



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی قزوین

طراحی و بهینه سازی روش ردیابی و تشخیص مستقیم

استافیلوکوکوس اورئوس در مواد غذایی با استفاده از روش

SYBR green melting curve Real time PCR

اساتید مشاور :
دکتر رزاق محمودی
دکتر پیمان فجر بیگی

استاد راهنما :
دکتر بابک پاک بین

دانشجو:
مریم ایمانی
دانشجو کارشناسی ارشد بهداشت و ایمنی
مواد غذایی
آبان ۱۴۰۰



بیان مسئله و مقدمه

- ✓ امنیت غذایی عامل نگران کننده ای در سراسر جهان است. بیماری های غذا زادی که توسط پاتوژن ها ایجاد میشوند توجه زیادی را در تحقیقات علمی و صنعت غذا به خود جلب کرده اند.
- ✓ مسمومیت غذایی استافیلوکوکی یکی از شایع ترین بیماری های غذازاد است. این باکتری ها بیشتر در دستگاه تنفسی فوقانی موجودات خون گرم ساکن هستند اما معمولاً در غذا و آب و محیط نیز یافت میشوند.
- ✓ میانگین حضور این باکتری در منابع غذایی ۵/۱۵ درصد و میانگین حضور گونه های انتروتوکسیژنیک آن ۷/۵۳ درصد تا سال ۲۰۱۷ برآورد شده است.



بیان مسئله و مقدمه

- ✓ بسیاری از روش های مرسوم از جمله روش های کشت میکروبی برای شناسایی استافیلوکوکوس اورئوس از معایبی برخوردار هستند.
- ✓ در سال های اخیر روش های مولکولی مانند واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) جهت شناسایی آنها پیشرفت چشمگیری پیدا کرده است.
- ✓ روش Real time PCR به دلیل حساس و اختصاصی بودن آن نسبت به روش کشت میکروبی مرسوم جهت تشخیص سریع پاتوژن های آلوده کننده انواع غذاها مناسب تر است.



جمع بندی و نتیجه گیری بیان مسئله

- ✓ بسیاری از روش های مرسوم جهت شناسایی استافیلوکوکوس اورئوس در مواد غذایی معمولاً زمان بر هستند. بنابر این یک روش غربالگری سریع برای تشخیص این باکتری بسیار کمک کننده است.
- ✓ امروزه روش PCR به عنوان روشی حساس و اختصاصی جهت تشخیص سریع پاتوژن های آلوده کننده انواع غذاها شناخته شده است.
- ✓ Real time PCR به دلیل داشتن ویژگی هایی چون حساسیت و اختصاصیت بالا، داده های قابل تکرار و خطر آلودگی کم، جایگزین مناسبی نسبت به PCR معمولی تبدیل شده است.
- ✓ روش Real time PCR نسبت به روش کشت میکروبی ۱۲ برابر سریعتر و ۴ برابر ارزانتر است.



مقدمه

مروری بر منابع

مواد و روش ها

نتایج و بحث

نتیجه گیری

پیشنهادات

اهداف پژوهش

هدف کلی

طراحی و بهینه سازی روش ردیابی و تشخیص مستقیم استافیلوکوکوس اورئوس
در مواد غذایی با استفاده از روش SYBR green melting curve real time PCR



مقدمه

مروری بر منابع

مواد و روش ها

نتایج و بحث

نتیجه گیری

پیشنهادات

اهداف پژوهش

اهداف فرعی

✓ تعیین مقدار حساسیت در روش Real-time PCR در تشخیص استافیلوکوکوس اورئوس در نمونه های غذایی

✓ تعیین مقدار ویژگی در روش Real-time PCR در تشخیص استافیلوکوکوس اورئوس در نمونه های غذایی

✓ تعیین مقدار تکرارپذیری در روش Real-time PCR در استافیلوکوکوس اورئوس در نمونه های غذایی



مقدمه

مروری بر منابع

مواد و روش ها

نتایج و بحث

نتیجه گیری

پیشنهادات

اهداف پژوهش

اهداف کاربردی

ارائه روشی با ویژگی، تکرارپذیری و حساسیت بالاتر و به نسبت ارزانتر جهت تشخیص و ردیابی استافیلوکوکوس اورئوس در نمونه های مواد غذایی که میتواند جایگزین سایر روش های مولکولی و کلاسیک موجود در تشخیص پاتوژن مذکور باشد.





مقدمه

مروری بر منابع

مواد و روش ها

نتایج و بحث

نتیجه گیری

پیشنهادات

فرضیات پژوهش

- ✓ مقدار حساسیت در روش Real-time PCR در تشخیص استافیلوکوکوس اورئوس بین نمونه های غذایی متفاوت است.
- ✓ مقدار ویژگی در روش Real-time PCR در تشخیص استافیلوکوکوس اورئوس بین نمونه های غذایی متفاوت است.
- ✓ مقدار تکرارپذیری در روش Real-time PCR در تشخیص استافیلوکوکوس اورئوس بین نمونه های غذایی متفاوت است.



طراحی و بهینه سازی روش ردیابی و تشخیص مستقیم استافیلوکوکوس اورئوس در مواد غذایی با استفاده از روش SYBR green melting curve real time PCR



مقدمه

سابقه تحقیق

مواد و روش ها

نتایج و بحث

نتیجه گیری

پیشنهادات

مروری بر مطالعات و متون گذشته

| محققین | سال | عنوان | یافته ها |
|-----------------------------------|------|---|---|
| همکاران Moezi parichehr و ۲۰۱۹ | ۲۰۱۹ | توسعه روش M RT-PCR همراه پیش غنی سازی جدید برای تشخیص همزمان چهار باکتری غذازاد در شیر | این روش تکنیکی سریع و قابل اعتماد برای تشخیص یک یا چند پاتوژن در محصولات غذایی است. |
| همکاران Ayda Farhoudi و ۲۰۱۹ | ۲۰۱۹ | مقایسه RT-PCR و کشت میکروبی برای تشخیص بار میکروبی در شیر پاستوریزه | روش کشت مرسوم سخت و زمان بر بوده اما با روش مولکولی میتوان به آسانی بار میکروبی شیر را تحت نظارت قرار داد. |
| همکاران Babak Pakbin و ۲۰۲۱ | ۲۰۲۱ | RAPD و ERIC-PCR جفت شده با HRM برای شناسایی گونه های غیر دیسانتری شیگلا به عنوان روشی جایگزین | RAPD-PCR-HRM روشی با حساسیت و ویژگی بالا (حدوداً ۱۰۰٪ و ۸۵ درصد) برای شناسایی گونه های غیر دیسانتری شیگلا در نمونه های بالینی است . همچنین این روش سریعتر ارزاتر و حساس تر است. |



مقدمه

سابقه تحقیق

مواد و روش ها

نتایج و بحث

نتیجه گیری

پیشنهادات

مروری بر مطالعات و متون گذشته

| محققین | سال | عنوان | یافته ها |
|--------------------------|------|--|---|
| B.G.Botaro و همکاران | ۲۰۱۳ | تشخیص و شمارش استافیلوکوکوس اورئوس از نمونه شیر های گاوی با واکنش RT-PCR | RT-PCR در مقایسه با روش کشت مرسوم روشی سریع با توان و دقت بالا برای تشخیص استافیلوکوکوس اورئوس میتواند باشد. |
| Peiyan He و همکاران | ۲۰۱۶ | کاربرد M RT-PCR تک لوله ای با آنالیز منحنی ذوب جهت تشخیص همزمان پنج نوع پاتوژن در نمونه های غذایی | این روش روشی ساده موثر اختصاصی و حساس جهت تشخیص همزمان پنج باکتری مختلف است. |
| Omnia El-Sayed و همکاران | ۲۰۱۹ | تشخیص و افتراق همزمان چهار پاتوژن عفونی با M SYBR green Rt-PCR در نمونه هایی چون شیر خون مایع جنین | بازده بالا صرفه جویی در زمان مقرون به صرفه بودن این روش میتواند ابزاری مناسب برای تشخیص همزمان سریع و قابل اطمینان عوامل میکروبی در نمونه های مختلف باشد. |



مقدمه

مروری بر منابع

مواد و روش ها

نتایج و بحث

نتیجه گیری

پیشنهادات

مواد و روش کار

✓ نوع مطالعه: تجربی

✓ مکان پژوهش: آزمایشگاه بهداشت و ایمنی مواد غذایی دانشکده بهداشت و آزمایشگاه جامع تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی قزوین

✓ جامعه پژوهش: روش طراحی شده بر پایه PCR

✓ روش نمونه گیری:

در این پژوهش نمونه برداری وجود ندارد. تعداد ۳۶ نمونه غذایی شامل شیر خام سالاد سبزیجات و گوشت چرخ کرده بدون حضور پاتوژن مورد آزمایش، جهت ارزیابی روش تهیه خواهند شد. سپس مطابق روش استاندارد به صورت عمده آلوده می شوند. (بر اساس مطالعه وی و همکاران در سال ۲۰۱۸)



مقدمه

مروری بر منابع

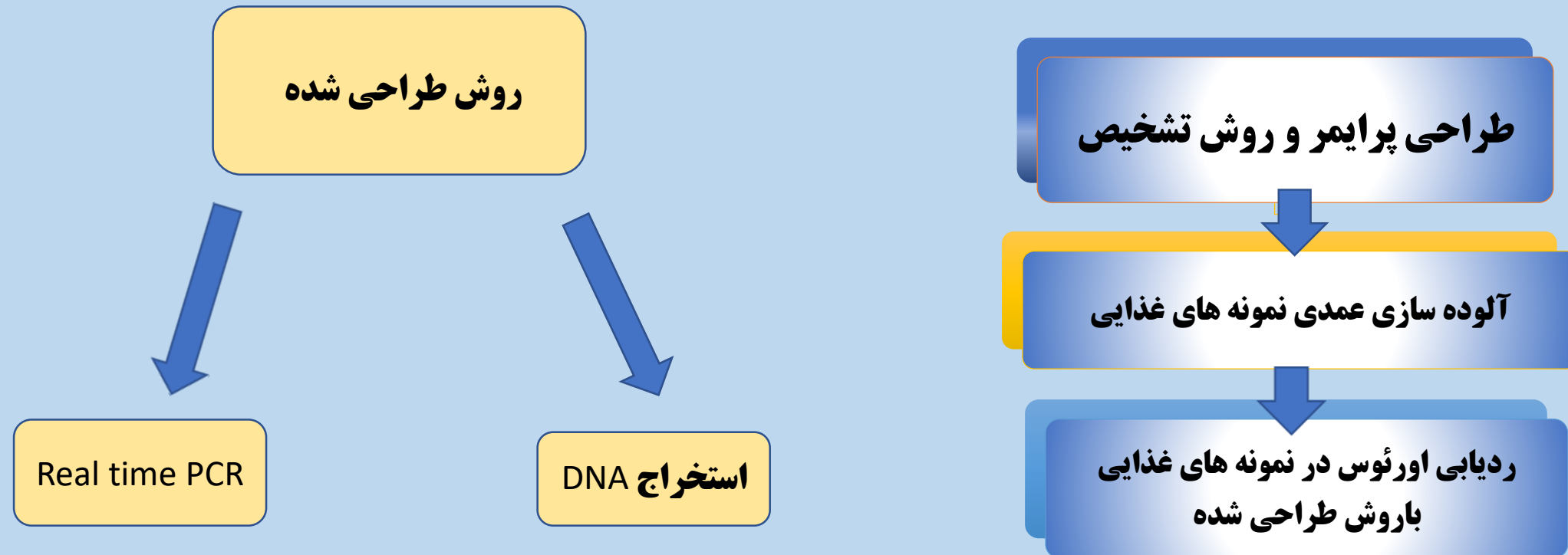
مواد و روش ها

نتایج و بحث

نتیجه گیری

پیشنهادات

مراحل پژوهش





مقدمه

مروری بر منابع

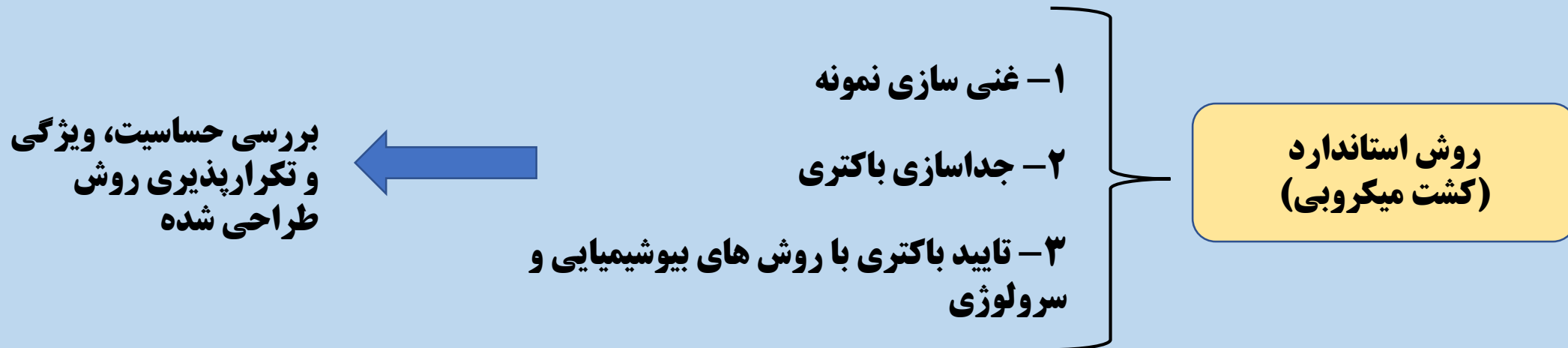
مواد و روش ها

نتایج و بحث

نتیجه گیری

پیشنهادات

مراحل پژوهش





مقدمه

مروری بر منابع

مواد و روش ها

نتایج و بحث

نتیجه گیری

پیشنهادات

مواد و روش کار

روش های اندازه گیری و سنجش متغیر های پژوهش :

✓ داده ها در نرم افزار اکسل ثبت می شود.

✓ تحلیل نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS ورژن ۲۳ انجام خواهد گرفت.

✓ از آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) جهت بررسی اختلاف معنی دار بین متغیر ها (حساسیت ویژگی و تکرارپذیری) استفاده خواهد شد.



مقدمه

مروری بر منابع

مواد و روش ها

نتایج و بحث

نتیجه گیری

پیشنهادات

مواد و روش کار

ملاحظات اخلاقی :

عدم افشای مشخصات مربوط به فروشندگان مواد غذایی مورد استفاده در پژوهش

محدودیت ها :

کمبود منابع مالی مورد نیاز برای افزایش تعداد نمونه‌ها و نبود دستگاه PCR برای روش طراحی شده در دانشکده

- 1- Zhao Y, Zhu A, Tang J, Tang C, Chen J. Identification and measurement of staphylococcal enterotoxin M from *Staphylococcus aureus* isolate associated with staphylococcal food poisoning. *Letters in Applied Microbiology*
- 2- of a Staphylococcal Food Poisoning Outbreak from a Chantilly Cream Dessert, in Umbria (Italy). *Foodborne Pathogens and Disease*.
- 3-Guidi F, Duranti A, Gallina S, Nia Y, Petruzzelli A, Romano A, et al. Characterization of A Staphylococcal Food Poisoning Outbreak in A Workplace Canteen during the Post-Earthquake Reconstruction of Central Italy. *Toxins*. 2018;10(12):523.
- 4-Fusco V, Blaiotta G, Becker K. Chapter 12 - Staphylococcal Food Poisoning. In: Grumezescu AM, Holban AM, editors. *Food Safety and Preservation: Academic Press*; 2018. p. 353-90.
- 5- G. Abril A, G. Villa T, Barros-Velázquez J, Cañas B, Sánchez-Pérez A, Calo-Mata P, et al. *Staphylococcus aureus* Exotoxins and Their Detection in the Dairy Industry and Mastitis. *Toxins*. 2020;12(9).
- 6-NAKANO S, KOBAYASHI T, FUNABIKI K, MATSUMURA A, NAGAO Y, YAMADA T. PCR Detection of *Bacillus* and *Staphylococcus* in Various Foods. *Journal of Food Protection*
- 7-Kim D-H, Chon J-W, Kim H, Kim H-S, Choi D, Hwang D-G, et al. Detection and Enumeration of Lactic Acid Bacteria, Acetic Acid Bacteria and Yeast in Kefir Grain and Milk Using Quantitative Real-Time PCR. *Journal of Food Safety*. 2015;35(1):102-7.

8-He P, Zhu G, Luo J, Wang H, Yan Y, Chen L, et al. Development and Application of a One-Tube Multiplex Real-Time PCR with Melting Curve Analysis for Simultaneous Detection of Five Foodborne Pathogens in Food Samples. *Journal of Food Safety*.

9-El-Sayed O, Hussein A. Multiplex SYBR green real time PCR for the simultaneous detection and differentiation of four important reproductive infectious pathogens. *Journal of Current Veterinary Research*. 2019;1(2):69-77.

10-Azimirad M, Nadalian B, Alavifard H, Negahdar Panirani S, Mahdigholi Vand Bonab S, Azimirad F, et al. Microbiological survey and occurrence of bacterial foodborne pathogens in raw and ready-to-eat green leafy vegetables marketed in Tehran, Iran. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*

11-RAPD and ERIC-PCR coupled with HRM for species identification of non-dysenteriae Shigella species; as a potential alternative method B. Pakbin, A. A. Basti, A. Khanjari, L. Azimi, W. M. Brück and A. Karimi

12- Comparison of real-time PCR and cultural method for detection of bacterial load in pasteurized milk A. Farhoudi, P. Ghajarbeygi, R. A. J. Jozani, R. Mahmoudi and K. Mardani

13-Development of a multiplex real-time PCR for simultaneous detection of *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, and *Staphylococcus aureus* in food samples

S. Wei, E. B.-M. Daliri, R. Chelliah, B.-J. Park, J.-S. Lim, M.-A. Baek, et al.

با تشکر از توجه شما

