 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 می‌سازد تا در محیط فرآوری غذا و هم‌چنین در خود غذا به راحتی رشد کند و زنده بماند و همین‌طور تعداد آن در غذاهای سالم و نگهداری شده به چند برابر برسد و باعث افزایش خطر آلودگی های غذایی شود. توانایی رشد *لیستریا مونوسایتوژنز* در دمای ۴-۰ درجه سانتی‌گراد و همین‌طور مقاومت به فشار اسمزی سبب اهمیت بررسی آن در مواد غذایی می‌شود (۱۵). این ویژگی منحصر به فرد باعث رشد آن در موادغذایی نگهداری شده در یخچال می‌گردد. *لسیتریا مونوسیتوژنز* می‌تواند باعث آلودگی لبنیات شود و به دلیل گستردگی مصرف این مواد در جوامع مختلف می‌تواند خطری برای بهداشت عمومی انسان‌ها به شمار رود. هرچند *لیستریا* در اثر پاستوریزاسیون از بین می‌رود، اما احتمال آلودگی پس از فرایند نیز وجود دارد (۱۷). به علت اهمیت *لیستریا مونوسیتوژنز* شناسایی آن در نمونه‌های مختلف و با روش‌های زیادی در سراسر دنیا صورت گرفته است. با توجه به این‌که در سالیان اخیر نقش این باکتری در ایجاد بیماری‌ها و عفونت‌های مختلف و نیز سقط جنین شناخته شده است، کوتاه شدن زمان تشخیص بسیار حائز اهمیت است (۱۴).

شناسایی میکروارگانیسم‌ها در مواد غذایی توسط کشت روشی زمان بر است به همین دلیل روش‌های مولکولی در سال‌های اخیر جایگزین روش‌های سنتی می‌گردد .جهت کنترل میکروبی و شناسایی افتراقی میکروارگانیسم‌ها در مواد غذایی با روش کشت، حداقل ۴ تا ۶ روز وقت لازم است (۲). تکنیک PCR روشی جدیدی برای شناسایی میکروارگانیسم‌ها ایجاد کرده است. نتایج پژوهش‌های

مختلف نشان می‌دهد که تکنیک PCR کفایت و حساسیت لازم را به منظور پایش میکروارگانیسم ها 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 مونوسیتوزنز* در دهه ۹۰ آغاز شد. در سال ۱۹۹۶ جی بیکلی برای شناساسیی *لیستریا مونوسایتوژنز* از ژن تولید کننده لیستریولیزین استفاده کردند. علی نجفی و همکارانش در سال ۱۳۸۸ به بررسی تشخیص سریع مولکولی *لیستریامونوسایتوژنز* به روش PCR با استفاده از ژن hlyA پرداختند. در این مطالعه از ژن hly A برای شناسایی *لیستریا مونوسایتوژنز* 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 مونوسایتوژنز* 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 شهرکرد 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 شد سپس *لیستریامونوسایتوژنز* توسط روش‌های بیوشیمیایی و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز مورد شناسایی و تأئید 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 مونوسایتوژنز 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 مونوسایتوژنز* 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:

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

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 پژشکی ایران.سال ۷:شماره۲

۲.دکتر سلمان زاده اهرایی،س . دکتر زالی،م . دکتر رضایی حمامی، م . شناسایی لیستریامونوسایتوژنز 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.سال۱۳۹۱.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.مهر۱۳۹۱.مقایسه دو روش MPN-PCR و MPN-cultur در تعیین تعداد باکتری لیستریامونوسایتوژنز در شیر.دانشکده دامپزشکی.

۷. مقصودی،ص.دوستی،ع.نیری،ه.چهلگردی،م.بررسی فراوانی ژن ctpA در باکتری های لیستریامونوسایتوژنز 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 لیستریامونوسایتوژنز در سبزیجات تازه با استفاده از واکنش زنجیره ای پلی مراز .سال ۱۳۹۳ . مجله میکروب شناسی مواد غذایی. شماره۳.صفحات ۱تا۵ .

۹. نوروزی،ج.مرادی بیدهندی،س.شفیعی،م.ارزیابی ژن actA در لیستریامونوسایتوژنز جدا شده از لبنیات.سال ۱۳۹۲.مجله دنیای میکروب ها. شماره۳.صفحات ۲۴۶تا۲۵۳.

۱۰. نجفی ،ع.قربانعلی زادگان، م . توکلی،ح.احمدی،ع.تشخیص سریع مولکولی لیستریامونوسایتوژنز به روش PCR با استفاده از ژن hly A . سال ۱۳۸۸.مجله میکروب شناسی پزشکی ایران.شماره ۲و۳ . صفحات ۹تا۱۴.

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.