



روشهای شناسایی سریع پاتوژنهای غذایی

Rapid Foodborne Pathogen Detection Methods

دکتر سید حمید نوربخش

مدرس دانشگاه آزاد اسلامی

تیرماه ۱۴۰۴



1. معرفی و اهمیت پاتوژن ها
2. انواع روش‌های معمول شناسایی پاتوژن‌ها
3. روش‌های مولکولی
4. روش‌های ایمونولوژیک
5. روش‌های مبتنی بر بیوسنسور
6. روش‌های مبتنی بر شناسایی متابولیت‌ها

فهرست مطالب

پاتوژن‌های غذایی

- پاتوژن‌های غذایی:

پاتوژن‌های غذایی به میکروارگانیسم‌هایی (مانند باکتری‌ها، ویروس‌ها، انگل‌ها و قارچ‌ها) گفته می‌شود که از طریق مواد غذایی آلوده می‌توانند بیماری‌های مختلفی را در انسان ایجاد کنند. این میکروارگانیسم‌ها معمولاً در اثر آلودگی مواد غذایی در مراحل تولید، نگهداری، پخت‌وپز یا سرو غذا وارد زنجیره غذایی می‌شوند.

اهمیت پاتوژن‌های غذایی:

1. سلامت عمومی:

این پاتوژن‌ها عامل اصلی بیماری‌های ناشی از غذا (Foodborne Illnesses) هستند و می‌توانند باعث علائم مختلفی از جمله اسهال، استفراغ، تب، و حتی عوارض جدی‌تری مانند نارسایی کلیه یا مرگ شوند.

2. اثرات اقتصادی:

شیوع بیماری‌های ناشی از پاتوژن‌های غذایی هزینه‌های سنگینی بر سیستم‌های بهداشتی، صنایع غذایی و مصرف‌کنندگان تحمیل می‌کند.

3. امنیت غذایی:

آلودگی به پاتوژن‌ها یکی از تهدیدات اصلی امنیت غذایی است و می‌تواند باعث کاهش اعتماد مصرف‌کنندگان به زنجیره غذایی شود.

4. کنترل و پیشگیری:

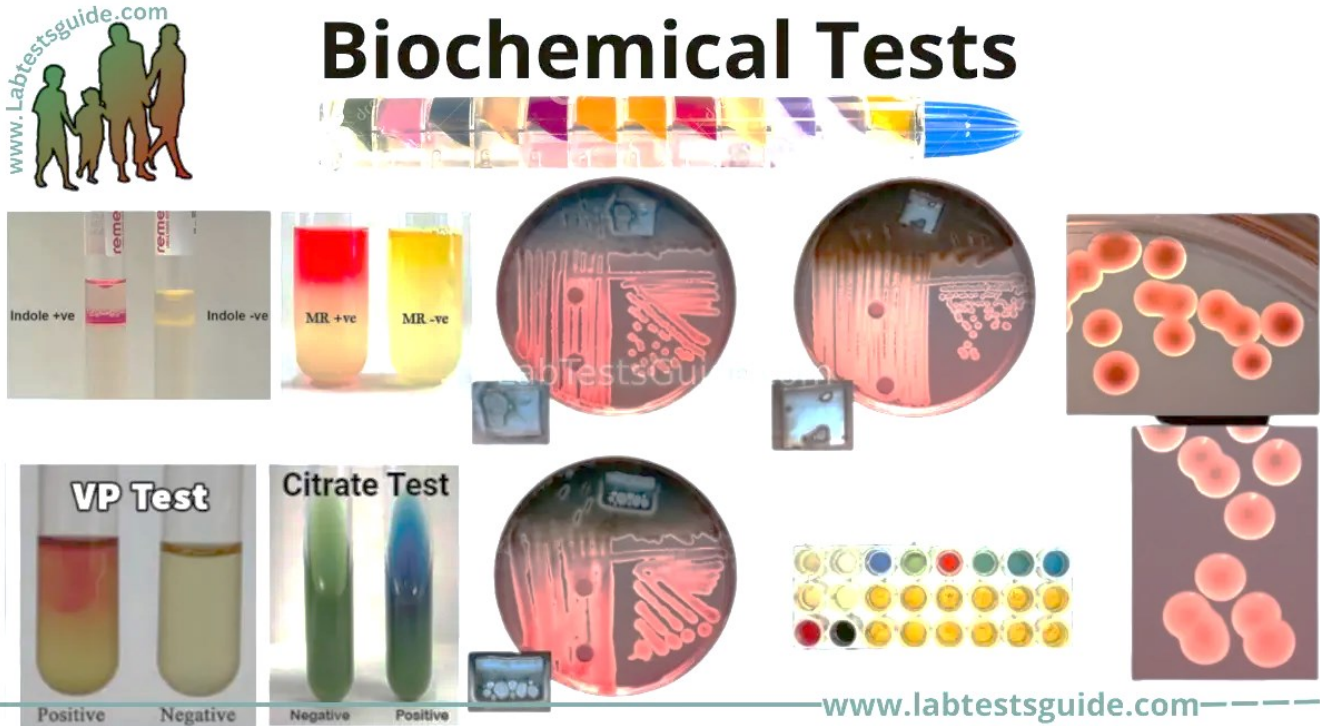
شناسایی و درک رفتار این پاتوژن‌ها نقش کلیدی در پیشگیری از بیماری‌های ناشی از غذا و بهبود کیفیت و ایمنی مواد غذایی دارد.

5. ارتباط با عادات غذایی:

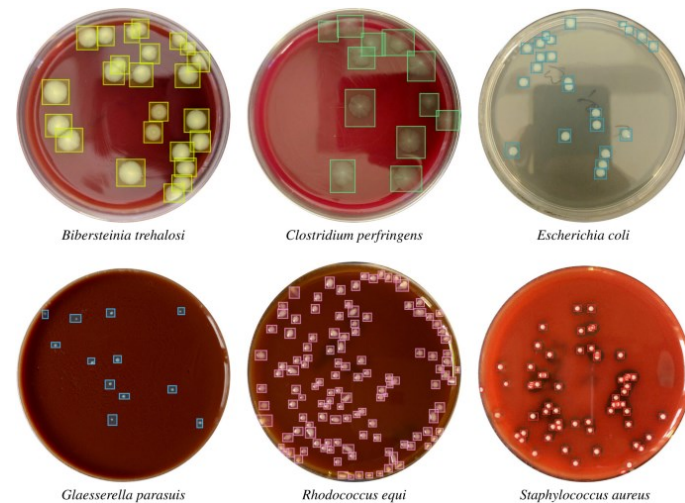
تغییر در سبک زندگی و گرایش به مصرف غذاهای آماده یا نیمه‌پخته، خطر تماس با پاتوژن‌های غذایی را افزایش داده است.

انواع روشهای شناسایی پاتوژن ها

Biochemical Tests

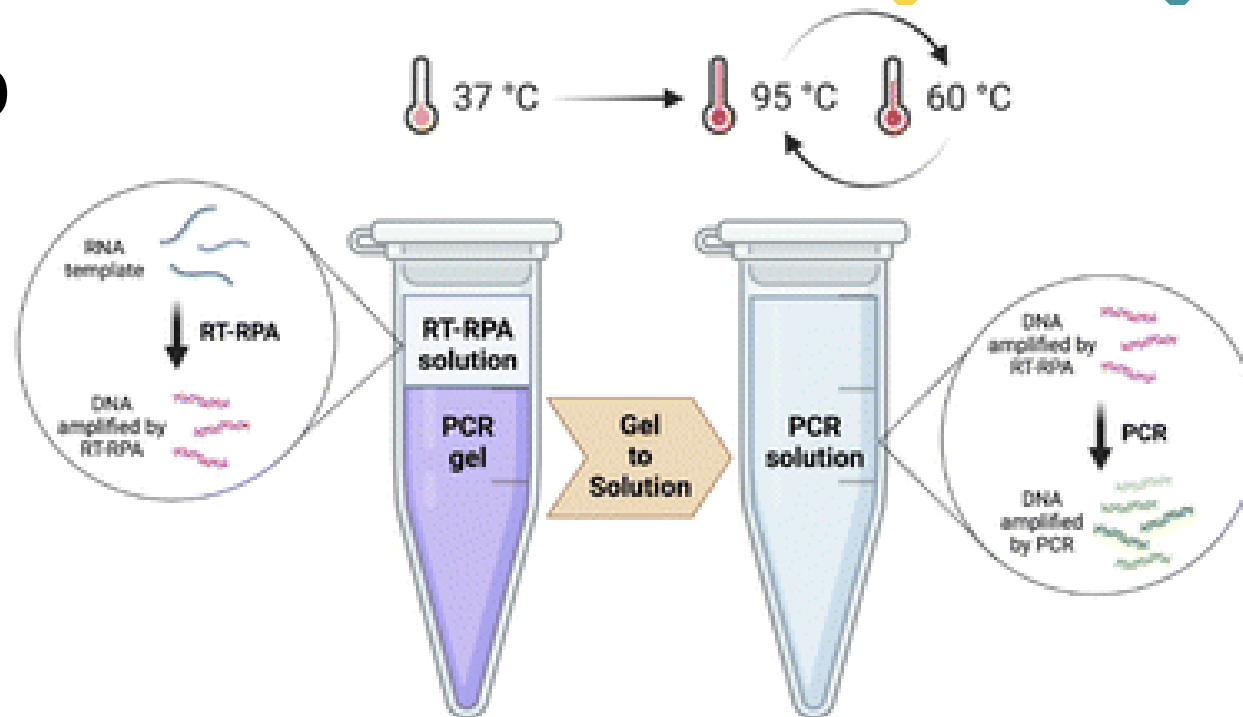


- 1- روش های مبتنی برکشت
- 2- روشهای بیوشیمیایی
- 3- روشهای مولکولی



روش‌های مولکولی

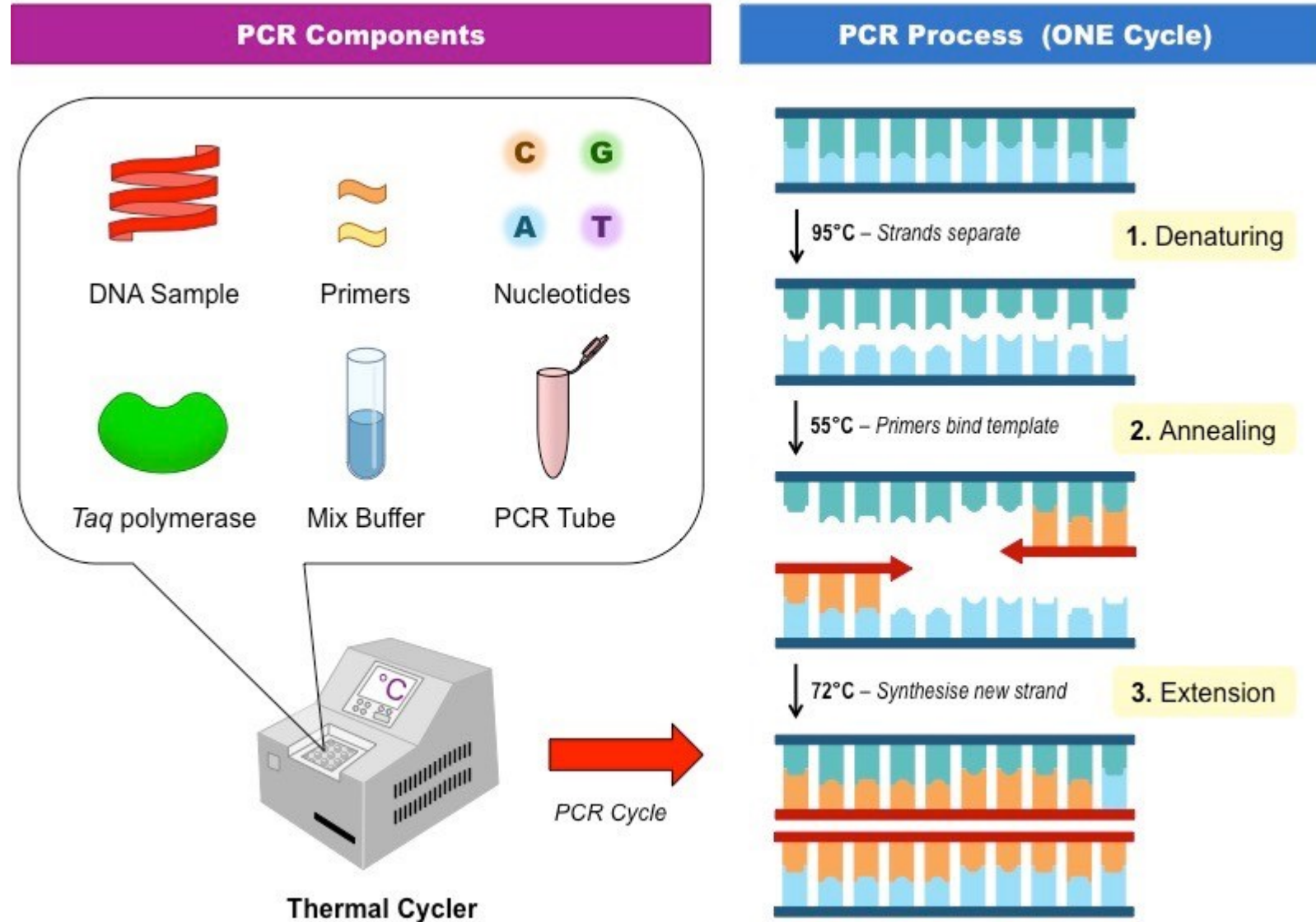
مبتنی بر DNA



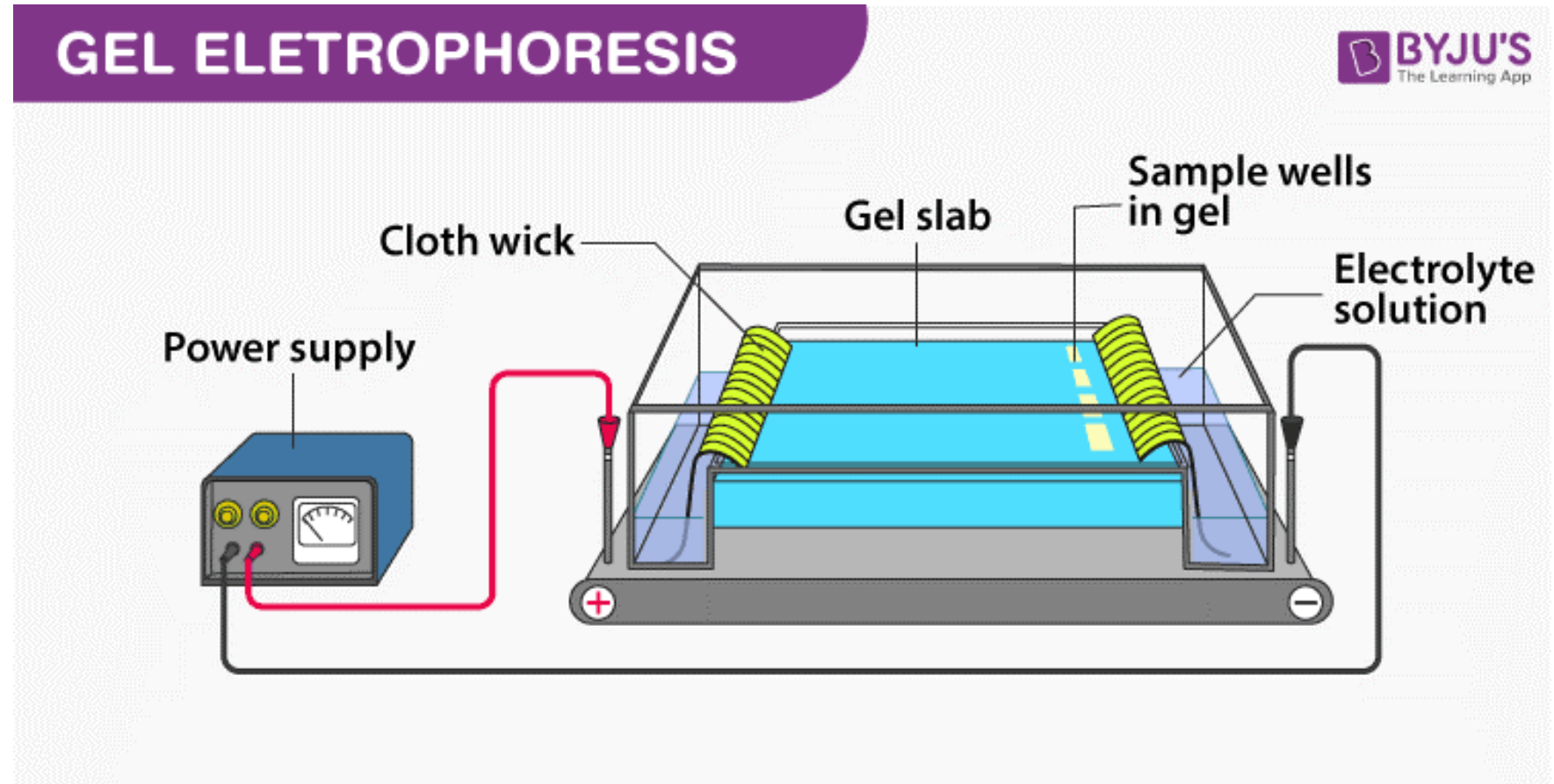
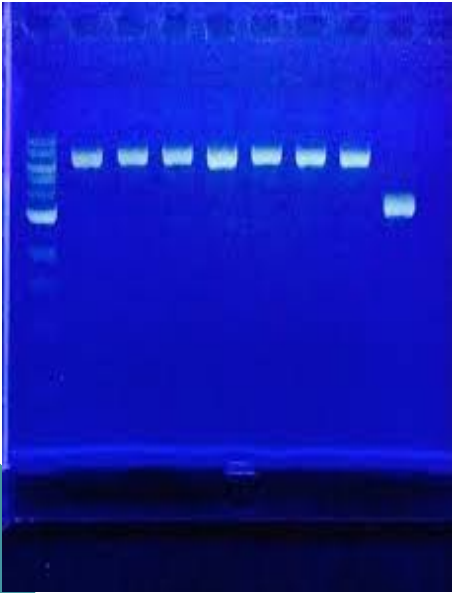
تکثیر DNA برای شناسایی پاتوژن‌ها

- PCR چیست؟
- PCR (Polymerase Chain Reaction) یک تکنیک برای تکثیر درون مکانی بخش‌های خاصی از DNA است.
- این تکنیک اجازه می‌دهد که یک ناحیه خاص از DNA به صورت نمایی افزایش یابد، که این امر شناسایی ژن‌های خاص در نمونه‌ها را ممکن می‌سازد.
- در اصل، این روش یک روش هیبریداسیون دو پروب است که چندین بار تکرار می‌شود.

تکثیر DNA برای شناسایی پاتوژن‌ها



تکثیر DNA برای شناسایی پاتوژن‌ها



تکثیر DNA برای شناسایی پاتوژن‌ها

اجزای کلیدی:

- DNA template: نمونه‌ای که شامل DNA پاتوژن است
- Specific primers: توالی‌های کوتاه DNA که اطراف ناحیه هدف را احاطه می‌کنند
- DNA polymerase: آنزیمی (مانند Taq polymerase) که رشته‌های جدید DNA را سنتز می‌کند
- Deoxynucleotides (dNTPs): اجزای ساختاری DNA
- Buffer solution: محیط شیمیایی بهینه برای واکنش را فراهم می‌کند

مراحل پایه:

- Denaturation: گرم کردن برای جدا کردن رشته‌های DNA
 - Annealing: سرد کردن برای اجازه دادن به اتصال پرایمرها به الگو
 - Extension: DNA polymerase پرایمرها را گسترش می‌دهد و رشته‌های جدید DNA ایجاد می‌کند.
- این مراحل چندین بار تکرار می‌شوند (چرخه‌ها) که منجر به تکثیر نمایی DNA می‌شود.

تکثیر DNA برای شناسایی پاتوژن‌ها

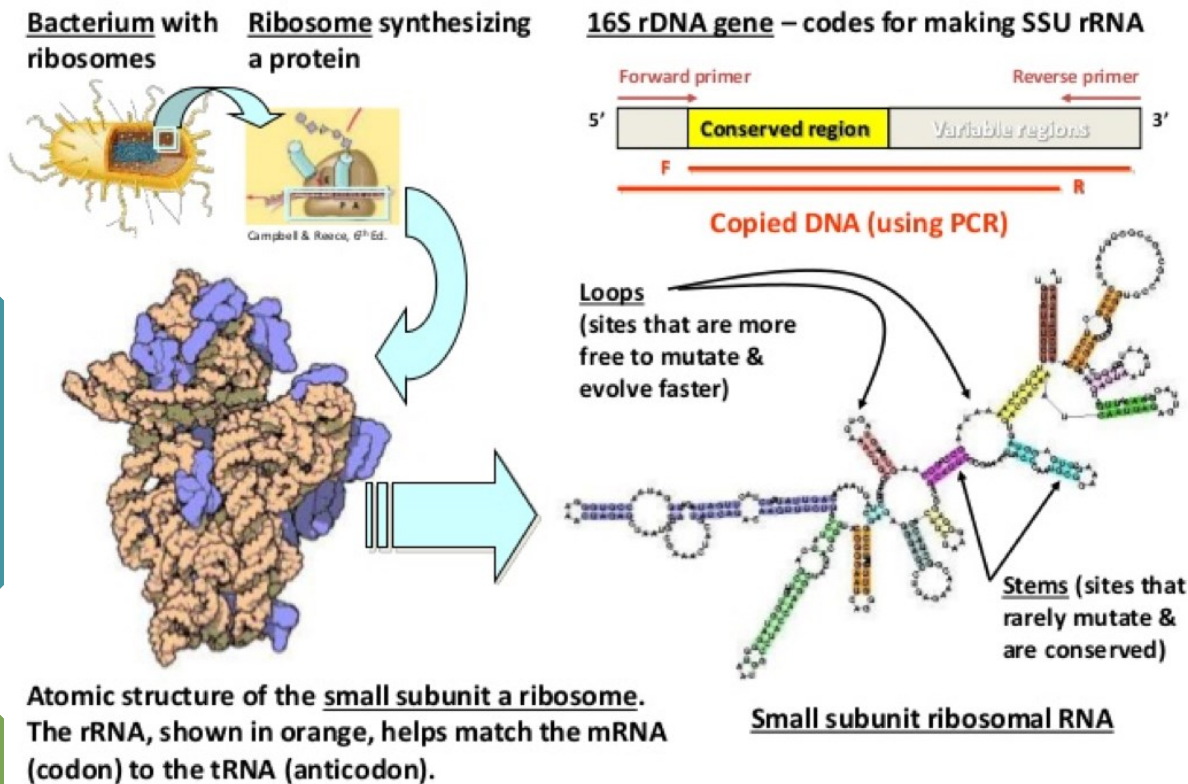
اهمیت:

حساسیت و ویژگی PCR این روش را به ابزاری قدرتمند برای شناسایی پاتوژن‌ها در نمونه‌های غذایی، بالینی و محیطی تبدیل کرده است.

این روش قادر است ژن‌هایی را که به گروه‌های تاکسونومیک خاص مربوط هستند و همچنین ژن‌هایی که در virulence باکتری‌های بیماری‌زا در غذا نقش دارند، تکثیر کند.

این روش برای شناسایی باکتری‌ها، ویروس‌ها و انگل‌ها کاربرد دارد.

Use of primers to copy the 16S rDNA gene in bacteria



Multiplex PCR

روش Multiplex PCR یا mPCR روشی توسعه یافته از PCR معمولی است که امکان شناسایی همزمان چندین ژن هدف را در یک واکنش فراهم می‌کند. در این روش، چند جفت پرایمر اختصاصی به‌طور همزمان در واکنش وارد می‌شوند و هرکدام ناحیه‌ای خاص از ژنوم یک پاتوژن را تکثیر می‌کنند.

با تنظیم دقیق طراحی پرایمرها و شرایط واکنش، mPCR می‌تواند به شکلی کارآمد، دقیق و سریع اطلاعات چندگانه را تنها با یک بار انجام PCR به‌دست دهد. پس از پایان واکنش، محصولات تکثیر شده با استفاده از روش‌هایی مانند الکتروفورز شناسایی و تفسیر می‌شوند. این روش به‌ویژه در صنایع غذایی برای تشخیص همزمان چند پاتوژن رایج بسیار کاربردی و مقرون به‌صرفه است.

Multiplex PCR

mPCR نوعی PCR پیشرفته است که به طور همزمان چندین ژن هدف را تکثیر می‌کند.

در حالی که در PCR معمولی فقط یک جفت پرایمر استفاده می‌شود، در mPCR از چندین جفت پرایمر اختصاصی استفاده می‌شود.

طراحی پرایمرها باید با دمای اتصال (T_m) مشابه انجام شود تا تکثیر همزمان موفق باشد. غلظت پرایمرها باید به دقت تنظیم شود تا از تشکیل دایمر پرایمر جلوگیری شود.

سایر عوامل مؤثر:

غلظت بافر PCR

نسبت $MgCl_2$ به dNTP

مقدار DNA الگو

دمای چرخه‌ها

و آنزیم Taq DNA polymerase



Real-Time PCR: کمیت‌سنجی پاتوژن‌ها

- Real-Time PCR (qPCR)

- اصول کار:

مقدار تکثیر DNA را در طی فرآیند PCR به صورت زمان واقعی اندازه‌گیری می‌کند، به جای شناسایی آن در پایان فرآیند. از رنگ‌های فلورسانت یا پروب‌ها برای نظارت بر تجمع محصولات PCR استفاده می‌شود.

- نحوه عملکرد:

شبیه به PCR معمولی است، اما با اضافه کردن یک معرف فلورسانت. فلورسانس در هر چرخه اندازه‌گیری می‌شود که کمیت DNA هدف را تعیین می‌کند. مقدار چرخه آستانه (Ct) مقدار اولیه DNA هدف را نشان می‌دهد. می‌توان از رنگ‌های فلورسانت که به DNA دورشته ای متصل می‌شوند یا پروب‌هایی که مخصوص توالی هدف هستند، استفاده کرد.

Real-Time PCR: کمیت‌سنجی پاتوژن‌ها

- کاربردها:
- کمیت‌سنجی پاتوژن‌ها در غذا: تعیین بار پاتوژن.
- شناسایی سطوح پایین پاتوژن‌ها: حساسیت بیشتر از PCR معمولی.
- شناسایی سرتیپ‌ها و پاتوتیپ‌های خاص: بر اساس ژن‌های virulence یا نشانگرهای دیگر.
- نظارت بر رشد و فعالیت متابولیک: به‌ویژه با RT-qPCR برای هدف‌های RNA.

Real-Time PCR: کمیت‌سنجی پاتوژن‌ها

- مزایا:
- نتایج کمی: مقدار DNA هدف را اندازه‌گیری می‌کند.
- حساسیت بالاتر: قادر به شناسایی سطوح پایین‌تر پاتوژن‌ها است.
- سریع‌تر از PCR معمولی: نظارت در زمان واقعی زمان تجزیه و تحلیل را کاهش می‌دهد.
- خودکار و قابل تکرار.
- محدودیت‌ها:
- گران‌تر از PCR معمولی: هزینه بیشتری دارد.
- ممکن است هنوز قطعات آزاد DNA را شناسایی کند به جای DNA از میکروارگانیسم‌های سالم.
- نیاز به منحنی‌های کالیبراسیون خوب برای کمیت‌سنجی دقیق دارد.

Real-Time PCR: کمیت‌سنجی پاتوژن‌ها



- جنبه‌های تجاری:
کیت‌های qPCR برای پاتوژن‌های مختلف از شرکت‌هایی مانند Thermo Fisher Scientific و Bio-Rad موجود است. دستگاه‌های Real-Time PCR مورد نیاز هستند و به‌طور گسترده در دسترس‌اند.
- کاربرد: تشخیص سریع و دقیق *Listeria monocytogenes* در محصولات لبنی.
- مثال تجاری: دستگاه ABI PRISM® 7500 Real-Time PCR.

DNA Microarray

DNA Microarray یک تکنولوژی پیشرفته برای شناسایی همزمان صدها یا هزاران ژن یا پاتوژن در یک نمونه است. اساس کار آن شبیه به یک "تخته هوشمند" DNA است که روی آن صدها نقطه کوچک وجود دارد؛ هر نقطه شامل قطعه‌ای کوتاه از DNA به نام پروب است که فقط به یک توالی خاص از DNA هدف می‌چسبد. وقتی نمونه‌ای که دارای DNA تک‌رشته‌ای است روی این تخته ریخته می‌شود، توالی‌های مکمل به پروب‌ها متصل می‌شوند.

اگر این اتصال اتفاق بیفتد، با تاباندن نور لیزر و ثبت فلورسانس می‌توان فهمید که کدام پاتوژن یا ژن در نمونه وجود دارد. این روش می‌تواند همزمان چندین عامل بیماری‌زا را در مواد غذایی، آب یا نمونه‌های بالینی شناسایی کند.

DNA Microarray

- بر خلاف PCR معمولی که فقط یک یا چند ژن را در هر واکنش تکثیر می‌دهد، روش Microarray بدون نیاز به تکثیر، قادر است صدها هدف ژنتیکی را به طور هم‌زمان شناسایی کند. در PCR، اطلاعات به صورت کمی (تعداد نسخه‌های DNA به دست می‌آید، اما Microarray اطلاعات کیفی گسترده‌ای ارائه می‌دهد و حتی امکان مقایسه الگوهای بیان ژن‌ها را نیز فراهم می‌سازد.
- مزایا: شناسایی هم‌زمان صدها پاتوژن یا ژن
- مناسب برای آنالیزهای بزرگ مقیاس و غربالگری
- عدم نیاز به طراحی چندین پرایمر یا واکنش جداگانه
- معایب: هزینه بالا نسبت به PCR معمولی
- نیاز به تجهیزات تخصصی مانند اسکنر فلورسانس و نرم‌افزارهای تحلیلی
- پیچیدگی در طراحی و تفسیر نتایج
- حساسیت کمتر نسبت به PCR در برخی موارد

DNA Microarray

ویژگی‌ها و کاربردها	پاتوژن‌های هدف	نوع آرایه (تراکم)	نام کیت / برند
ویژه کنترل آلودگی‌های استافیلوکوکی در مواد غذایی	از Staphylococcus 15 گونه جمله MRSA	کم تراکم	StaphyChips® (Affymetrix)
مناسب برای پروژه‌های تحقیقاتی و طراحی تخصصی	بسته به نیاز	قابل سفارشی‌سازی	Agilent Custom DNA Array
کاربرد صنعتی با عملکرد سریع و ساده	Salmonella, Listeria, E. coli, Campylobacter	نیمه خودکار	GeneDisc Array (Pall Corp.)
کاربرد در تحقیقات پیشرفته و اپیدمیولوژی	بیش از 1000 ویروس، باکتری و قارچ	تراکم بالا	PathoChip (UPenn)

Microarray های کم تراکم برای تشخیص روتین در صنایع غذایی مناسب‌تر هستند، در حالی که انواع تراکم بالا بیشتر در تحقیقات پیشرفته ژنتیک و اپیدمیولوژی کاربرد دارند.

LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification)

- روش LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) یک تکنیک نوین تکثیر DNA است که برای شناسایی سریع و دقیق پاتوژن‌ها طراحی شده است. برخلاف PCR معمولی که نیاز به چرخه‌های دمایی دارد، LAMP در دمای ثابت بین 59 تا 65 درجه سانتی‌گراد کار می‌کند و نیاز به دستگاه ترمال سایکلر ندارد. در این روش، از ۴ تا ۶ پرایمر استفاده می‌شود که نواحی مختلفی از توالی هدف را شناسایی می‌کنند. آنزیم مورد استفاده، Bst DNA Polymerase است که توانایی جابجایی رشته (strand displacement) را دارد. در طول واکنش، ساختارهای DNA پیچیده و حلقوی (شبیه گل‌کلم) ایجاد می‌شود که به صورت نمایی تکثیر می‌شوند. نتیجه واکنش را می‌توان با روش‌های ساده‌ای مانند تغییر رنگ با رنگ SYBR Green یا الکتروفورز ژل مشاهده کرد. این روش به قدری حساس است که می‌تواند در عرض یک ساعت، DNA هدف را تا 10^3 برابر بیشتر از PCR معمولی تکثیر کند.

LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification)

- تفاوت LAMP با PCR معمولی
- شرایط دمایی: LAMP در دمای ثابت انجام می‌شود → نیازی به ترمال سایکلر نیست
- PCR نیاز به چرخه‌های دمایی مختلف دارد (دناتوراسیون، اتصال، طویل‌سازی)
- تعداد پرایمر: LAMP: ۴ تا ۶ پرایمر → افزایش دقت و اختصاصیت
- PCR: تنها ۲ پرایمر
- سرعت و کارایی: LAMP سریع‌تر و حساس‌تر است (در کمتر از ۶۰ دقیقه) PCR
- معمولی به زمان بیشتری نیاز دارد
- تجهیزات مورد نیاز: LAMP با تجهیزات ساده و حتی قابل حمل قابل انجام است
- PCR نیاز به تجهیزات آزمایشگاهی پیشرفته‌تر دارد

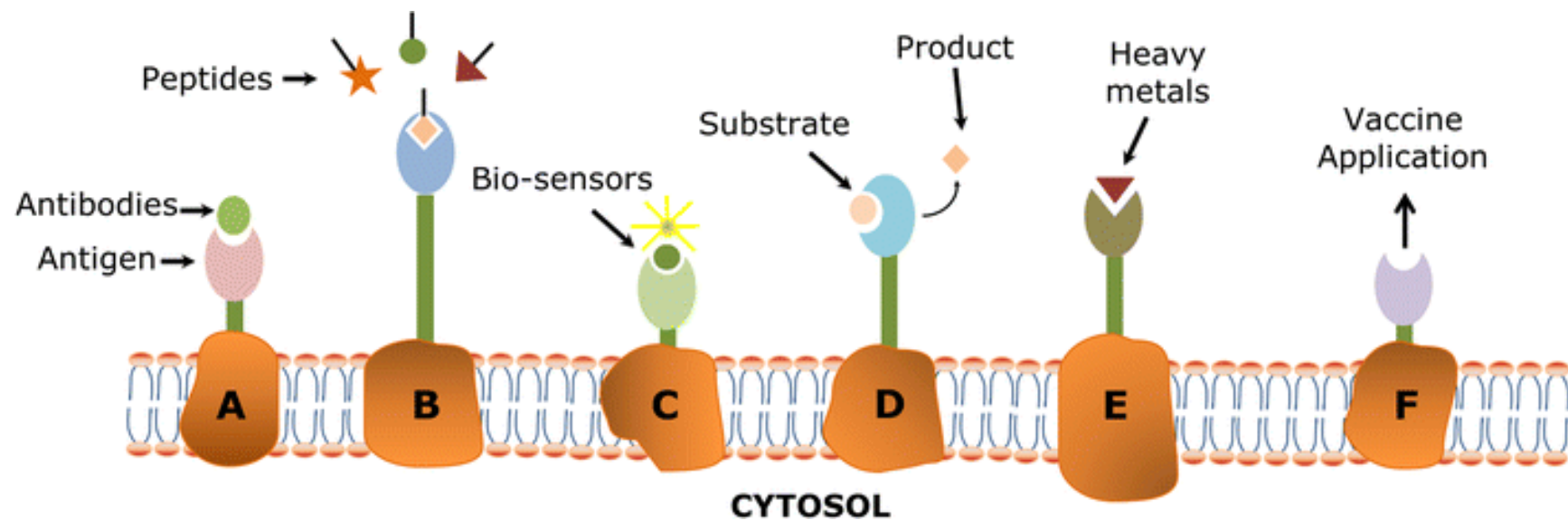
LAMP

- مزایا:
- عدم نیاز به تجهیزات پیشرفته (قابل انجام در محل نمونه‌گیری)
- سرعت بالا (نتیجه در کمتر از ۱ ساعت)
- حساسیت و اختصاصیت بالا (به‌علت استفاده از چندین پرایمر)
- مناسب برای تشخیص پاتوژن‌ها در غذا، آب، خون و محیط‌های پیچیده
- امکان مشاهده نتیجه با چشم غیرمسلح (تغییر رنگ)
- معایب:
- طراحی پرایمر پیچیده و نیازمند دقت بالا
- خطر بالاتر آلودگی به‌علت تولید زیاد محصول تکثیر
- تفسیر کمی نتایج سخت‌تر است (در مقایسه با qPCR)
- امکان تولید محصولات غیراختصاصی در صورت طراحی نادرست

LAMP

منابع	ویژگی‌ها و کاربرد	هدف تشخیصی	نام کیت / برند
Hara-Kudo et al., 2008	در ژاپن؛ مورد LAMP نخستین کیت تجاری استفاده در صنایع غذایی و تشخیص سریع پاتوژن‌ها	Salmonella, Shigella, E. coli O157:H7, Campylobacter	Loopamp® (Eiken Chemical)
NEB catalog	سفارشی؛ همراه LAMP مناسب برای طراحی با نشانگر رنگی یا فلورسانس	کاربرد عمومی برای ژن‌های مختلف	Isothermal Master Mix (NEB)
OptiGene Ltd.	تست سریع در خطوط تولید مواد غذایی؛ قابل حمل	Listeria monocytogenes	LAMP Kit for Listeria (OptiGene)

بيوسنسورها



بیوسنسورها

بیوسنسورها دستگاه‌های تحلیلی هستند که یک عنصر زیستی شناسایی‌کننده را با یک مبدل فیزیکی ترکیب می‌کنند تا سیگنال‌های زیستی، شیمیایی یا بیوشیمیایی را به سیگنال‌های الکتریکی قابل اندازه‌گیری تبدیل کنند.

- از این ابزارها در ایمنی مواد غذایی، پایش محیطی، بیومدیسین و کشف دارو استفاده می‌شود.
- آنها اطلاعات سریع و آنی ارائه می‌دهند که نسبت به روش‌های میکروبیولوژیکی سنتی برتری دارند.
- بیوسنسورها قادر به تشخیص ترکیبات مختلفی مانند آنتی‌ژن‌های باکتریایی، توکسین‌ها و محصولات جانبی میکروبی هستند.
- این ابزارها به دلیل حساسیت بالا، سهولت استفاده و سرعت تشخیص شناخته شده‌اند.

اجزای اصلی بیوسنسورها

- بیورسپتور: شناسایی‌کننده آنالیت هدف، مانند آنتی‌بادی‌ها، آنزیم‌ها یا اسیدهای نوکلئیک.
- مبدل: تبدیل‌کننده تعامل زیستی به سیگنال قابل اندازه‌گیری (اپتیکی، الکتروشیمیایی یا مبتنی بر جرم).
- مبدل سیگنال: پردازش‌کننده سیگنال مبدل و تولید خروجی.

انواع بیوسنسورها

بیوسنسورها بر اساس نوع مبدل دسته‌بندی می‌شوند:

بیوسنسورهای اپتیکی:

- تغییرات نور مانند فاز، فرکانس یا دامنه را اندازه‌گیری می‌کنند.
- شامل تکنیک‌هایی مانند کالریمتری، فلورسانس، شیمی‌لومینسانس هستند.
- امکان مشاهده فعالیت میکروبی با چشم غیرمسلح را فراهم می‌کنند.
- برای تشخیص پاتوژن‌هایی مانند *E. coli* O157:H7، *Listeria monocytogenes* و *Salmonella enterica* استفاده می‌شوند.

انواع بیوسنسورها

بیوسنسورهای الکتروشیمیایی:

- پاسخ‌های الکتروشیمیایی مانند امپدانس، جریان یا پتانسیل را اندازه‌گیری می‌کنند.
- پاسخ‌های سریع‌تری ارائه می‌دهند و در محلول‌های کدر قابل استفاده هستند.
- برای تشخیص *Salmonella*، *E. coli* و سایر پاتوژن‌ها به کار می‌روند.
- قابلیت ترکیب با فناوری آپتامر برای افزایش ویژگی تشخیص را دارند.
- شامل بیوسنسورهای بدون برچسب هستند که از مولکول گیرنده متصل به مبدل برای تشخیص آنالیت خاص استفاده می‌کنند.

بیوسنسورهای مکانیکی:

- شامل بیوسنسورهای پیزوالکتریک هستند که از کریستال‌هایی مانند کوارتز به عنوان مبدل استفاده می‌کنند.
- اغلب در کاربردهای ایمن‌سازی و برای تشخیص DNA و پروتئین‌ها استفاده می‌شوند.

بیوسنسورهای بیولومینسانس:

- از نور تولیدشده در واکنش‌های آنزیمی استفاده می‌کنند که اغلب شامل آنزیم‌هایی مانند لوسیفراز هستند.
- می‌توانند با پایش ATP، منبع انرژی زیستی موجود در میکروب‌ها، پاتوژن‌ها را تشخیص دهند.
- در شناسایی آلودگی‌های باکتریایی در صنایع فرآوری مواد غذایی به کار می‌روند.

مزایای بیوسنسورها

- **تشخیص سریع:** نتایج را سریع‌تر از روش‌های سنتی کشت ارائه می‌دهند.
- **پایش آنی:** امکان ردیابی در محل و اطلاعات آنی را فراهم می‌کنند.
- **حساسیت بالا:** قادر به تشخیص مقادیر کم پاتوژن‌ها یا توکسین‌ها هستند.
- **قابلیت حمل:** بیوسنسورهای الکتروشیمیایی اغلب قابل حمل و مناسب برای شرایط در محل هستند.
- **چندکاره بودن:** برخی بیوسنسورها می‌توانند چندین پارامتر یا پاتوژن را به طور همزمان تشخیص دهند.
- **بدون نیاز به برچسب:** برخی از بیوسنسورهای الکتروشیمیایی از مولکول گیرنده متصل به مبدل برای تشخیص استفاده می‌کنند.
- **کاهش خطا:** نتایج ایمنوسنسورها از طریق سیگنال‌های دیجیتال خوانده می‌شوند که خطاهای انسانی را کاهش می‌دهد.

کاربردها در ایمنی مواد غذایی

تشخیص پاتوژن‌های منتقله از غذا مانند *E. coli* O157:H7، *Salmonella*، *Listeria monocytogenes* و *Staphylococcus aureus*.

- پایش فرآیندهای غذایی، از جمله تحلیل نقاط بحرانی و کنترل (HACCP).
- تحلیل فساد و کیفیت مواد غذایی با تشخیص آنتی‌ژن‌های باکتریایی، توکسین‌ها و محصولات جانبی میکروبی.
- آزمایش مواد غذایی مانند شیر، پنیر، گوشت، سبزیجات و میوه‌ها.
- شناسایی توکسین‌های میکروبی مانند انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی و مایکوتوکسین‌ها.

بیوسنسورها

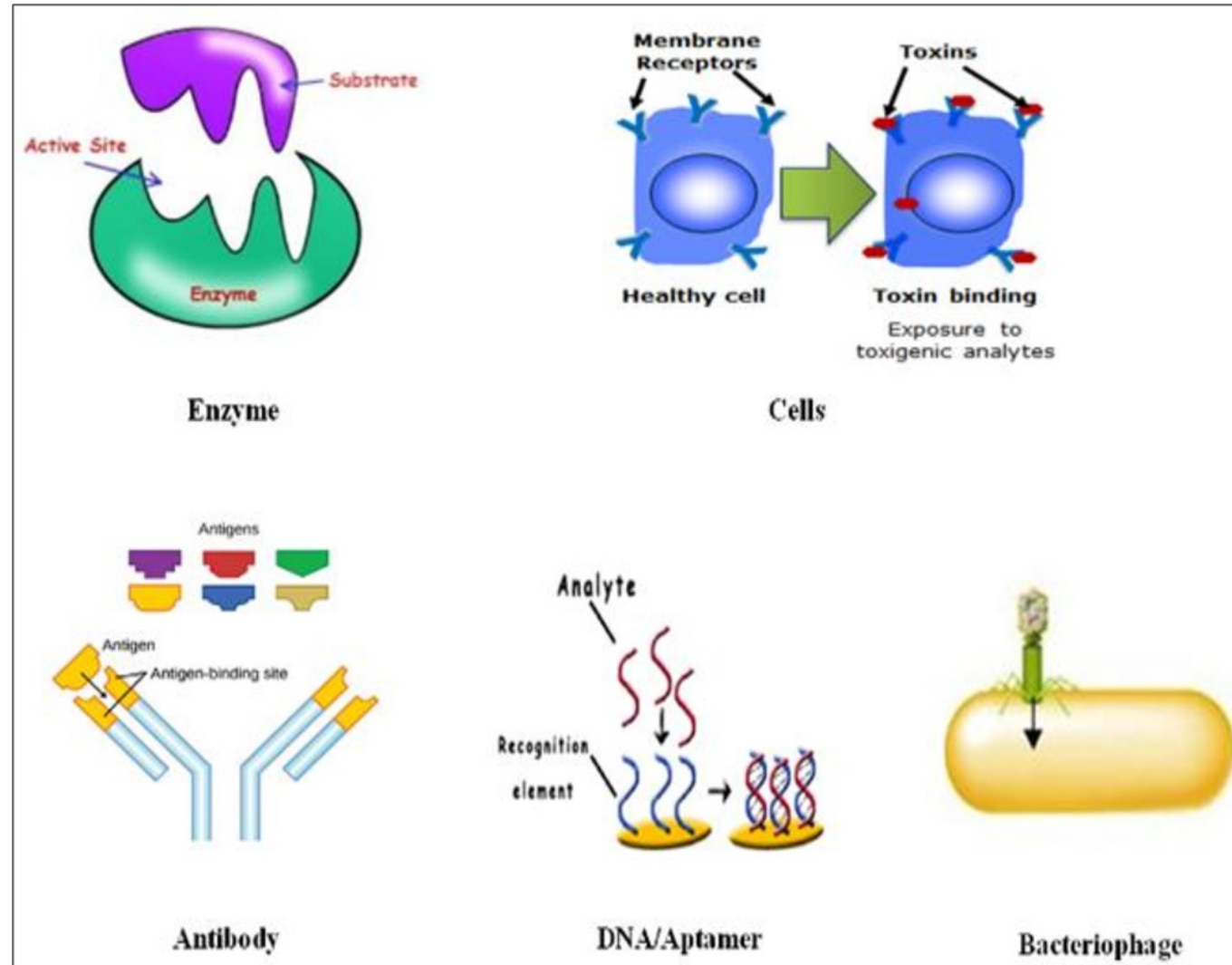
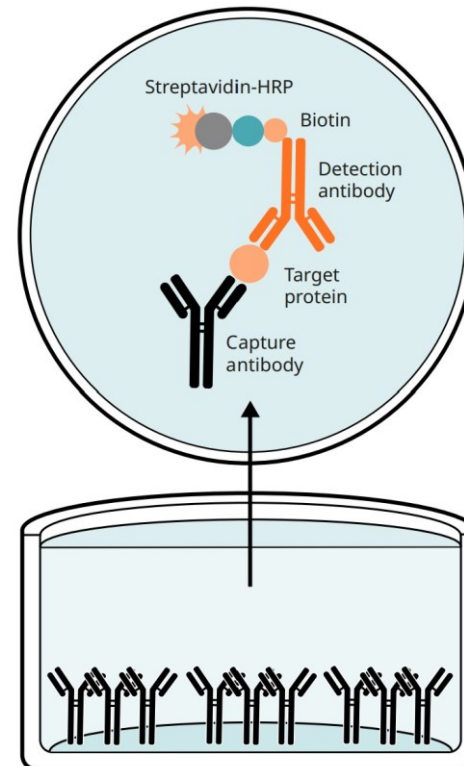


Fig 2. biosensors

روش‌های ایمنی شناسی



Immunological Methods

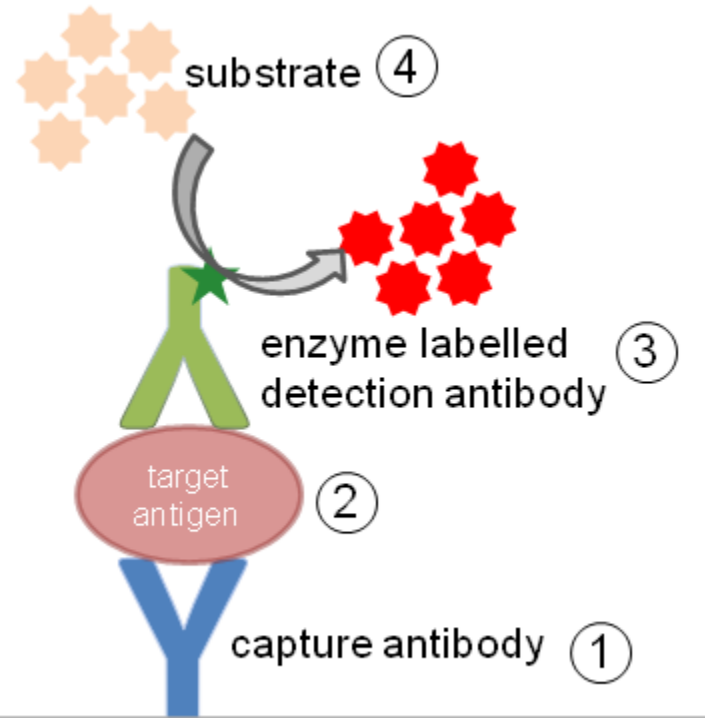
• یکی از دقیق‌ترین و پرکاربردترین رویکردها در این زمینه، استفاده از روش‌های ایمنی‌شناسی است که بر اساس واکنش‌های آنتی‌ژن-آنتی‌بادی کار می‌کنند. این روش‌ها از ویژگی و حساسیت بالایی برخوردارند و امکان شناسایی سریع و اختصاصی پاتوژن‌ها را فراهم می‌کنند.

• دو روش اصلی در این حوزه شامل ELISA و آزمون جریان جانبی هستند.

Immunological Methods

- روش‌های ایمنی‌شناسی مبتنی بر برهم‌کنش اختصاصی بین آنتی‌ژن و آنتی‌بادی هستند. هر آنتی‌بادی توانایی شناسایی و اتصال به آنتی‌ژن خاص خود را دارد. این پیوند، اساس شناسایی دقیق پاتوژن‌ها را فراهم می‌آورد. ویژگی (Specificity) و حساسیت (Sensitivity) دو ویژگی کلیدی در این روش‌ها هستند. ویژگی به توانایی آنتی‌بادی در تمایز پاتوژن هدف از دیگر موجودات زنده اطلاق می‌شود و حساسیت مربوط به توانایی شناسایی مقدار اندکی از آنتی‌ژن است. در این روش‌ها از آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال (چند کلونی) و مونوکلونال (تک کلونی) استفاده می‌شود. آنتی‌بادی‌های مونوکلونال دقت بالاتری دارند و برای کاربردهای تجاری رایج‌تر هستند.

Immunological Methods



• روش ELISA (آزمون ایمنی‌سنجی متصل به آنزیم) یکی از رایج‌ترین ابزارهای شناسایی پاتوژن‌های غذایی است. در نوع ساندویچی ELISA، دو آنتی‌بادی در فرآیند تشخیص نقش دارند. آنتی‌بادی اولیه به سطح چاهک‌های پلیت متصل می‌شود و آنتی‌ژن هدف از نمونه غذا به آن متصل می‌گردد. پس از شستشو، آنتی‌بادی دوم که به آنزیم متصل است اضافه شده و به آنتی‌ژن متصل می‌شود. در ادامه، سوبسترای بی‌رنگ اضافه می‌شود که در حضور آنزیم به رنگی قابل‌مشاهده تبدیل می‌شود. این رنگ شدت قابل اندازه‌گیری دارد و نشان‌دهنده حضور پاتوژن است. آنزیم‌های رایج شامل پراکسیداز، آلکالین فسفاتاز و بتا-گالاکتوزیداز هستند.

Immunological Methods

مزایا و محدودیت‌های ELISA

روش ELISA از حساسیت و دقت بالایی برخوردار است و می‌تواند آلودگی‌های میکروبی و سموم غذایی را با اطمینان شناسایی کند. یکی از مزایای اصلی ELISA امکان شناسایی پاتوژن‌ها در سطوح بسیار پایین (کمتر از 1 CFU در 25 گرم غذا) است. همچنین این روش برای سنجش توکسین‌هایی مانند سم بوتولینوم، توکسین‌های استافیلوکوکی و توکسین‌های *C. perfringens* نیز کاربرد دارد.

با این حال، اجرای دستی آن نیازمند تجهیزات آزمایشگاهی و پرسنل آموزش‌دیده است. همچنین زمان انجام آزمون در حالت معمولی ممکن است تا چند ساعت طول بکشد. در نتیجه، استفاده از سیستم‌های خودکار ELISA اهمیت بیشتری پیدا کرده است.

Immunological Methods



- سیستم‌های خودکار ELISA: VIDAS و Assurance EIA (سیستم VIDAS از شرکت BioMerieux) نمونه‌ای از ELISA خودکار با حساسیت بالا است که از فناوری ELFA استفاده می‌کند. این فناوری مشابه ELISA بوده ولی بر اساس تشخیص فلورسانسی عمل می‌کند. نمونه غذایی پس از غنی‌سازی به نوار آزمایشی اضافه می‌شود که شامل تمام واکنش‌گرهای لازم است.

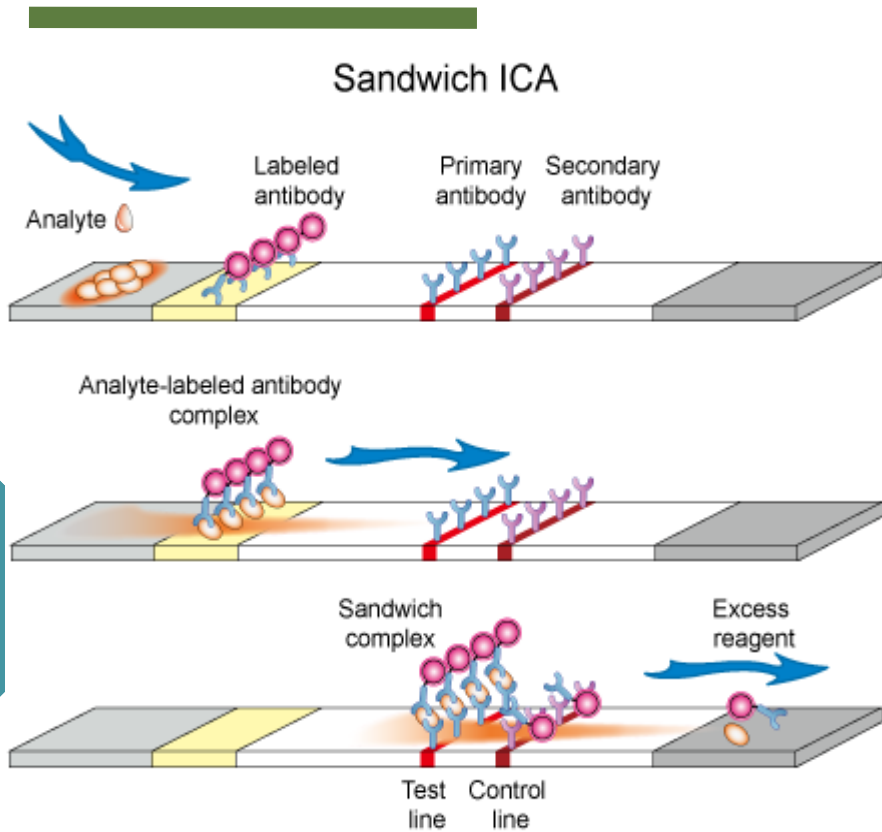
- سیستم به‌طور خودکار نمونه را منتقل کرده، واکنش‌های لازم را انجام می‌دهد و نتایج را ثبت و گزارش می‌کند. زمان کل آزمون 45 دقیقه تا 2 ساعت است. سیستم (Assurance EIA از BioControl) نیز برای تشخیص اتوماتیک *Salmonella*، *Listeria*، *E. coli* O157 و *Campylobacter* طراحی شده و در آزمایشگاه‌های صنعتی کاربرد گسترده دارد.

Immunological Methods

- معرفی آزمون جریان جانبی ایمنی‌شناسی آزمون جریان جانبی Lateral (Flow Immunoassay) برای شناسایی سریع، ساده و بدون نیاز به تجهیزات تخصصی توسعه یافته است.

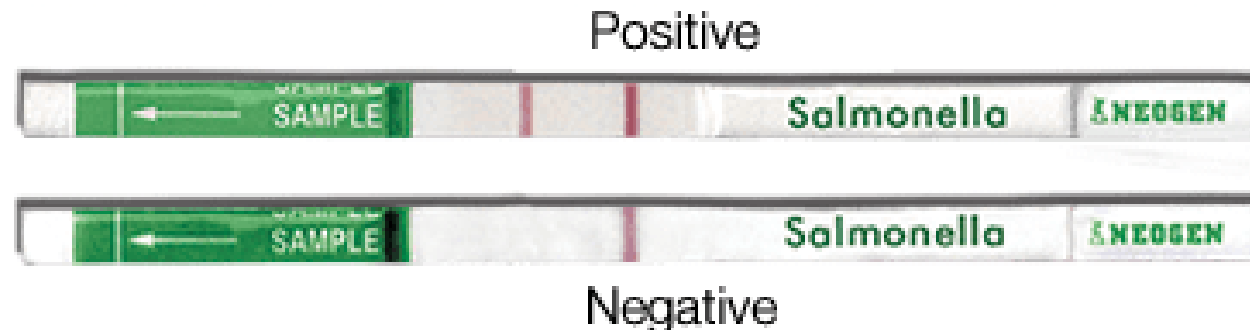
- این آزمون شامل نوار پلاستیکی با چهار بخش است: پد نمونه، پد مزدوج (دارای آنتی‌بادی نشاندار)، غشای نیتروسلولز و پد جذب‌کننده. نمونه مایع از طریق خاصیت موئین حرکت می‌کند، با آنتی‌بادی نشاندار واکنش می‌دهد و اگر پاتوژن هدف وجود داشته باشد، رنگ در ناحیه تست قابل مشاهده خواهد بود.

- این رنگ معمولاً در عرض 2 تا 10 دقیقه ظاهر می‌شود. این آزمون در دو قالب رقابتی و ساندویچی طراحی می‌شود و برای تست‌های میدانی بسیار مناسب است.



Immunological Methods

- آزمون‌های جریان جانبی بسیار سریع، ارزان، ساده و بدون نیاز به تخصص ویژه هستند. آن‌ها در کمتر از 10 دقیقه نتیجه قابل مشاهده می‌دهند و مناسب برای شناسایی فوری در محل تولید یا توزیع مواد غذایی هستند.
- کیت‌های تجاری نظیر Reveal و VIP® GOLD™ برای شناسایی پاتوژن‌هایی نظیر *Salmonella*، *E. coli* و *Listeria* طراحی شده‌اند.
- با این حال، این روش‌ها معمولاً برای نمونه‌های منفرد مناسب هستند و دقت کمتری نسبت به ELISA دارند. همچنین برای غربالگری انبوه در صنایع بزرگ، محدودیت‌هایی دارند و بهتر است با سایر روش‌ها تکمیل شوند.



Immunological Methods

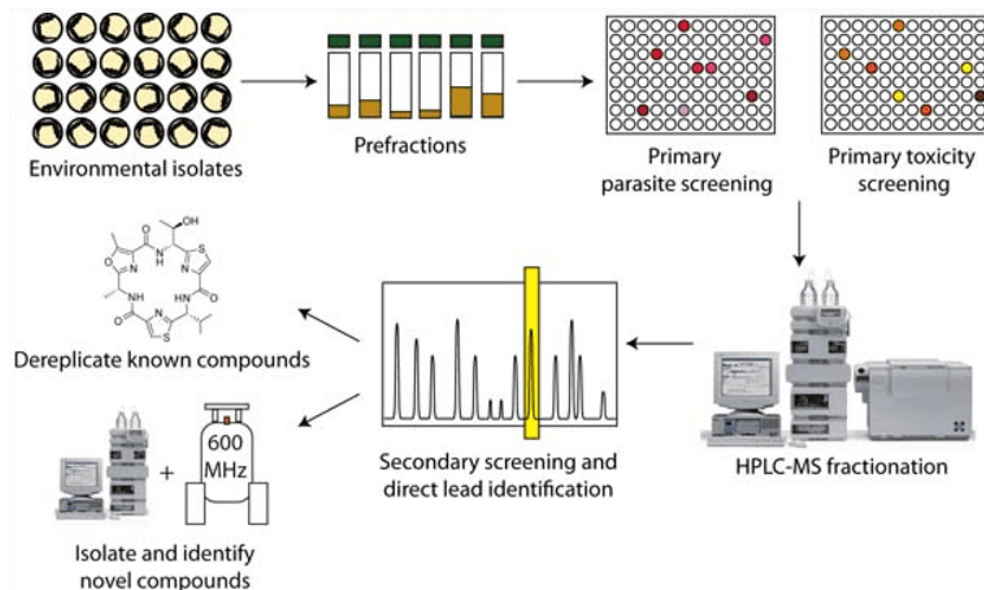
ویژگی	ELISA	Lateral Flow
حساسیت	بسیار بالا	متوسط تا بالا
دقت	بالا	پایین تر
نیاز به تجهیزات	بله	خیر
سرعت اجرا	متوسط (ساعات)	سریع (2-10 دقیقه)
قابلیت خودکارسازی	دارد	ندارد
مناسب برای تست های انبوه	بله	خیر
هزینه	متوسط تا بالا	پایین
استفاده در صنعت	گسترده	قابل حمل و سریع

Immunological Methods

روش	برند تجاری	پاتوژن هدف	نوع غذا	حساسیت	فرمت
ELISA	BIOLINE	Salmonella	محصولات غذایی	1 CFU/25 g	ساندویچی
ELISA	VIDAS	Salmonella ،Listeria ،E. coli	گوشت، سبزی، لبنیات	دقیقه 45-120	ELFA
ELISA	Assurance EIA	E. coli 0157 ،Salmonella	گوشت خام و پخته	حساس	ساندویچی
Lateral Flow	Reveal®	Salmonella ،E. coli 0157	غذاهای مختلف	حساس	ساندویچی
Lateral Flow	VIP® GOLD™	Listeria ،E. coli 0157	محصولات غذایی	-	ساندویچی
Lateral Flow	DuPont™	Listeria	غذاهای متنوع	-	ساندویچی

روش‌های شناسایی میکروبی

مبتنی بر متابولیت‌های



متابولیت ها

- متابولیت‌های میکروبی: مطالعه مجموعه کامل متابولیت‌های کوچک مولکول درون یک سلول میکروبی، کشت یا محیط است. این متابولیت‌ها محصولات نهایی فرآیندهای سلولی هستند و فعالیت‌های متابولیکی و وضعیت فیزیولوژیکی میکروارگانیسم را منعکس می‌کنند. برخلاف ژنومیکس، ترانسکریپتومیکس و پروتئومیکس که به مجموعه محدودی از زیرواحدها متکی هستند، متابولومیکس کل مجموعه متابولیت‌ها در یک ارگانیسم را ارزیابی می‌کند.

- پیچیدگی متابولوم: متابولوم به دلیل تنوع شیمیایی متابولیت‌ها و دامنه وسیع غلظت‌های آنها، بسیار پیچیده است. این پیچیدگی چالش‌های قابل توجهی در آماده‌سازی نمونه و تحلیل آن ایجاد می‌کند. ماهیت پویا: سطح متابولیت‌ها می‌تواند به سرعت در پاسخ به تغییرات محیطی یا ژنتیکی تغییر کند. این تغییرات نشان‌دهنده تطبیق میکروارگانیسم‌ها با محیط اطراف خود هستند و معیاری مستقیم‌تر از فنوتیپ به بیان ژنی محسوب می‌شوند.

انواع متابولیت ها

- انواع متابولیت‌ها: متابولیت‌های اولیه: به طور مستقیم در فرآیندهای ضروری رشد، مانند اسیدهای آمینه، قندها و اسیدهای چرب دخیل هستند.
- متابولیت‌های ثانویه: برای رشد ضروری نیستند اما عملکردهای متنوعی مانند آنتی‌بیوتیک‌ها و سموم دارند.
- لیپیدها: ترکیب لیپیدی میکروارگانیسم‌ها معمولاً به هر گونه اختصاص دارد و با ویژگی‌های رشد و ویروالانس مرتبط است.
- تنظیم متابولیکی: توانایی یک ارگانیسم در هماهنگی بیان واکنش‌ها یا مسیرهای متابولیکی به عنوان "تنظیم" تعریف می‌شود.
- اهمیت: متابولومیکس بینش‌هایی در مورد فیزیولوژی، متابولیسم و تعاملات میکروبی ارائه می‌دهد و تأثیر متابولوم بر ژنوم، ترانسکریپتوم و پروتئوم را روشن می‌سازد. همچنین در درک شبکه‌های متابولیکی، مکانیسم‌های بیماری و پاسخ به استرس نقش دارد.

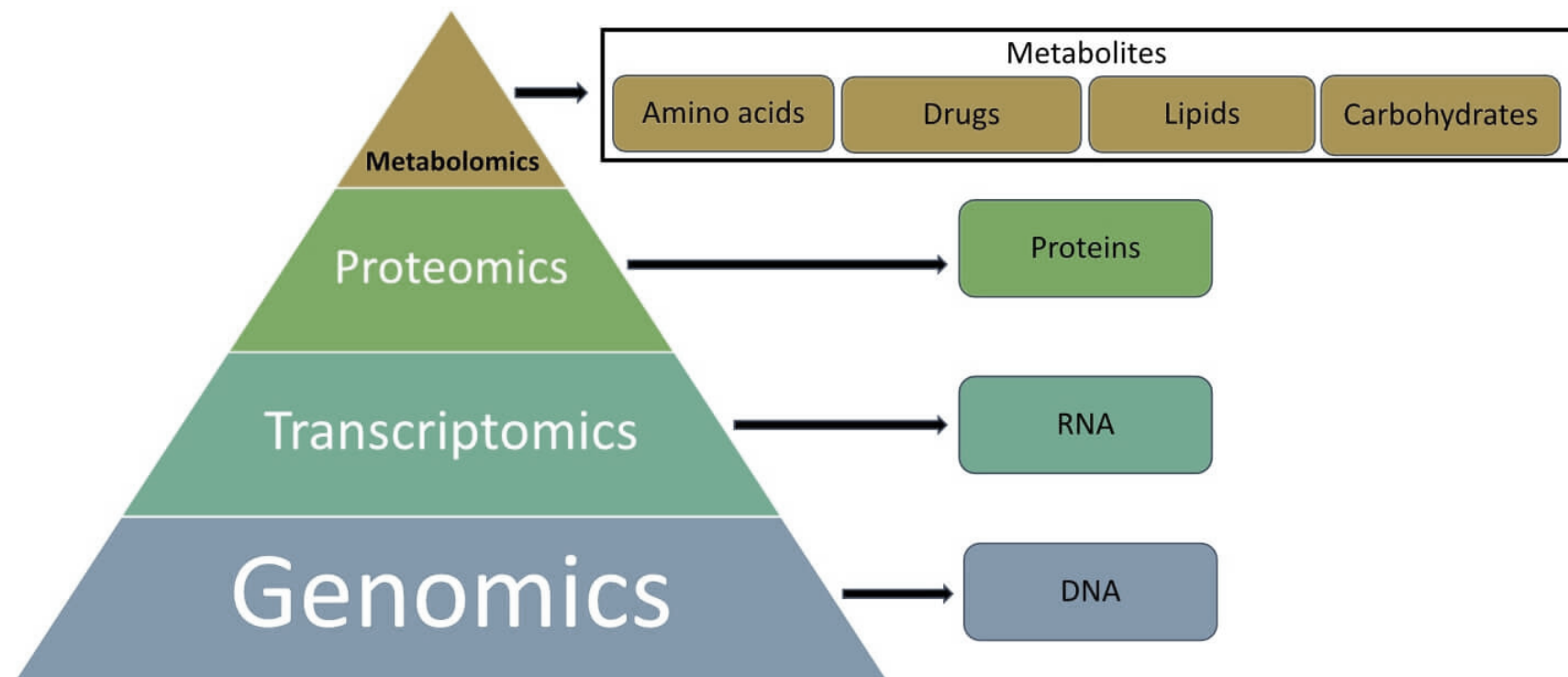
مروری بر روش‌های شناسایی متابولیت‌ها

- متابولومیکس میکروبی: متابولومیکس میکروبی به مطالعه تمامی متابولیت‌ها و فرآیندهای متابولیک موجودات میکروبی، مانند باکتری‌ها، قارچ‌ها و ویروس‌ها، اشاره دارد.
- این علم به بررسی چگونگی تولید و تغییرات متابولیت‌ها در این موجودات در پاسخ به شرایط محیطی و تعاملات با میزبان می‌پردازد. متابولومیکس میکروبی به شناسایی و تحلیل دقیق الگوهای متابولیک میکروب‌ها در شرایط مختلف کمک می‌کند.
- علم متابولومیکس میکروبی به‌ویژه در شناسایی تفاوت‌های متابولیک میان گونه‌های مختلف میکروبی و درک نحوه تعامل آنها با میزبان اهمیت دارد.
- فنو تیپ به ویژگی‌های ظاهری و عملکردی یک موجود زنده اطلاق می‌شود که ناشی از تعامل ژن‌ها با محیط است. در میکروب‌ها، فنو تیپ می‌تواند شامل ویژگی‌هایی مانند مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها، تولید سموم، یا توانایی در استفاده از منابع مختلف غذایی باشد.
- با تحلیل دقیق الگوهای متابولیکی میکروب‌ها، می‌توان تفاوت‌های موجود میان سویه‌های مختلف بیماری‌زا را شناسایی کرد. این اطلاعات به شناسایی سریع‌تر پاتوزن‌ها و طراحی روش‌های درمانی یا پیشگیری مؤثرتر کمک می‌کند.

مروری بر روش‌های شناسایی متابولیت‌ها

- تحلیل متابولومیکی معمولاً به دو شیوه «هدفمند» Targeted و «غیرهدفمند» Untargeted انجام می‌شود.
- در روش غیرهدفمند، هدف کشف کلیه متابولیت‌های قابل شناسایی در نمونه است، در حالی که در روش هدفمند، بر متابولیت‌های از پیش تعیین‌شده تمرکز می‌شود.
- فرآیند معمول متابولومیکس شامل استخراج متابولیت‌ها (معمولاً با استفاده از روش‌هایی نظیر QuEChERS، آماده‌سازی نمونه، آنالیز با دستگاه‌هایی مانند GC-MS یا LC-MS، و سپس پردازش داده‌ها از طریق نرم‌افزارهای آماری مانند PCA و PLS-DA است.
- شناسایی نهایی متابولیت‌ها معمولاً با تطبیق داده‌های حاصل با پایگاه‌های اطلاعاتی انجام می‌شود. این مراحل به‌ویژه در مطالعات غذایی که ترکیبات شیمیایی متنوعی در نمونه‌ها وجود دارد، نیازمند دقت بالا و تنظیمات دقیق روش‌هاست.

مروری بر روش‌های شناسایی متابولیت‌ها



مروری بر روش‌های شناسایی متابولیت‌ها

- طیف‌سنجی جرمی (Mass Spectrometry - MS)
- روش غالب: MS یکی از محبوب‌ترین تکنیک‌ها برای اندازه‌گیری‌های متابولومیکس است.
- کوپل به روش‌های جداسازی: اغلب MS با روش‌های جداسازی مانند Gas Chromatography (GC)، Liquid Chromatography (LC) یا Capillary Electrophoresis (CE) ترکیب می‌شود تا مخلوط‌های پیچیده متابولیت‌ها تفکیک شوند.
- GC-MS: مناسب برای تحلیل ترکیبات فرار و معمولاً پس از مشتق‌سازی متابولیت‌ها برای بهبود فراریت استفاده می‌شود.
- می‌توان برای استخراج کل متابولوم از سلول‌ها با استفاده از تخریب دیواره‌های سلولی مقاوم با روش‌های مکانیکی همراه با حلال‌ها استفاده کرد.
- مناسب برای استخراج هدفمند متابولوم اسیدهای چرب.

مروری بر روش‌های شناسایی متابولیت‌ها

• **LC-MS** مناسب برای تحلیل طیف وسیعی از متابولیت‌های قطبی و غیرقطبی، شامل ترکیبات غیر فرار.

• تکنیک‌های مختلف جداسازی LC شامل (RP-LC) reversed-phase ، hydrophilic interaction chromatography (HILIC) و ion pair chromatography (IPC) هستند.

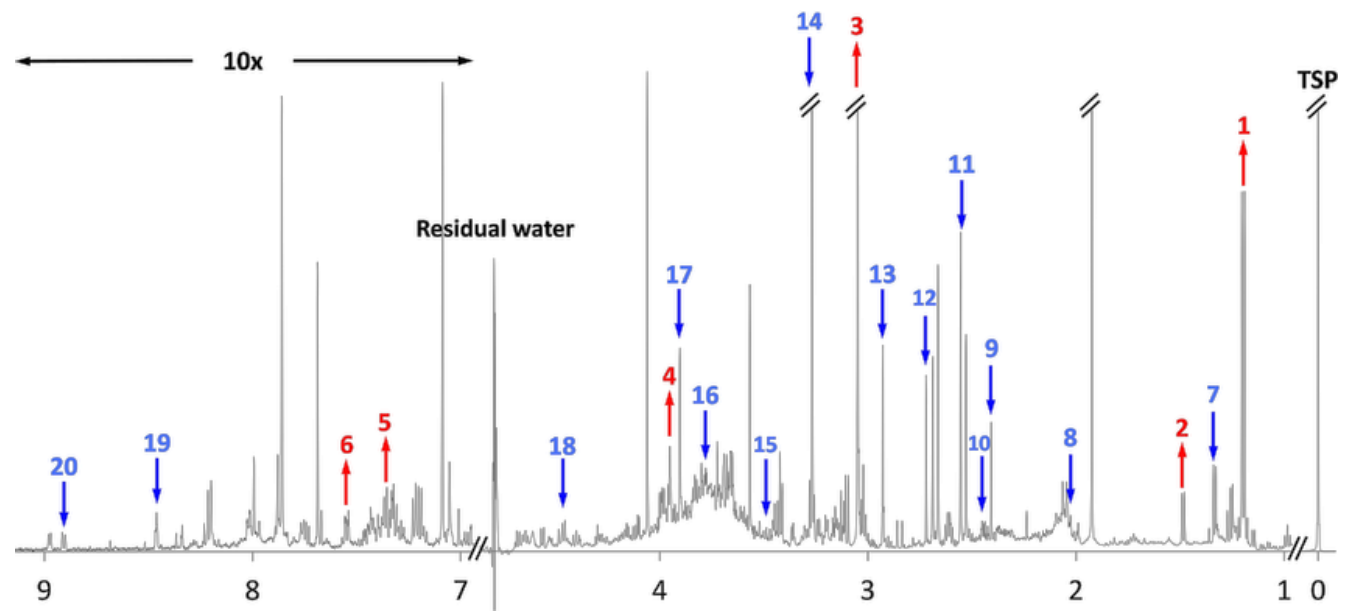
• **HILIC-MS** برای متابولیت‌های قطبی ترجیح داده می‌شود و از فازهای متحرک قلیایی و فازهای ثابت زوئتریونیک استفاده می‌کند که نگه‌داشت و عملکرد کروماتوگرافی را بهبود می‌بخشند.

• **High-Resolution MS (HRMS)** برای شناسایی و کمی‌سازی متابولیت‌های با غلظت پایین و ایزومرهای ساختاری بسیار اهمیت دارد.

• **Tandem MS (MS/MS)** طیف‌سنجی جرمی دوگانه به دلیل انتخاب‌پذیری بالا، حساسیت زیاد، تکرارپذیری خوب و دامنه دینامیکی گسترده در متابولومیکس هدفمند به‌طور گسترده‌ای استفاده می‌شود.

مروری بر روش‌های شناسایی متابولیت‌ها

- رزونانس مغناطیسی هسته‌ای (NMR):
- روش غیرتخریبی: NMR برای تحلیل متابولیت‌ها در مخلوط‌های پیچیده با آماده‌سازی حداقلی نمونه استفاده می‌شود.
- حساسیت محدود: حساسیت NMR نسبت به MS پایین‌تر است و بنابراین اغلب برای متابولومیکس میکروبی که غلظت متابولیت‌ها ممکن است بسیار کم باشد، استفاده نمی‌شود.



مقایسه روشهای مبتنی بر متابولیت ها

روش	حساسیت	دقت	هزینه	سرعت	مزایا	معایب
LC-MS	بالا	بالا	متوسط	بالا	تحلیل ترکیبات قطبی	پیچیدگی یونیزاسیون
GC-MS	بالا	بالا	متوسط	بالا	تحلیل ترکیبات فرار	نیاز به مشتق سازی
NMR	کم	متوسط	بسیار بالا	کند	غیرمخرب، نیاز به استاندارد ندارد	حساسیت کم
MALDI-TOF	بالا	بالا	بالا	بسیار سریع	آماده سازی آسان	وابستگی به دیتابیس
FTIR	پایین	پایین	ارزان	سریع	ساده و سریع	رزولوشن و انتخاب پذیری پایین

MALDI-TOF

روش طیف‌سنجی جرمی MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry) یک تکنیک پیشرفته و سریع برای شناسایی مولکول‌های زیستی مانند پروتئین‌ها، پپتیدها، لیپیدها و متابولیت‌ها است.

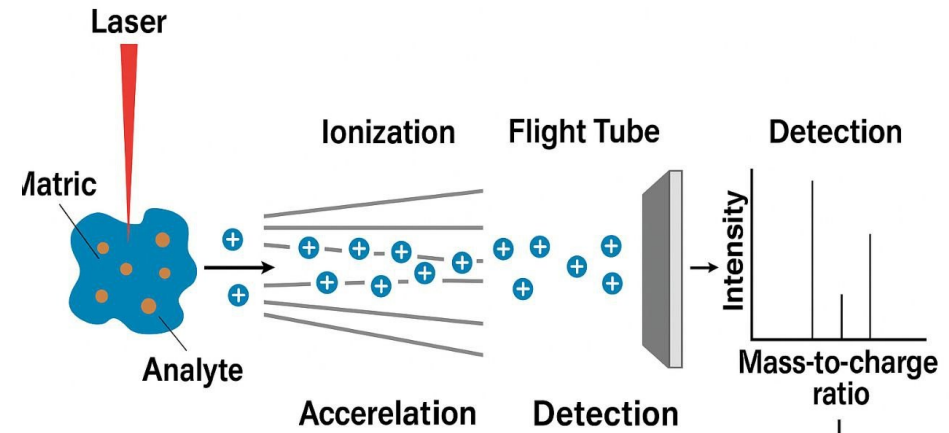
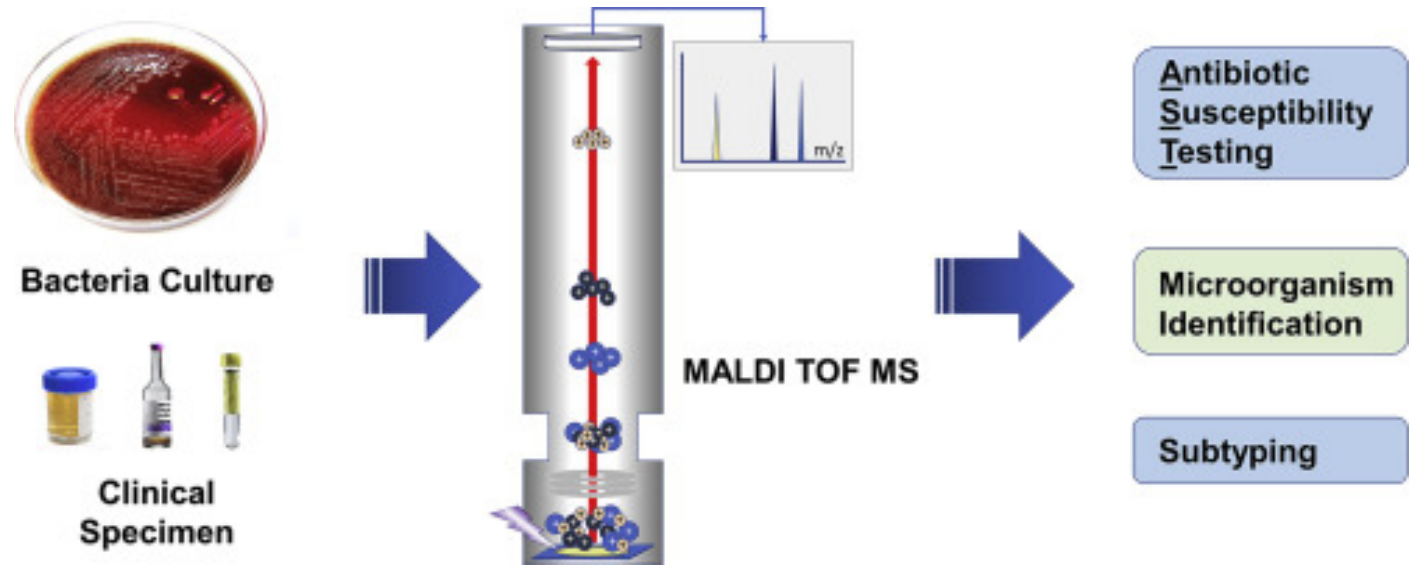
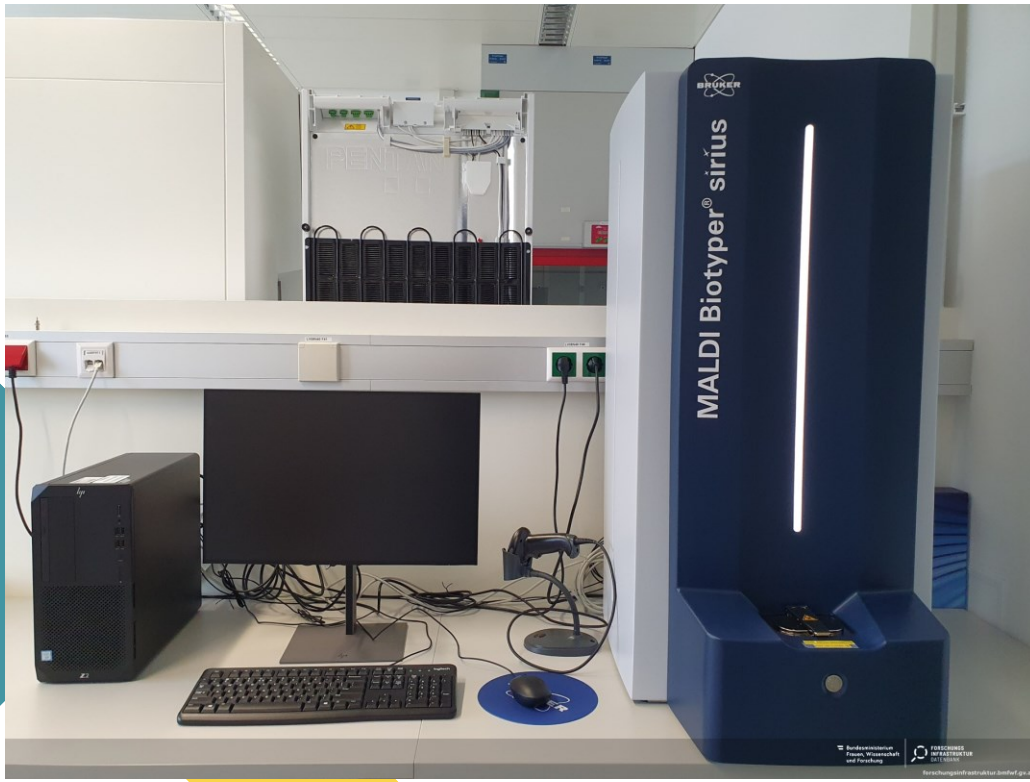
در این روش، ابتدا نمونه با یک ماتریس آلی مخلوط می‌شود. ماتریس ماده‌ای است که نور لیزر را جذب کرده و انرژی آن را به مولکول‌های نمونه منتقل می‌کند. پس از تابش لیزر، ترکیبات موجود در نمونه بدون تخریب شدید یونیزه می‌شوند و به فاز گازی وارد می‌گردند. سپس این یون‌ها با سرعت بالا در یک لوله خلأ حرکت می‌کنند. زمان پرواز هر یون (TOF) که به جرم و بار آن بستگی دارد، توسط آشکارساز ثبت می‌شود. به این ترتیب، طیف جرمی حاصل شده اطلاعات دقیقی از جرم نسبی ترکیبات موجود در نمونه ارائه می‌دهد. این روش به دلیل ملایم بودن فرآیند یونیزاسیون، برای تحلیل ترکیبات بزرگ و حساس به دما، مانند سموم باکتریایی و قارچی، بسیار مناسب است.

MALDI-TOF

MALDI-TOF-MS به دلیل سرعت بالا، دقت جرمی مناسب، و آماده‌سازی ساده نمونه، به‌ویژه در زمینه تشخیص سریع میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و متابولیت‌های خاص آن‌ها کاربرد گسترده‌ای پیدا کرده است. این روش بدون نیاز به جداسازی کروماتوگرافی، امکان شناسایی طیف وسیعی از ترکیبات را فراهم می‌کند و به آلاینده‌های شیمیایی موجود در نمونه (مانند نمک‌ها و بافرها) نیز حساسیت کمتری دارد. از جمله مزایای این روش می‌توان به توانایی در تشخیص مقادیر بسیار کم (نانو تا پیکومول) و عدم نیاز به مراحل مشتق‌سازی اشاره کرد.

با این حال، یکی از چالش‌های اصلی آن وابستگی کامل به پایگاه‌های داده برای شناسایی دقیق ترکیبات است. همچنین، حساسیت آن در مقایسه با LC-MS ممکن است در برخی شرایط محدودتر باشد. با این وجود، در بسیاری از کاربردهای متابولومیک، به‌ویژه در شناسایی قارچ‌ها، باکتری‌ها و سموم آن‌ها، MALDI-TOF-MS به عنوان ابزاری سریع، مقرون‌به‌صرفه و دقیق شناخته می‌شود.

MALDI-TOF



MALDI-TOF-MS

شناسایی سموم قارچی

- قارچ‌ها یکی از عوامل اصلی فساد مواد غذایی هستند و برخی از آن‌ها متابولیت‌های ثانویه‌ای تولید می‌کنند که به عنوان مایکوتوکسین شناخته می‌شوند.
- متابولومیکس ابزار دقیقی برای شناسایی این ترکیبات خطرناک فراهم کرده است.
- مثلاً با استفاده از LC-QTOF-MS می‌توان ترکیباتی مانند داکسی‌نیوانول (DON) و فرم گلیکوزیده آن (DON-3-glucoside) را به دقت در نمونه‌های آلوده شناسایی کرد.
- روش GC-MS نیز برای شناسایی آلترناریول در قارچ‌های آلترناریا استفاده شده است.
- در کنار این‌ها، MALDI-TOF-MS نیز در تمایز سویه‌های مختلف *Aspergillus* و *Penicillium* بسیار موفق عمل کرده است.
- استفاده از NMR نیز برای شناسایی ساختاری متابولیت‌های قارچی مانند beauvericin، fumagillin و gliotoxin گزارش شده است. این تکنیک‌ها توانسته‌اند تحلیل دقیقی از قارچ‌های مولد سم در محصولات مانند گندم، ذرت، سیب و انگور فراهم کنند.

بررسی آلودگی گوشت

- ○ آماده‌سازی نمونه:

- افزودن پاتوژن‌های هدف (*Escherichia coli* و *Salmonella enterica*، *Listeria monocytogenes*) به نمونه‌های گوشت (مثلاً گوشت گاو). (0157:H7)
- انکوبه کردن نمونه‌های آلوده‌شده در یک محیط انتخابی غنی‌شده.
- استخراج متابولیت‌ها از نمونه‌های محیط غنی‌شده.

- ○ تحلیل متابولومیکی:

- تحلیل متابولیت‌های استخراج‌شده با استفاده از کروماتوگرافی گاز-طیف‌سنجی جرمی (GC-MS).
- این روش امکان شناسایی گستره وسیعی از متابولیت‌ها شامل قندها، اسیدهای چرب، آمینواسیدها، نوکلئوزیدها، اسیدهای آلی و متابولیت‌های ثانویه را فراهم می‌کند.

- ○ تحلیل داده‌ها:

- استفاده از روش‌های کمومتریک، مانند تحلیل مؤلفه‌های اصلی (PCA)، برای مشاهده توزیع متابولیت‌ها در نمونه‌ها.

بررسی آلودگی گوشت

- نتایج:

- زمان تمایز:

- تمایز آماری معنادار بین نمونه‌های کنترل و نمونه‌های آلوده‌شده به *L. monocytogenes* پس از 24 ساعت انکوباسیون به دست آمد.
 - نمونه‌های آلوده‌شده به *E. coli* 0157:H7 پس از 12 ساعت تمایز معنادار نشان دادند.
 - نمونه‌های آلوده‌شده به *S. enterica* پس از 18 ساعت تمایز معنادار نشان دادند.

- متابولیت‌های کلیدی شناسایی‌شده:

- *Listeria monocytogenes*:

- سطح گلوکز به طور معناداری کاهش یافت.
 - اسید 2,6-دی هیدروکسی بنزوئیک و اسید 3,4-دی هیدروکسی مادلیک (مربوط به تجزیه آمینو بنزوات).
 - کاداورین (تولیدشده به دلیل فساد).

- *Salmonella enterica*:

- سطح گلوکز به طور معناداری افزایش یافت.
 - اسید بوتاندیئوئیک، سطح یوریدین به طور معناداری کاهش یافت.
 - یک ترکیب ناشناخته.

- *Escherichia coli* 0157:H7:

- سطح گلوکز به طور معناداری افزایش یافت.
 - کاداورین.
 - اسید بوتاندیئوئیک.

بررسی آلودگی گوشت

○ نتیجه گیری:

- گلوکز یک متابولیت معنادار است که در تمام نمونه‌ها شناسایی شد، اما روندهای متفاوتی نشان می‌دهد.
- هر پاتوژن پروفایل منحصر به فردی از متابولیت‌های معنادار خود را نشان می‌دهد.
- پیدا کردن یک متابولیت بیومارکر منحصر به یک پاتوژن ممکن است دشوار باشد، اما ترکیب متابولیت‌ها می‌تواند برای آزمایش‌های تشخیصی سریع استفاده شود.

با تشکر

سید حید نوربخش

09131049188

h.noorbakhsh@mail.um.ac.ir