تشخیص مولکولی E.coli O157:H7 به روش PCR با استفاده از ژن توکسیژنیک stx2A

حمید رضا توکلی[۱]، مهدی قربانعلی زادگان[۲]، علی نجفی[۳*]، علی احمدی[۴]

۱. دکترای بهداشت و تغذیه، دانشیار مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)
۲. فوق لیسانس میکروب شناسی پزشکی، کارشناس ارشد و محقق گروه تغذیه مرکز تحقیقات بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)
۳. دانشجوی دکترای بیوانفورماتیک، کارشناس ارشد و محقق دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)
۴. فوق لیسانس بیوتکنولوژی، کارشناس ارشد و محقق دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)

* نشانی برای مکاتبه: تهران، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، تلفن ۰۹۱۲۵۱۸۸۲۱۶، najafi74@yahoo.com
دریافت مقاله: اردیبهشت هشتاد و نه پذیرش برای چاپ: تیرماه هشتاد و نه

چکیده

سابقه و هدف: *در حال حاضر روش استاندارد برای تشخیص E.coli O157:H7 کشت و سرولوژی می‌باشد. تشخیص با این روش بیش از ۳۶ ساعت طول می‌کشد. لذا، دست‌یابی به آزمونی که بتواند در هر شرایطی وجود E.coli O157:H7 را در زمان کمتری نشان دهد، ارزشمند می‌باشد. هدف این مطالعه طراحی روش تشخیص سریع مولکولی E.coli O157:H7 به روش PCR با استفاده از ژن stx2A نمونه استاندارد بود.*

روش کار: *ژن stx2A به عنوان ژن اختصاصی برای شناسایی اشریشیا کلی توکسیژنیک انتخاب گردید. به منظور بهینه سازی آزمایش از سویه استاندارد E.coli O157:H7 استفاده شد. برای استخراج DNA از روش فنل - کلروفرم استفاده شد و محصول bp ۵۵۶ پس از الکتروفورز در ژل آگارز ۱٪ در دمای اتاق با رنگ اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و مورد شناسایی قرار گرفت. برای بررسی اختصاصیت از باکتری های سالمونلا تیفی PTCC: 1609 ،لیستریا مونوسیتوژنز PTCC: 1163 استفاده شد.*

یافته‌ها: *نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که سویه استاندارد محصول مورد نظر را تولید می‌نماید. در حقیقت، جفت پرایمر انتخاب شده محصولی در اندازه bP ۵۵۶ تولید می‌کند. آزمایش اختصاصیت نشان داد که روش حاضر با هیچ یک از باکتری‌های غیرهدف واکنش نشان نمی‌دهد. بررسی حساسیت نشان داد که حد نهایی تشخیص DNA اشریشیا کلی در این روش fg ۵۰۰ می‌باشد.*

نتیجه گیری: *نتایج بهینه سازی نشان داد که روش PCR به‌کار رفته در این مطالعه از سرعت، حساسیت و اختصاصیت لازم برخوردار است و نتیجهٔ نهایی در کمتر از سه ساعت بدست می‌آید. به کارگیری این روش در آزمایشگاه‌های تشخیصی اشریشیا کلی را امکان پذیر می‌نماید.*

واژگان کلیدی: ***اشریشیاکلی ، PCR ،ژن stx2A***

مقدمه

E.coli O157H7 یکی از سروتیپ های بسیار مهم باکتری اشرشیاکلی انتروهموراژیک (EHEC) است که از طریق مواد غذایی به انسان منتقل گردیده و عوارض خطرناکی همچون اورمی و کولیت خونریزی دهنده ایجاد می نماید. عفونت های ناشی از اشرشیاکلی در کشورهای مختلف جهان مطرح می باشد، بعنوان مثال طبق گزارش مرکز کنترل بیماری ها ۷۳۰۰۰ مورد بیماری ناشی از اشرشیا کلی در ایالات متحده رخ داده است. موارد وقوع این بیماری که از سال ۱۹۸۲ تا ۲۰۰۲ به مرکز کنترل بیماری ها گزارش گردیده به منظور بررسی هرچه بیشتر بیماری بررسی شده است. در این محدوده زمانی ۳۵۰ بار گزارش در این مورد ارائه گردیده که شامل ۸۵۹۸ مورد بوده است. ۱۴۹۳ نفر (۱۷٪) در بیمارستان بستری شده اند، ۳۵۴ نفر (۴٪) دچار سندرم همولیتیک اورمیک (HUS) شده اند و ۴۰ نفر (۰/۵٪) نیز فوت نموده اند. عامل انتقال در ۱۸۳ نفر (۵۲٪) منشاء غذایی داشته، ۷۴ نفر (۲۱٪) ناشناخته، ۵۰ نفر (۱۴٪) شخص به شخص، ۳۱ نفر (۹٪) از طریق آب آلوده، ۱۱ نفر (۳٪) در اثر تماس با حیوانات و ۱ نفر (۰/۳٪) در اثر کار در آزمایشگاه بوده است. در این کشور میزان شیوع اشرشیا کلی E.coli O157:H7 حدوداً ۱ در ۳۷۲۶ یا ۰/۰۳٪ برای ۷۳۰۰۰ نفر درتخمین زده شده است(۱).

این باکتری دارای دوز عفونی پایین بوده و با تعداد کم ایجاد عفونت می نماید و می تواند عامل ایجاد اسهال خونریزی دهنده و کولیت هموراژیک باشد(۲). جداسازی و تشخیص میکرو ارگانیسم های بیماری زا یکی از موضوعات بسیار مهم در بهداشت جامعه است. در حال حاضر تشخیص وجود باکتری با دو روش سنتی و مدرن انجام می‌گیرد . روش های سنتی در مقایسه با روش های نوین، به دلیل نیاز به انجام آزمایشات افتراقی و تکمیلی وقت گیر و به رغم کم هزینه بودن گاهی مشکل ساز می باشند. این خلا بویژه در مواقعی که اعلام سریع نتایج از نظر پزشکی و اقتصادی حائز اهمیت است، بیشتر احساس می گردد(۳). اساس این روش ها عموماً کشت باکتری در محیط های مختلف و تولید کلنی‌های قابل رویت در یک محیط جامد انتخابی و انجام آزمایشات بیوشیمیایی در محیط های مایع است. در مورد برخی باکتری ها حتی مجبور به استفاده از مراحل پیش غنی‌سازی، غنی‌سازی، و کشت در محیط جامد انتخابی می‌باشیم (۴ و ۵). خوشبختانه با کشف روش های سریع تشخیص این مشکلات تا حد زیادی مرتفع گردیده است، زیرا این روش ها دارای سرعت و دقت بسیار بالا بوده و با کمک آنها در زمان بسیار کمتری میکرو ارگانیسم مورد نظر شناسایی می گردد(۶). امروزه ضرورت استفاده از روش های مولکولی، مانند تکنیک PCR، سرولوژیکی و بیوسنسور در تشخیص سریع پاتوژن ها پیش از پیش احساس می گردد. بعنوان مثال استفاده از تکنیک PCR و محیط های کروموژن از روش های تشخیص دقیق و نسبتا" سریع هستند که بعلت عدم نیاز به آزمایشات افتراقی در سالیان اخیر در کشور های پیشرفته جهان بعنوان روش های جایگزین برای روش های متداول مطرح گردیده اند(۷). هدف از مطالعه حاظر گزارش روند تشخیص مولکولی E.coli O157:H7 به روش PCR با استفاده از ژن stx2A می باشد.

روش کار

سویه استاندارد E.coli O157:H7 از دانشگاه تهران، دانشکده دامپزشکی و محیط‌های کشت‌های LB agar و LB broth از شرکت Merck تهیه گردیدند.روش تعیین مقدار DNA بر اساس میزان حساسیت رنگ اتیدیوم بروماید: توانایی روش الکتروفورز، در رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید، در تعیین DNA در بهترین شرایط یک نانوگرم می‌باشد. لذا، نمونه خالص شده از محیط کشت به صورت رقت سریالی ۱/۲ تا ۱/۸۰رقیق گردید و ضعیف ترین باند انتخاب شد(۸).روش تخمین مقدار DNA بر اساس تعداد باکتری (CFU): از آنجایی که هر باکتری دارای یک کروموزوم است و در صورتی که کشت داده شود، هر باکتری قادر به تولید یک کلنی می‌باشد. از سوسپانسیون باکتری رقت تهیه گردید و بر اساس روش Misra& Miles میزان باکتری در واحد حجم بر اساس CFU تخمین زده شد(۸).پرایمر: پس از بررسی منابعی که از PCR برای تشخیص اشریشیا کلی استفاده شده بود، تمام ژن‌ها و پرایمرهای استفاده شده، مورد بررسی قرار گرفتند. پرایمرهای مربوط به ژن stx2A انتخاب و بررسی شدند. بر اساس میزان حساسیت و اختصاصیت پرایمرها و نتایج آنالیز آنها با نرم افزار BLAST پرایمرمطلوبی که مشخصات آن در جدول ۱ ذکر شده است برای تشخیص اشریشیا کلی انتخاب گردید(۹). انالیز نرم افزاری این ژن و پرایمرهای ارایه شده نشان داد که سکانس انتخاب شده از ژن stx2A مناسب ترین توالی برای شناسایی E.coli O157:H7 می‌باشد.

جدول ۱. سکانس پرایمر انتخاب شده به منظور تشخیص E.coli O157:H7

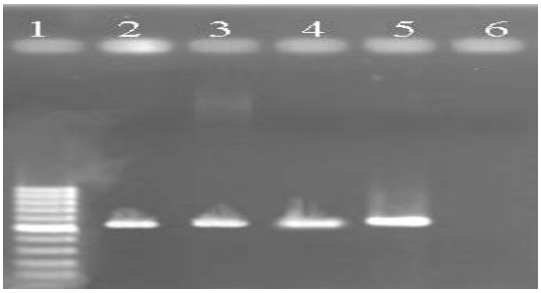
Primers	Sequences
Forward	5-cga ggg ctt gat gtc tat cag-3
Reverse	5-tca gta taa cgg cca cag tcc-3

استخراج ژنوم: برای استخراج ژنوم از روش فنل‌کلروفرم استفاده شد. به‌این ترتیب که برای پیاده کردن(**set up**) آزمایش **PCR** ابتدا چند کلنی از باکتری‌های استاندارد به ۱ میلی لیتر سرم فیزیولوژی اضافه شد و با سرعت ۵۰۰۰ دور به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. به رسوب حاصل ۵۰۰ میکرولیتر بافر **Salt Tris EDTA** افزوده شد و پس از ۱۰ دقیقه مخلوط نمودن آن ۱۸۰ میکرولیتر **SDS** دو درصد به‌آن اضافه گردید. پس از آن ۳۷۵ میکرولیتر استات سدیم به‌آن افزوده شد و ۱۰ بار به شدت تکان داده شد. سپس در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد و به محلول رویی ۷۵۰ میکرولیتر ایزوپروپانول اضافه گردید. پس از نگهداری به مدت ۲۰ دقیقه در دمای منهای ۲۰ درجه با سرعت۱۵۰۰۰ دور به‌مدت ۲۰ دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. به روسوب حاصل ۳۷۵ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد افزوده شد و به‌خوبی مخلوط گردید. به‌مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۵۰۰۰ سانتریفوژ شد. به رسوب حاصل ۲۵ میکرولیتر بافر **TE** اضافه شد و جهت انجام **PCR** استفاده گردید. بهینه سازی مواد لازم برای واکنش **PCR** : برای رسیدن به این هدف چند بار فرآیند **PCR** انجام شد و در هر مرحله یکی از غلظت‌های مواد اولیه (پرایمرها **dNTP ،MgCl2،** و آنزیم **Taq** پلی مراز) استفاده شد. در نهایت مناسب ترین مقادیر از مواد لازم برای انجام **PCR** انتخاب گردیدند. دمای اتصال پرایمرها، پروفایل‌های حرارتی و زمان در واکنش تغییر داده شد تا بهترین شرایط **PCR** فراهم گردد. جهت بهینه سازی دمای اتصال پرایمرها **(Annealing)** از درجه حرارت‌های ۵۶ ، ۵۷ ، ۵۸ و ۵۹ درجه سانتی‌گراد استفاده شد. تائید محصول: جهت تائید نهائی محصول بدست آمده، برای تعیین توالی، به شرکت سیناژن ارسال گردید.

یافته‌ها

با توجه به شرایط بهینه شده از نظر مواد مصرفی در واکنش و سیکل حرارتی مناسب، واکنش PCR برای ژن stx2A با پرایمر های اختصاصی آن انجام شد و در نهایت باند ۵۵۶ جفت بازی حاصل شد که نتیجه آن در تصویر شماره ۱ملاحظه می گردد.

تصویر شماره۱. واکنش زنجیره ای پلیمریزاسیون برای E.coli O157H7



Lane1: marker (100bp) , Lane 2,3,4,5: stx2A gene E. Coli O157H7(556bp) ,Lane 6: negative control

با بررسی پرایمر های مورد استفاده و شرایط واکنش ، سیکل و غلظت مواد مورد استفاده طبق جداول ۱و۲ تعیین گردید.

جدول ۱سیکل حرارتی مورد استفاده در فرایند PCR جهت تشخیص E.coli O157H7

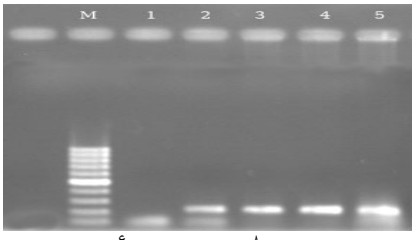
Stage		Temp	Time	No.Cycle
Cycle	Hot start	94 ˚C	4 min	1
	Denaturation	94 ˚C	60s	30
	Annealing	58 ˚C	60s	
	Extension	72 ˚C	60s	
Final extension		72 ˚C	3 min	**1**

جدول ۲ مواد مصرفی و غلظت مورد استفاده در فرایند PCR جهت تشخیص E.coli O157H7

Material	Concent.	Volume
Template	µl	10
Primer F.	10pmol/µl	1
Primer R.	10pmol/µl	1
Taq DNA pol.	5U/µl	0.25
dNTPs	10mM	0.5
Buffer	10X	3
MgCl2	10mM	1
D.W	µl	13.25
Total	µl	**30**

دمای اتصال پرایمرها (Annealing): درجه حرارت مراحل مختلف در واکنش PCR تغییر داده شد تا بهترین دمای اتصال برای پرایمر مشخص گردد. باتوجه به نتایج بدست آمده دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد به عنوان دمای Annealing انتخاب گردید. تعیین اختصاصیت PCR: برای تعیین اختصاصیت PCR، ژنوم تعدادی ازباکتری های نزدیک به این گونه استخراج گردید و آزمایش PCR انجام شد و محصولات آن در ژل آگارز یک درصد و حرارت اتاق الکتروفورز شدند. هیچ یک از باکتری‌های مورد آزمایش، غیر از E.coli O157H7 ، محصول اختصاصی bp ۵۵۶ را تولید نکردند. **تعیین میزان حساسیت**: رقت‌هایی از 10^{-1} تا 10^{-8} از ژنوم سویه استاندارد تهیه گردید و از این رقت‌ها PCR انجام شد. نتایج PCR در شکل ۲ نشان داده شده است. به این ترتیب PCR طراحی شده در این مطالعه قادر به شناسایی ۵۰۰fg از ژنوم E.coli O157H7 بود.

شکل ۲:الکتروفورز محصولات PCR از رقت‌های مختلف E.coli O157H7



۱- کنترل منفی ۲- رقت 10^{-8} ، ۳- رقت 10^{-6} ، ۴- رقت 10^{-4} ۵- رقت 10^{-1}

تائید محصول: برای تائید نهائی، محصول بدست آمده برای تعیین توالی به شرکت سینا ژن ارسال گردید، و توالی زیر بدست آمد:

DNA sequence product (E.coli O157H7) 556 bp
CGAGGGCTTGATGTCTATCAGGCGCGTTTTGACC
ATCTTCGTCTGATTATTGAGCAAAATAATTTATAT
GTGGCCGGGTTCGTTAATACGGCAACAAATACTT
TCTACCGTTTTTCAGATTTTACACATATATCAGTG
CCCGGTGTGACAACGGTTTCCATGACAACGGACA
GCAGTTATACCACTCTGCAACGTGTCGCAGCGCT
GGAACGTTCCGGAATGCAAATCAGTCGTCACTCA
CTGGTTTCATCATATCTGGCGTTAATGGAGTTCAG
TGGTAATACAATGACCAGAGATGCATCCAGAGCA
GTTCTGCGTTTTGTCACTGTCACAGCAGAAGCCTT
ACGCTTCAGGCAGATACAGAGAGAATTTCGTCAG
GCACTGTCTGAAACTGCTCCTGTGTATACGATGA
CGCCGGGAGACGTGGACCTCACTCTGAACTGGGG
GCGAATCAGCAATGTGCTTCCGGAGTATCGGGGA
GAGGATGGTGTCAGAGTGGGGAGAATATCCTTTA
ATAATATATCAGCGATACTGGGGACTGTGGCCGT
TATACTGA

بحث

هدف اصلی در این تحقیق راه اندازی روش PCR برای تشخیص E.coli O157H7 بود. زیرا، این روش نسبت به روش‌های موجود نظیر کشت از سرعت و دقت بیشتری برخوردار است. جداسازی و تشخیص میکروارگانیسم‌های یکی از موضوعات بسیار مهم در بهداشت عمومی محسوب می‌گردد. در حال حاضر تشخیص میکروبها با دو روش کلی سنتی و مدرن انجام می‌گیرد. روشهای سنتی روش هایی هستند که غالباً وقت‌گیر بوده و علی‌رغم کم هزینه بودن همواره برای میکروب شناسان مشکل‌ساز می‌باشند. این خلاء بویژه در مواقعی که اعلام سریع نتایج از نظر پزشکی و اقتصادی حائز اهمیت است، بیشتر احساس می‌گردد(۱۰). اساس این روش ها عموماً کشت باکتری در محیط های مختلف و تولید کلنی‌های قابل رویت در یک محیط جامد انتخابی و انجام آزمایشات بیوشیمیایی در محیط های مایع است. در مورد برخی باکتری ها حتی مجبور به استفاده از مراحل پیش غنی‌سازی، غنی‌سازی، و کشت در محیط جامد انتخابی می‌باشیم. خوشبختانه با کشف روش های سریع تشخیص این مشکلات تا حد زیادی مرتفع گردیده است. این روش ها دارای سرعت و دقت بسیار بالا بوده و با کمک آنها در زمان بسیار کمتری میکروارگانیسم مورد نظر شناسایی می‌گردد(۳). Hill معتقد است هر یک از این روش ها نیازمند آزمایشگاه های مجهز و کارشناسان مجرب می‌باشند و هزینه‌های نسبتاً بالایی را در بر دارند و هر یک از آنها دارای محاسن و نقاط ضعف خاصی هستند، با این وجود استفاده از تکنیک‌هایی همچون PCR و ELISA بتدریج جایگاه خود را در تشخیص میکروارگانیسم‌ها به خوبی پیدا نموده‌اند(۱۱). روش کشت سنتی روش استاندارد تشخیص میکروارگانیسم ها بوده که در آن فقط سلول های زنده تشخیص داده می شوند. این روش شامل یک کشت غنی سازی از میکروارگانیسم می باشد و بدنبال آن کشت خطی روی محیط های اختصاصی انجام می گیرد . البته در بعضی از موارد نمونه بطور مستقیم روی محیط اختصاصی کشت داده می شود. تشخیص میکروارگانیسم در این روش با استفاده از خصوصیات مورفولوژیک کلونی های تک صورت می گیرد و جهت تأیید تشخیص از تست های بیوشیمیایی و یا ایمیونولوژیکی استفاده می شود .

ممکن است تست های اختصاصی فاکتورهای حدت هم انجام شود . روش کشت سنتی اگر چه حساس است اما غالباً چند روز طول می کشد. علاوه بر زمان بر بودن ، این روش نیازمند کار فشرده است و در نتیجه روشی پر زحمت می باشد. پیشرفت های بیوتکنولوژی باعث تغییر روش های آزمایش گردیده است و امروزه روش هایی استفاده می گردد که اختصاصی تر، سریعتر و غالباً حساس تر از روشهای سنتی می باشد. این روش ها تحت عنوان روش های سریع نامیده می شود. لفظ روش های سریع تا ۲۰ سال قبل در متون وجود نداشته است و در حقیقت تا زمان پیشرفت های بیوتکنولوژی رشد این روش ها شتاب نگرفته بود. تعریف دقیق روش سریع عبارتست از روشی که قادر باشد نتایج فوری بدهد. اما امروزه روش های سریع معمولاً به روش هایی گفته می شود که زمان ارزیابی در آن کوتاه باشد و اغلب شامل اصلاحات و تغییرات در یک روش می باشد. به عبارت دیگر هر روشی که بتواند مدت زمان آنالیز را به زمانی کمتر از روش کشت سنتی کاهش دهد ، از نظر تکنیکی روش سریع نامیده می شود و بنابراین تمام روش های جدید توسعه یافته و در حال توسعه را می توان بعنوان روش های سریع دسته بندی کرد. با توجه به موارد فوق با طراحی پرایمراختصاصی اقدام به بسط روش PCR برای شناسایی E.coli O157H7 نمودیم. بررسی نرم افزار مولکولی پرایمر ژن stx2A معرفی شده در این تحقیق نسبت به پرایمرهای ارایه شده در دیگر مقالات از اختصاصیت بیشتری برخوردار است. پروتکل ارایه شده برای PCR با این پرایمرها بیشتر برای دستگاه های جدید مانند Real – Time PCR می‌باشد. همچنین، برای افزایش حساسیت آزمایش از پروب استفاده نموده‌اند(۹) که به‌دلیل عدم وجود گسترده این دستگاه ها در کشور ما، انجام این روش‌ها میسر نیستند. در این تحقیق برای افزایش حساسیت و اختصاصیت آزمایش از پروب استفاده نشد بلکه با تغییر غلظت مواد مصرفی در واکنش و نیز تغییر دماها و سیکل های واکنش توانستیم E.coli O157H7 را شناسایی نماییم. نتایج آزمایشات مختلف با ژنوم باکتری های دیگر، غیر ازE.coli O157H7، نشان داد که این پرایمر با هیچ یک از آنها واکنش نشان نمی‌دهد. در نهایت با این تحقیق توان شناسایی E.coli O157H7 با استفاده از دستگاه های موجود و با رنگ آمیزی اتیدیم بروماید در ژل آگارز و بدون نیاز به پروب با حساسیت و اختصاصیت قابل قبول حاصل گردید.

نتیجه گیری

در نهایت پیشنهاد می گردد با توجه به تغییرات گوناگونی که امروزه در فنوتیپ باکتری های پاتوژن چه به صورت طبیعی و چه به صورت دستکاری های ژنتیکی و عمدی صورت می گیرد و باعث اختلال در تشخیص این باکتری ها به روش های سنتی می شود، از روش های مولکولی که سریع تر و دقیق تر نیز می باشند استفاده گردد. همچنین تشخیص همزمان چندین عامل باکتریایی توسط روش PCR از آن جهت که در زمان و هزینه مواد مصرفی صرفه جویی می شود می تواند به عنوان جایگزین روشهای متداول که بسیار وقت گیر و پرهزینه هستند مورد استفاده قرار گیرد.

REFERENCES

1. Bergdoll, M.S. (2002) Foodborne bacterial pathogens, Marcel Dekker New York, USA.

2. Hara-Kudo, J. et al, (2003). Flourogenic and chromogenic media, the rapid technique for isolation of V.cholera, J. Appl. And Eviron. Mic., 67: 5819-23.

3. Tavakoli HR, Bayat, M.and Kosha M. ,(2008). Application of Chromogenic media for rapid detection water and food- borne pathogens, American-Eurasian Journal, 4(6):693 – 99.

4. Vanderzant, C., Splittstoesser, D.F. (2004) Compendium of methods for the microbial evaluation of foods, Third Edition, APHA, USA.

5. Marshall, Robert T. (2003), Standard methods for the examination of dairy products, Sixteenth Edition, APHA, USA.

6. Manafi, M., Romans, H., Geissler, K.M. (2005). Quantative Determination of total Coliforms and E.coli in marine waters with chromogenic and flourogenic media. J. Appl. Bacteriol, 98: 280-285.

7. 10- Pitkanen T, Paakkari P, Miettinen IT, Heinonen-Tanski H, Paulin L, Hanninen ML,(2007). Comparison of media for enumeration of coliform bacteria and Escherichia coli in non-disinfected water. Journal of Microbiological Methods, 68 (3):522-529.

8. Sambrook J. & Russell David W: Molecular cloning (a laboratory manual). Gold Spring.4 th ed Apendix, 2001. P: 1, 4, 6, 8, 9, 11.

9. Park Y, Lee S, Kim Y, (2006). Detection of Escherichia coli O157:H7, Salmonella spp., Staphylococcus aureus and Listeria monocytogenes in kimchi by multiplex polymerase chain reaction (mPCR). J Microbiol, Feb; 44(1):92-7.

10. 32- Hill, W.E, (2004). The use of PCR technique for detection of Food-borne. J. of Food Mic., 18:1191-99.

۱۱. آدامز ، ام . آر ، ترجمه سیدعلی مرتضوی ، میکروبیولوژی غذایی ، انتشارات دانشگاه مشهد، ۱۳۸۴.