مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۷ – شماره ۳ – پاییز ۱۳۹۲

Journal homepage: www.ijmm.ir

بکارگیری روش پلی میکسین – آنزیم ایمونواسی در تشخیص سریع سالمونلا در فرآورده های لبنی

رحمان شکری[۱]، بهمن تبرایی[۲]، صدیقه حاتمی[۲]، امید نیلچی زاده رهبر[۱]، لیدا شفیعی آبکناری[۱]، بهرام فکری[۳]

۱. بخش تولید فرآورده های دارویی نوترکیب، انستیتو پاستور ایران، مجتمع کرج

۲. بخش تولید واکسن های باکتریایی، انستیتو پاستور ایران، مجتمع کرج

۳. صنایع شیر ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت:۱۳۹۲/۰۴/۱۰

پذیرش:۱۳۹۲/۰۷/۱۰

انتشار آنلاین:۱۳۹۳/۰۲/۱۵

موضوع:

باکتری‌شناسی پزشکی

IJMM 1392; 7(3): P 12-17

نویسنده مسئول:

رحمان شکری

بخش تولید فرآورده های دارویی نوترکیب، انستیتو پاستور ایران، مجتمع کرج

تلفن: ۰۹۱۲۱۴۸۴۹۵۶

پست الکترونیک:

Rshokri_54@yahoo.com

چکیده

زمینه و اهداف: آلودگی مرغداری ها و فراورده های غذایی به سالمونلا یک مشکل عمده است. عدم تشخیص به موقع این آلودگی صدمات جبران ناپذیر اقتصادی دارد. در فرایندهای تجاری سرعت تکرار پذیری و صرفه جویی اقتصادی مهم ترین نگرانی می باشد. این روند احتیاج به روش های سریع، ساده و ارزان برای پایش خصور بیماری زاها (مانند سالمونلا) در نقاط حساس فرایندهای تولید غذا دارد. روش کشت باکتری و الیزا در تشخیص باکتری های بیماری زا نظیر سالمونلا زمان بر است و هزینه زیادی دارد. هدف این مطالعه مقایسه Polymixin Coated Polyester Cloth in EIA (P-CEIA) با روش های فوق در شناسایی و تشخیص سریع سروارهای مختلف سالمونلا در فراورده های لبنی بود.

مواد و روش کار: برای مقایسه دو روش Ab-EIA و P-CEIA، رقت های مختلف *سالمونلا تیفی موریوم* Ra-30 در پپتون واتر تهیه شد. همچنین از ۲۰ نمونه اولیه شیر و خامه، ۱۰ نمونه مشکوک به سالمونلا با دو روش فوق آزمایش گردید.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که با سویه استاندارد *سالمونلا تیفی موریوم Ra-30* حساسیت روش *P-CEIA* معادل 10^{6} *cfu/mL* و در روش *Ab-EIA* حساسیت 10^{5} *cfu/mL* بود. پس از تیمار حرارتی در حضور سدیم دزوکسی کولات حساسیت دو روش با هم برابر شد. از ۱۰ نمونه مشکوک شیر و خامه در روش *Ab-EIA* به ترتیب ۵ و ۳ نمونه و در روش *P-CEIA* به ترتیب ۳ و ٦ نمونه مثبت گردید. زمان در روش اول حدوداً ١٤ ساعت کمتر بود.

نتیجه‌گیری: یافته ها نشان داد که روش *P-CEIA* برای تشخیص سالمونلاها در فراورده های لبنی، سریع، مقرون به صرفه و پایدار است.

کلمات کلیدی: سالمونلا، P-CEIA ، پلی میکسین B ، فراورده های لبنی.

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

سروارهای سالمونلا یکی از معضلات بهداشتی در مصرف مواد غذایی آلوده به ویژه در فرآورده های لبنی و گوشتی در جهان به شمار می روند. در سال های اخیر موارد سالمونلوزیس ناشی از مصرف مواد غذایی در انسان، رو به افزایش است (**۱، ۲**). جهت بازیابی و جداسازی سالمونلا از لبنیات، ماکیان و مزارع خوک روش های مختلف ارزیابی شده است (**۳**). تشخیص سالمونلا یکی از عوامل مهم کنترل کیفی فرآورده های غذایی در کارخانجات تولید کننده می باشد.

Blais و همکاران در سال ۱۹۹۰ جهت شناسایی آنتی ژنهای لیپو پلی ساکاریدی (LPS) *سالمونلا تیفی موریوم*، از پارچه پلی استر پوشش داده شده با پلی میکسین (P-CEIA)، استفاده نمودند (**۴**). در مطالعه دیگر Burton و همکاران در سال ۱۹۹۱، این روش را برای سنجش نیمه کیفی سالمونلا در غذاهای

فرآوری شده به کار بردند (۵). Wang و همکاران نیز در سال ۱۹۹۵، از آن برای جداسازی سریع و مقرون به صرفه سالمونلا در تخم مرغ استفاده کردند. آنها دریافتند که تعداد خیلی کم *سالمونلا انتریتیدیس* (۲-۱ cfu/mL) تلقیح شده درون تخم مرغ قابل شناسایی است (۶). Blais و همکاران در سال ۱۹۹۷، از روش تلفیقی (محیط های غنی کننده و روش P –CEIA برای جداسازی سالمونلا در مواد غذایی، خوراک دام و نمونه های محیطی استفاده کردند و دریافتند که روش تلفیقی قادر است آلودگی نمونه های غذایی را در حدود 10^{-1}cfu/ml مشخص کند (۷). Wang و همکاران در سال ۱۹۹۶، از آنتی سرم های تجاری در روش P-CEIA ، به عنوان آنتی بادی شناساگر استفاده نمودند. آنها پی بردند که با استفاده از P-CEIA، شناسایی سالمونلا حتی به تعداد خیلی کم در نمونه های غذایی امکان پذیر است(۸).

روش های مرسوم تشخیص سالمونلا اغلب دارای مشکلات خاص خود می باشند. به عنوان مثال در روش کشت، محیط های مغذی اغلب پرهزینه و زمان بر است. این قضیه در موارد حاد از قبیل آلودگی فرآورده های غذایی که زمان عامل مهمی محسوب می شود، ایجاد مشکل می نماید.

همچنین روش الیزا به خصوص CEIA (Cloth–based) Immunoassay Enzyme که در آن از پارچه هایی به عنوان فاز جامد استفاده می شود به خاطر گران بودن آنتی بادی ها، هزینه بر می باشد. پارچه های پوشش داده شده با آنتی بادی ها به دلیل ناپایدار بودن این مواد، حتماً باید در محیط سرد نگهداری شوند. به علاوه، کیفیت آنتی بادی ها در مراکز تولید یکنواخت نیست و از نظر درجه خلوص و خاصیت چسبندگی، از هر سری ساخت به سری ساخت دیگر، فرق می کند (۴).

بنابراین، ارائه روش سریع، ساده و ارزان برای تشخیص سالمونلاها در مواد غذایی از الزامات کنترل کیفی می باشد، لذا روش P – CEIA (Cloth Enzyme–Polymyxin Immunoassay) برای این منظور ارائه شد. این روش بر پایه استفاده از پلی استر پوشش داده شده با پلی میکسین استوار می باشد که برای جذب آنتی ژن های LPS مناسب است. در این روش از پلی میکسین B به جای آنتی بادی در شناسایی سالمونلا استفاده گردید. پلی میکسین B یک پادزیست است که اثر کشندگی بر روی باکتری های گرم منفی دارد. این ماده خیلی ارزانتر از آنتی بادی است و بر خلاف آنتی بادی ها که بسیار ناپایدار هستند پلی میکسین ها در pH بین ۲ تا ۷ پایدار هستند و شکل خالص آن نیز به راحتی در دسترس می باشد . همچنین Blais و همکاران نشان دادند که در حضور LPS سایر باکتری ها (مانند *E.coli* حتی در غلظت ۱۰۰ برابر)، پلی میکسین دارای قدرت چسبندگی اختصاصی به LPS سالمونلا است.در مورد ویژگی اتصال نیز این دانشمندان دریافتند که لیپید A مسئول جذب به پلی میکسین است (۴). لذا با در نظر گرفتن این موارد، از پلی میکسین B به عنوان جایگزین آنتی بادی های ناپایدار و گرانقیمت، استفاده شد.

در فرآیندهای تجاری سرعت، تکرارپذیری و صرفه جویی اقتصادی مهم ترین نگرانی می باشد. این روند، احتیاج به روش های سریع، ساده و ارزان برای پایش حضور بیماری زاها (مانند سالمونلاها) در نقاط حساس فرآیندهای تولید غذا دارد. روش های کشت و الیزا (Ab –EIA=Antibody – Enzyme Immuno Assay) در تشخیص باکتری های بیماری زا نظیر سالمونلا زمان بر است و هزینه زیادی دارد. هدف این مطالعه مقایسه روش (P-CEIA)، با روش های فوق در شناسایی و تشخیص سریع سروارهای مختلف سالمونلا در فرآورده های لبنی بود.

مواد و روش‌ها:

مواد مصرفی

سالمونلا تیفی موریوم Ra – 30 از بخش واکسن های باکتریایی انستیتو پاستور ایران ابتیاع گردید. سدیم دزوکسی کولات (L-6750) و پلی میکسین B (P – 1004) از شرکت سیگما (Sigma) ، پپتون واتر از شرکت دیفکو (Difco) و کیت روش آنتی بادی – آنزیم ایمونواسی (Ab-EIA)، از شرکت Bio A. R. T تهیه شد.

آماده سازی نمونه

سویه Ra – 30، سروار *سالمونلا تیفی موریوم* در پپتون واتر (pH = 7.4) کشت داده شد و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس تا رسیدن به تراکم^{۹}۱۰ باکتری در میلی لیتر، به مدت ۱۲ ساعت گرم خانه گذاری شد . سپس رقت های مختلف (^{۷}۱۰ , ^{۶}۱۰, ^{۵}۱۰, ^{۴}۱۰ , ^{۲}۱۰ و ^{۸}۱۰) تهیه گردید. از هر کدام از رقت ها ۱ mL در هر لوله آزمایش ریخته شد و به هر لوله ۰/۱ mL از محلول EDTA اضافه گردید. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۰

درجه سلسیوس حرارت داده شد. پس از سرد شدن در دمای اتاق، برای آزمایش به دو روش Ab – EIA و P-CEIA مورد استفاده قرار گرفتند (۴). همچنین برای افزایش حساسیت روش P – CEIA ، نمونه های مشکوک و سویه استاندارد *سالمونلا تیفی موریوم* در حضور سدیم دزوکسی کولات ۰/۱٪ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس حرارت داده شد و سپس با هر دو روش بررسی شد (۹).

روش آنتی بادی – آنزیم ایمونواسی Ab-EIA

کیت مربوطه شامل فاز جامد، محلول شستشو (تریس هیدروکلرید اسید + توئین ۲۰)، کنترل منفی، کنترل مثبت (کشت غیر فعال شده *سالمونلا تیفی موریوم* حاوی 10^7 CFU/ml در نوترینت براث)، کونژوگه (آنتی بادی آنتی سالمونلا با HRP نشاندار شده)، سوبسترای TMB، محلول متوقف کننده (اسید سولفوریک) می باشد.

ابتدا محلول کاری شستشو از محلول غلیظ تهیه شد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از شاهد، کنترل منفی و کنترل مثبت را به ترتیب در چاهک های ابتدایی (از Al تا Cl) و ۱۰۰ میکرولیتر از هر نمونه به چاهک های بعدی اضافه گردید و در ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه گرم خانه گذاری شد. پس از این مدت، چاهک ها با ۲۰۰ میکرولیتر از بافر شستشو پر شده و سه مرتبه شستشو داده شدند. سپس مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محلول کونوژوگه به هر کدام از چاهک ها به استثناء چاهک A1 (بلانک) افزوده شد و در ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه گرم خانه گذاری گردید. چاهک ها مانند دفعه قبل و با استفاده از محلول شستشو، سه بار شستشو داده شدند. پس از این شستشو ، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوبسترای TMB (تترا متیل بنزیدین) به تمام چاهک ها اضافه گردید. چاهک ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق (۲۵-۱۸ درجه سلسیوس) و در فضای تاریک نگهداری شد. سپس مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محلول متوقف کننده (Stop solution) به هر کدام از چاهک ها اضافه گردید تا واکنش متوقف شود. این محلول، رنگ آبی کنترل مثبت را به رنگ زرد تغییر داد . پلیت به آرامی تکان داده شد تا رنگ چاهک ها ثابت گردید. شدت رنگ زرد ایجاد شده در میکرو پلیت در طول موج nm ۴۵۰ قرائت شد. پلیت در مقابل چاهک شاهد (A1) کالیبره گردید (۱۰).

روش پلی میکسین – آنزیم ایمونواسی P –CEIA

فاز جامد در این روش پلی استر است. برای انجام آزمایش، پلیت پلی استر با ۶۰ میلی لیتر محلول پلی میکسین با غلظت mg/ml ۸ به مدت ۲ ساعت گرم خانه گذاری شد. بعد، پلی میکسین های اضافی با سه بار شستشو با ۲۰۰ میکرولیتر محلول PBS (pH =7.2) خارج گردید. سپس به هر یک از چاهک ها ۶۰ میکرولیتر از رقت های مختلف نمونه اضافه گردید و در ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه گرم خانه گذاری شد. سپس چاهک ها مانند دفعه قبل سه بار شستشو داده شدند. پس از شستشوی مجدد، ۶۰ میکرولیتر از محلول آنتی بادی متصل به آنزیم پراکسیداز خردل به هر چاهک افزوده شد. پس از حدود ۱۲ دقیقه مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محلول TMB (سوبسترای آنزیم پراکسیداز) به تمام چاهک ها اضافه گردید. چاهک ها در دمای اتاق (۲۵- ۱۸ درجه سلسیوس) و در محل تاریک به مدت ۱۵ دقیقه نگهداری شد. بعد، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول متوقف کننده به هر کدام از چاهک ها اضافه گردید تا واکنش متوقف شود. شدت رنگ آبی ایجاد شده در میکروپلیت در طول موج nm ۳۷۰ قرائت گردید(۴).

مقایسه دو روش در نمونه های مشکوک شیر و خامه :

از هر یک از نمونه های مشکوک شیر و خامه ۱۰ نمونه، طبق روش آماده سازی نمونه، تهیه و با استفاده از هر دو روش از نظر وجود سالمونلا بررسی گردید. در مورد این نمونه ها تنها از رقت 10^5استفاده شد.

یافته‌ها

جدول ۱ نتایج روش Ab – EIA را که با استفاده از دو روش (تیمار حرارتی + EDTA ، تیمار حرارتی + EDTA ، سدیم دزوکسی کولات) آماده سازی شده بود، نشان می دهد. بر اساس کیت الیزا، جذب نوری نمونه های مثبت بیش از 0.25 است. بنابراین، حداقل رقتی که قادر به آشکار سازی سالمونلا با هر دو روش آماده سازی می باشد، 10^5 cfu/ml است. جدول ۲ ، نتایج روش P-CEIA که با استفاده از دو روش تیمار، آماده سازی شده است را نشان می دهد. در این روش در تیمار حرارتی + EDTA ، حداقل رقتی که قادر به آشکارسازی سالمونلا می باشد cfu/ml 10^6 است. در تیمار حرارتی + EDTA + سدیم دزوکسی کولات این میزان به 10^5 cfu/ml رسید.

نتایج روش Ab –EIA بر روی ۱۰ نمونه مشکوک شیر و ۱۰ نمونه مشکوک خامه که با رقت 10^5 cfu/ml و با روش تیمار حرارتی + EDTA + سدیم دزوکسی کولات آماده سازی شده اند، در جدول ۳ نشان داده شده است. در مورد شیر، ۵ نمونه مثبت (نمونه های ۱، ۳، ۴ ، ۶ و ۹) و در مورد خامه، ۳ نمونه مثبت (نمونه های ۲ ، ۴ و ۶) گزارش شد. در جدول ۴، نتایج P – CEIA در مورد نمونه های مشکوک شیر و خامه که مانند روش Ab – EIA آماده سازی شده اند، نمایش داده شده است. با این روش، تعداد ۶ نمونه شیر (نمونه های ۱ ، ۳، ۴، ۵ ، ۶ و ۹) و ۳ نمونه خامه (نمونه های ۲ ، ۴ و ۶) ، مثبت شد.

جدول ۱: نتایج روش Ab – EIA بر روی سویه *سالمونلا تیفی موریوم*

رقت / جذب نوری	10^2	10^4	10^5	10^6	10^7	10^8
جذب نوری 1[a]	0.10 ± 0.017	0.15 ± 0.020	0.26 ± 0.015	0.35 ± 0.032	0.45 ± 0.028	0.61 ± 0.42
جذب نوری 2[a]	0.12 ± 0.021	0.15 ± 0.019	0.25 ± 0.038	0.38 ± 0.029	0.44 ± 0.036	0.65 ± 0.051

۱ : تیمار حرارتی + 2 EDTA : تیمار حرارتی + EDTA + سدیم دزوکسی کولات

a : جذب نوری + خطای استاندارد (n = 4)

جدول ۲: نتایج روش P-CEIA بر روی سویه *سالمونلا تیفی موریوم*

رقت / جذب نوری	10^2	10^4	10^5	10^6	10^7	10^8
جذب نوری 1[a]	0.08 ± 0.00	0.14 ± 0.015	0.19 ± 0.011	0.25 ± 0.018	0.33 ± 0.017	0.146 ± 0.031
جذب نوری 2[a]	0.12 ± 0.011	0.18 ± 0.013	0.27 ± 0.021	0.35 ± 0.032	0.42 ± 0.020	0.62 ± 0.043

۱ : تیمار حرارتی + 2 EDTA : تیمار حرارتی + EDTA + سدیم دزوکسی کولات

a : جذب نوری + خطای استاندارد (n = 4)

جدول ۳: نتایج روش Ab – EIA بر روی نمونه های مشکوک شیر و خامه

شماره نمونه / جذب نوری	۱	۲	۳	٤	٥	٦	۷	۸	۹	۱۰
جذب نوری در نمونه شیر [a]	0.41 ± 0.031	0.09 ± 0.00	0.65 ± 0.041	0.44 ± 0.033	0.24 ± 0.029	0.49 ± 0.053	0.17 ± 0.021	0.11 ± 0.022	0.78 ± 0.061	0.06 ± 0.011
جذب نوری در نمونه خامه [a]	0.10 ± 0.017	0.28 ± 0.021	0.19 ± 0.013	0.65 ± 0.047	0.06 ± 0.010	0.45 ± 0.049	0.21 ± 0.012	0.02 ± 0.00	0.16 ± 0.022	0.11 ± 0.014

a : جذب نوری + خطای استاندارد (n = 4)

جدول ۴: نتایج روش P – CEIA بر روی نمونه های مشکوک شیر و خامه

شماره نمونه / جذب نوری	۱	۲	۳	٤	٥	٦	۷	۸	۹	۱۰
جذب نوری در نمونه شیر [a]	0.40 ± 0.045	0.07 ± 0.017	0.67 ± 0.032	0.47 ± 0.019	0.27 ± 0.020	0.49 ± 0.053	0.17 ± 0.021	0.11 ± 0.022	0.78 ± 0.061	0.06 ± 0.011
جذب نوری در نمونه خامه [a]	0.12 ± 0.029	0.26 ± 0.018	0.23 ± 0.027	0.64 ± 0.061	0.09 ± 0.00	0.49 ± 0.043	0.19 ± 0.025	0.05 ± 0.00	0.16 ± 0.019	0.13 ± 0.017

a : جذب نوری + خطای استاندارد (n = 4)

بحث

روش P–CEIA جهت تشخیص سالمونلا در مواد غذایی در سراسر جهان از اهمیت زیادی برخوردار است. در منابع موجود گزارشی از روش P–CEIA برای شناسایی سالمونلا در مواد غذایی در ایران یافت نشد. در این مطالعه رقت های مختلف سالمونلا و نمونه های شیر و خامه با دو روش Ab – EIA و P– CEIA بررسی شد. بر اساس دستور العمل کیت Ab – EIA، جذب نوری بیشتر از ۰/۲۵ مثبت و کمتر از ۰/۲۵ منفی است. نتایج نشان داد که حداقل غلظت سلولی که روش Ab –EIA قادر به تشخیص آن است معادل cfu/ml ۱۰۵می باشد. در حالیکه در روش P – CEIA این رقت cfu/ml 106است. این مقادیر توسط Wang و همکاران در سال ۱۹۹۶، در مورد Ab – EIA، cfu/ml ۱۰۶ و در مورد P –CEIA ۱۰۷cfu/ml , گزارش شده است (**۸**). به عبارت دیگر در این مطالعه حساسیت هر دو روش نسبت به یافته های Wangو همکاران به میزان ۱۰ برابر بیشتر است. این قضیه می تواند به علت بهینه سازی مقادیر و زمان های آزمایش باشد. اگر چه روش P-CEIA روشی ساده، سریع و ارزان است اما حساسیت آن نسبت به Ab – EIA کمتر است (**۸**). بنابراین، جهت افزایش حساسیت این آزمایش، Blais و همکاران از تیمار حرارتی سالمونلا در سدیم دزوکسی کولات ۰/۱٪ استفاده کردند (**۹**). در این مطالعه ما هم برای افزایش حساسیت، همین روش آماده سازی را بکار بردیم. با این تفاوت که مدت تیمار حرارتی در مجاورت با سدیم دزوکسی کولات به جای ۱۰ دقیقه، به ۱۳ دقیقه افزایش یافت.

در مورد نمونه های شیر و خامه بر اساس رقت مورد استفاده (۱۰۵ در هر دو روش و با تیمار حرارتی در حضور سدیم دزوکسی کولات) در روش Ab-EIA به ترتیب ۵ و ۳ نمونه مثبت و در روش P-CEIA نیز به ترتیب ۶ و ۳ نمونه مثبت شد.

Blais و همکاران بررسی کردندکه آیا لیپو پلی ساکارید سایر باکتری های گرم منفی می تواند باعث اختلال در اتصال پلی میکسین به لیپوپلی ساکارید سالمونلا شود؟ یافته ها حاکی از آن بود که روش P –CEIA قادر است لیپو پلی ساکارید سالمونلا را در محیطی که غلظت لیپوپلی ساکارید *اشریشیاکلی* حتی ۱۰۰ برابر بیشتر است، شناسایی و اندازه گیری کند. به عبارت دیگر آنها نشان دادند که واکنش بین لیپو پلی ساکارید سالمونلا با پلی میکسین، یک واکنش بسیار اختصاصی است. همچنین آنها در این مطالعه به بررسی دیگری در مورد نقش اساسی لیپید A در این اتصال پرداختند. آنها پس از مجاورت LPS در محیط اسیدیته ملایم و حذف لیپید A، دریافتند که در این روش حضور لیپید A ضروری است در حالی که در روش Ab CEIA– از اهمیت بسیار کمتری برخوردار است (**۴**).

بررسی نتایج حاصل از این مطالعه نشان می دهد که در بین روش های EIA ، روش P – CEIA سریع تر، ساده تر و ارزان تر است. این روش را می توان برای شناسایی بعضی دیگر از باکتری های گرم منفی که بیماری زای غذا زاد می باشند (مانند *کمپیلوباکتر*، *اشریشیا کلی*)، البته با استفاده از آنتی بادی های شناساگر، بکار برد (**۱۱**). همچنین با استفاده از این روش در ترکیب با رقیق سازی در کشت مغذی می توان میزان مختلف از آلودگی سالمونلایی را در فرآورده های مختلف، به صورت نیمه کمی تشخیص داد (**۵**). حتی با این روش و استفاده از آنتی بادی شناساگر ضد آنتی ژن O سالمونلا، می توان به تشخیص سرولوژیک سالمونلا در زمان کمتر، روش آسانتر و میزان آنتی بادی کم نایل شد (**۱۲، ۱۳**). هزینه این روش خیلی کمتر (۱۰۰ برابر کمتر) از روش های دیگر EIA است و زمان آن نیز بسیار کوتاهتر (حدود ۱۴ ساعت کمتر) است. استفاده از صفحات پلی استر آغشته به پلی میکسین، به خاطر پایداری آن، معایب و مشکلات خاص روش های دیگر EIA را به همراه ندارد. با توجه به استفاده از بعضی شوینده ها (دترجنت ها) مانند سدیم دزوکسی کولات، حساسیت این روش نه تنها با روش های الیزا برابری می کند حتی در بعضی موارد نیز بیشتر است. ضمناً در مواردی که تعداد زیادی نمونه باید آزمایش شوند، از نظر زمانی و اقتصادی استفاده از روش P–CEIA نسبت به دیگر روش ها ارجحیت دارد.

هدف مطالعه مقایسه این روش نوین با روش های مرسوم و با استفاده از سویه استاندارد بود. از سوی دیگر برای آزمایش نمونه های مشکوک در این مرحله مقدور نبود که بیش از ۲۰ نمونه مشکوک (۱۰ نمونه شیر و ۱۰ نمونه خامه) با این دو روش آزمایش و مقایسه گردد. البته شایسته است و امیدواریم که در آینده نتایج با تعداد بیشتری نمونه تجزیه و تحلیل شود. نتایج مطالعه حاضر حاکی از آن است که روش P–CEIA به دلیل صرفه جویی در هزینه و وقت و همچنین ساده تر بودن نسبت به روش های دیگر از قبیل Ab–EIA و کشت ارجحیت دارد. پیشنهاد می گردد که این روش، با تعداد بیشتری نمونه مشکوک

و همچنین در مورد سایر فرآورده های غذایی و حتی شناسایی و تشخیص دیگر باکتری های گرم منفی نیز بررسی گردد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان از کلیه عزیزانی که ما را در انجام این پروژه یاری نمودند، تشکر و قدردانی می نمایند.

References

1. Little CL, Rhoades JR, Hucklesby L, Greenwood M, Surman-Lee S, Bolton FJ, et al. Survey of Salmonella contamination of raw shell eggs used in food service premises in the United Kingdom, 2005 through 2006. J Food Prot 2008; 71(1):19-26.
2. Braden CR. Salmonella enterica serotype Enteritidis and eggs: a national epidemic in the United States Clin Infect Dis 2006; 43(4):512-7.
3. Pangloli P, Dje Y, Oliver SP, Mathew A, Golden DA, Taylor WJ, et al l. Evaluation of methods for recovery of Salmonella from dairy cattle, poultry, and swine farms. J Food Prot. 2003;66(11):1987-95.
4. Blais BW, Yamazaki H; Use of polymyxin coated polyester cloth in the enzyme immunoassay of salmonella lipopolysaccharide antigens. Int J Food Microbiol 1990; 11(3-4): 195-204.
5. Burton W, Blais BW, Yamazaki H;Application of polymyxin coated polyester cloth to the semi-quantitation of salmonella in processed foods. Int J Food Microbio 1991; 14(1): 43-49.
6. Wang H, Blais BW and Yamazakib H.Rapid and economical detection of Salmonella entritidis in eggs by the polymyxin-cloth enzyme immunoassay. Int J Food Microbiol 1995; 24(3): 397- 406.
7. Blais BW, Pui Lan Chanb, Phillippea LM, Brooksc BW, Hayashib S , Yamazakib H. Assay of salmonella in enrichment cultures of foods, feeds and environmental samples by polymyxin-cloth enzyme immunoassay. Int J Food Microbiol 1997; 37(2-3): 183-188.
8. Wang H, Blais BW, Brooksc BW, Yamazakib H. Salmonella detection by polymyxin-cloth enzyme immunoassay using polyclonal and monoclonal detector antibodies Int J Food Microbiol 1996; 29(1): 31-40.
9. Blais BW, Yamazaki H. Use of detergents in the preparation of Salmonella samples for enzyme immunoassay on polymyxin coated polyester cloth. Int J Food Microbiol 1990; 11(3-4): 329-36
10. BIO A.R.T. Elisa test for the rapid detection of Salmonella in food samples, 2006, http://www.afnor.org .
11. Blais BW, Bosley J, Perez AM, Popela M; Polymyxin-based enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of Escerichia coli O111 and O26. J Microbiol Meth 2006; 65(3), 468 475.
12. Haiyan W, Burton W. Blais BW, Hiroshi Y. A P-CEIA System for Salmonella O serogroup identefication. J Rapid Meth Automation Microbiol 1994;3(2), 105 113.
13. Blais BW, Ong HY, Yamazaki H. Use of inexpensive O antisera as the detecting antibodies for Salmonella antigens in the polymyxin-cloth enzyme immunoassay. Int J Food Microbiol. 1993; 26; 20(3):149-58.