

شناسایی ژن *inva* برای شناسایی درصد آلودگی به سالمونلا در لاشه‌های طیور با استفاده از PCR

هیوا کریمی دره‌آبی^{۱*}، مهرداد کریمی^۲، کیوان ابراهیمی محمدی^۳

تاریخ دریافت: ۹۰/۱۲/۵ تاریخ پذیرش: ۹۱/۳/۱۵

چکیده

سالمونلا یکی از مهمترین عوامل مسمومیت مواد غذایی در دنیا می باشد که در موارد زیادی از لاشه‌های طیور و فرآورده‌های گوشت طیور جداسازی شده است. آلودگی سالمونلایی در لاشه‌های طیور می تواند بیشتر به دلیل آلودگی تقاطعی لاشه‌ها با عوامل آلوده کننده، عدم شستشوی کافی لاشه‌ها، آلودگی خط کشتار و عدم نگهداری لاشه در درجه حرارت پایین در زمان توزیع باشد. در این مطالعه برای بررسی میزان آلودگی سالمونلایی در لاشه‌های طیور، از ۶۰ لاشه طیور توزیع شده در سطح سنجند بدور از هر گونه آلودگی ثانویه نمونه برداری کرده و با روشهای میکروبی متداول کشت شده و با استفاده از PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. برای جداسازی سالمونلا با استفاده از PCR ژن اختصاصی جنس سالمونلا *Inva* بررسی شد. نتایج حاصل از روش PCR نشان داد که ۱۶/۶۶ درصد لاشه‌های طیور دارای آلودگی سالمونلا بودند. این مطالعه نشان داد که میزان شیوع آلودگی سالمونلایی در لاشه‌های طیور توزیع شده در سطح سنجند بالا می‌باشد

واژگان کلیدی: سالمونلا، لاشه طیور، آلودگی تقاطعی، PCR

مقدمه

امروزه میزان عفونت‌ها و مسمومیت‌های منتقل شونده از راه مواد غذایی، بخصوص در کشورهایی که سطح بهداشتی پایین دارند رو به گسترش است و موجب خسارات اقتصادی و انسانی فراوان گردیده است (۱). سالمونلوز شایع‌ترین نوع مسمومیت غذایی در جهان بوده و طیور به ویژه مرغ از مهمترین منابع آلودگی سالمونلا به شمار می‌روند. نظر به پژوهش‌های محققین و اطلاعات آماری، پرندگان بیش

از دام‌ها در انتقال و انتشار سالمونلاها دخالت دارند. در آمریکا حدود ۳۷/۶ درصد سالمونلاهای جدا شده منشأ طیوری داشته‌اند (۱۱). از سوی دیگر بررسی‌های انجام گرفته در برخی کشورها میزان شیوع آلودگی سالمونلا در مرغداری‌ها را تا ۶۸/۹ درصد گزارش کرده‌اند و اغلب سالمونلاهای جدا شده از طیور، انسان را نیز آلوده می‌نمایند. آلودگی سالمونلایی در انسان به صورت مسمومیت غذایی، گاستروانتریت، تب تیفوئید و گاهی اوقات سپتی سمی بروز می‌کند (۱۶). مواد غذایی با منشأ دامی منبع مناسبی برای رشد سرو تیپ‌های سالمونلا بوده و از این لحاظ منبع آلودگی سالمونلاهای غیر تیفوئیدی انسان می‌باشند (۱۷). غذاهایی از قبیل گوشت ماکیان و محصولات گوشتی منشأ ایجاد کننده

۱- استادیار، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سنجند، سنجند، ایران

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات اراک، اراک- ایران

۳- استادیار، گروه علوم صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مهاباد، مهاباد، ایران

*- پست الکترونیکی نویسنده مسئول: Hiva60iran@yahoo.com

سیستسین منتقل، سپس لوله‌های SC در ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شدند. لوله‌های کدر در مرحله دوم به وسیله ورتکس تکان داده شده و با استفاده از لوپ تلقیح در پلیت‌های حاوی محیط کشت جامد انتخابی *Salmonella shigella agar* کشت خطی داده و در ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری شدند. برای تأیید کلونی‌های حاصله آنها را بر روی محیط کشت‌های افتراقی LIA (Lysine , TSI (Triple sugar iron agar) و iron agar) و اوره برده و سالمونلا را تشخیص داده و ثبت گردید. از کلنی‌هایی که در روش کشت مرسوم به عنوان باکتری جنس سالمونلا مورد شناسایی قرار گرفته بود، با استفاده از کیت استخراج DNA از شرکت سیناژن DNA پرگنه‌ها استخراج گردید و به عنوان الگو در آزمایش m-PCR مورد استفاده قرار گرفت. تست PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل: buffer (میکرولیتر ۲/۵)، Taq (میکرولیتر ۰/۵) (Fermentase)، Mgcl2 (میکرولیتر ۱/۵)، dNTPs (میکرولیتر ۱)، هر کدام از پرایمرها به میزان (میکرولیتر ۱) و DNA استخراج شده از هر نمونه به میزان (میکرولیتر ۳). پرایمرهایی که برای شناسایی ژن *invA* مورد استفاده قرار گرفته‌اند در جدول ۱ آمده است. تکثیر ژن هدف در ترموسایکلر با برنامه سیکلهای حرارتی شامل مرحله شروع در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل شامل ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ ثانیه، ۵۶ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه صورت گرفت. در این بررسی از نشانگر bp ۱۰۰ جهت مشخص نمودن اندازه باندها استفاده گردید. محصول نهایی در ژل آگاروز ۲٪ حاوی اتیدیوم بروماید مورد الکتروفورز قرار گرفت و سپس با استفاده از ژل داگ که با اشعه UV کار می‌کند باندهای تولید شده مورد بررسی قرار گرفت.

سالمونلوزیس ناشی از مصرف مواد غذایی در انسان هستند (۲). سروتیپ‌هایی مانند سالمونلاتیفی و سالمونلا پارا تیفی بیش‌تر با انسان سازگار بوده و در میزبان‌های غیرانسانی بیماری ایجاد نمی‌کنند. بعضی از سویه‌های سالمونلا به عنوان سویه‌های مشترک نام برده می‌شوند که می‌توانند بهداشت عمومی را تهدید نمایند و احتمال انتقال سالمونلاهای مقاوم و دیگرپاتوژن‌های باکتریایی مشترک بین انسان و دام را باعث شوند (۶). بررسی‌های انجام شده در سالمونلوزیس حاصل از مصرف گوشت قرمز و طیور نشان می‌دهد که در اپیدمیولوژی سالمونلوزیس، گوشت طیور آلوده یکی از منابع مهم آلودگی می‌باشد که انسان از طریق عمل آوری نادرست مواد غذایی باعث اشاعه آن می‌گردد (۱). امروزه روشهای مولکولی و استفاده از PCR به دلیل حساسیت و ویژگی بالا و سرعت در تشخیص نمونه‌های آلوده در مواد غذایی ابزار مناسب در تشخیص‌های میکروبیولوژی می‌باشند. هدف از انجام این مطالعه ارزیابی درصد آلودگی لاشه‌های طیور توزیع شده در سطح شهرستان سنندج با استفاده از روش کشت استاندارد و تأیید آن با روش PCR بود.

مواد و روش کار

در این مطالعه ۶۰ نمونه گوشت طیور توزیع شده در سطح شهرستان سنندج را در شرایط استریل نمونه برداری شد. نمونه برداری از قسمت‌های مختلف گوشت به همراه چربی هر لاشه به میزان ۵۰ گرم صورت گرفت و در شرایط استریل و در مجاورت یخ به آزمایشگاه ارسال گردید. در آزمایشگاه میکروبیولوژی ۲۵ گرم از نمونه‌های اخذ شده را به بطری‌های حاوی ۲۲۵ میلی لیتر لاکتوزبراث انتقال داده و به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شدند. بعد از بهم زدن بطریها به میزان ۱ میلی لیتر از هر بطری با رعایت شرایط سترون به لوله‌های محتوی ۱۰ میلی لیتر آبگوشت سلنیت

جدول ۱- مشخصات پرایمرهای مورد استفاده جهت شناسایی جنس سالمونلا

پرایمر	توالی نوکلئوتیدی	ژن هدف	اندازه محصول (bp)
S139-F	GTGAAATTATCGCCACGTTTCGGGCAA	invA	284
S141-R	TCATCGCACGTCAAAGGAACC		

بحث

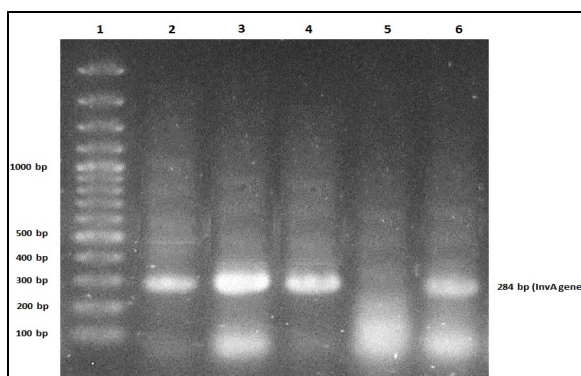
باکتری سالمونلا سالهاست که عامل بیماری روده‌ای شناخته شده‌اند و به عنوان مهمترین عامل مسمومیت غذایی قابل گزارش مطرح بوده و بررسیهای انجام شده در سالمونلوزیس حاصل از مصرف گوشت قرمز و طیور نشان می‌دهد که گوشت طیور آلوده یکی از منابع مهم آلودگی می‌باشد که انسان از طریق عمل آوری نادرست باعث اشاعه آن می‌گردد. سالمونلا را می‌توان در مناطق مختلف جغرافیایی پیدا کرد چون عوامل مختلفی از جمله انواع پستانداران، پرندگان، خزندگان و حشرات می‌توانند ناقلین سالمونلا بوده و باعث گسترش آلودگی در انواع مواد غذایی مصرفی شوند. استفاده از PCR به عنوان یک روش سریع و دقیق با ویژگی و حساسیت بالا باعث می‌شود که شناسایی و جداسازی عوامل مسمومیت زا در مواد غذایی به طور سریع و دقیق صورت گیرد (۲۴). با معرفی روش PCR مسیر جدیدی برای شناسایی میکروارگانیسم‌ها ایجاد شده است. در مطالعه حاضر، از این روش در تشخیص آلودگی سالمونلایی در مقایسه با روش معمول کشت میکروبی استفاده گردید.

نتایج حاصل از این مطالعه با بررسی ژن اختصاصی جنس سالمونلا *invA* نشان داد که میزان آلودگی در لاشه‌های طیور عرضه شده در منطقه ۱۶ می‌باشد. نتایج این مطالعه با بیشتر نتایج حاصل از مطالعات دیگران تطابق دارد. Steers و همکاران (۱۹۹۶) در یک مطالعه نشان داد که ۲۰ درصد لاشه‌های طیور توزیع شده در ترکیه دارای آلودگی به سالمونلا می‌باشد.

Machado (۱۹۹۰) میزان آلودگی لاشه‌های طیور توزیع شده در پرتغال را ۵۷ درصد، Bokanyi و همکاران (۱۹۹۰) این آلودگی را در لاشه‌های طیور توزیع شده در بازارهای اهایو ۴۳ درصد و از سوی دیگر Izat (۱۹۹۰) درصد آلودگی به سالمونلا را در

نتایج

باکتریهای جنس سالمونلا، در قسمت مورب لوله‌های TSI، قلیا (قرمز) و در قسمت تحتانی این لوله‌ها، اسید (زرد) همراه با سولفید هیدروژن و گاز تولید می‌کنند. همچنین این باکتریها، در قسمت تحتانی لوله‌های LIA، قلیا (ارغوانی) همراه با H₂S و گاز تولید می‌نمایند. در مرحله بعد برای اطمینان از جداسازی سالمونلا، همچنین مشاهده نتایج سایر آزمایشات بیوشیمیایی از آگارهای اوره نیز استفاده شد. در این تحقیق، از ۶۰ نمونه لاشه طیور تازه توزیع شده در سطح شهرستان سنجند بعد از انجام تستهای روتین میکروبیولوژی با استفاده از محیط کشت جامد اختصاصی و محیط‌های تفریقی تعداد ۱۱ مورد آلوده به سالمونلا تشخیص داده شدند که بعد از استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNA شرکت ژن فن آوران و انجام آزمایش تائیدی PCR مشخص شد که از ۱۱ نمونه مورد تائید شده به وسیله روشهای سنتی، ۱۰ (۱۶/۶۶ درصد) مورد سالمونلا مثبت بوده و دارای ژن *invA* بودند (تصویر ۱).



تصویر ۱- نتیجه آزمایش PCR با استفاده از پرایمر اختصاصی ژن *InvA* به طول ۲۸۴ جفت باز. ستون ۱: نشانگر ۱۰۰ bp DNA- ستون ۲، ۳، ۴: نمونه‌های مثبت سالمونلا- ستون ۵: کنترل منفی - ستون ۶: کنترل مثبت سالمونلا.

نتایج حاصل از این تحقیق نشان دهنده آلودگی بالای لاشه‌های طیور توزیع شده در منطقه به سالمونلا بوده که این می‌تواند تهدیدی برای سلامت مصرف کننده باشد. حال بهترین روش برای کاهش میزان آلودگی لاشه‌های طیور به آلودگی سالمونلایی را می‌توان به تولید خوراک دام عاری از سالمونلا، جلوگیری از آلودگی‌های تقاطعی، نظارت کافی بر مراحل مختلف کشتارگاه‌های طیور بخصوص نقاط بحرانی از جمله چیلرهای آبی، نظارت لازم بر توزیع و نگهداری لاشه‌های طیور اشاره کرد.

منابع

- ۱- رضوی‌ر، و. (۱۳۸۲): میکروبی‌های بیماریزا در مواد غذایی و اپیدمیولوژی مسمومیت‌های غذایی. انتشارات دانشگاه تهران، چاپ دوم، شماره ۲۴۳۱، صفحه ۲-۱.
- 2- Amavisit, P., Browning, G.F., Lightfoot, D., Anderson, C.S. (2001): Rapid PCR detection of *Salmonella* in horse faecal samples, *Veterinary Microbiology*. 79: 63-74.
- 3- Baumgartner, A., Heimann, P., Schmid, H., Liniger, M., Simmel, A. (1992): *Salmonella* contamination of poultry carcasses and human Salmonellosis. *Archiv. f.r Leben.*, 43: 123-12.
- 4- Bokanyi, R.P., Stephens, Jr. J.F., and Foster, D.N. (1990): Isolation and characterization of *Salmonella* from broiler carcasses or parts. *Poultry Science* 69:592-598.
- 5- Capita, R., Alonso-Calleja, C., Garcia-Fernandez, M.C., Moreno. M. (2002): Trisodium Phosphate (TSP) treatment for decontamination of Poultry. *Food. Science Technol*og Institute. 8:11-24.

لاشه‌های طیور منجمد توزیع شده در ایالت‌های مرکزی آمریکا ۲۹ درصد نشان داد. این در حالیست که zhao و همکاران (۲۰۰۱) درصد آلودگی در لاشه‌های طیور عرصه شده در ایالت واشینگتن آمریکا را تنها ۴ درصد گزارش نمودند.

Cason و همکاران (۲۰۰۴) در بررسی خود بر روی ۱۴۰ نمونه مرغ، ۱۲ نمونه آلوده تشخیص و نسبت آلودگی ۸/۶٪ گزارش شد. Baumgartner و همکاران (۱۹۹۲) بیان نمودند که در بیشتر کشورها میزان درصد آلودگی به سالمونلا در گوشت طیور در حدود ۱۳/۷ تا ۶۶ درصد می‌باشد این نتایج نشان دهنده گسترش وسیع این عامل بیماریزا می‌باشد که می‌تواند به طور جدی سلامت مصرف کننده را تهدید نماید. شیوع بالای آلودگی لاشه‌های طیور به سالمونلا می‌تواند به علت بالا بودن درصد آلودگی طیور به سالمونلا قبل از کشتار، آلودگی لاشه‌ها در حین کشتار، آلودگی تقاطعی لاشه‌های طیور کشتار شده به مدفوع و یا وسایل آلوده و یا تفاوت در روش‌های تشخیص و شناسایی سالمونلا در مواد غذایی باشد، که امروزه با استفاده از روش‌های تشخیصی مولکولی میزان دقت در تشخیص آلودگی‌های مواد غذایی در حد بالایی افزایش یافته است. آلودگی لاشه‌های طیور در حین مراحل کشتار از جمله در مرحله چیلرهای آبی می‌تواند به علت عدم رعایت موازین بهداشتی، عدم تعویض بموقع آب چیلرهای آبی و یا عدم کلر زنی آب مورد استفاده در این چیلرها باشد، به صورتی که یک لاشه طیور آلوده به سالمونلا می‌تواند باعث آلودگی دیگر لاشه‌های طیور غوطه ور در چیلر شده و در نتیجه میزان آلودگی لاشه‌های توزیع شده به سالمونلا را افزایش دهد. سرد کرد ناقص غذا، پخت ناقص غذا، مصرف ماده غذایی خام آلوده و آلودگی تقاطعی که در آن مواد غذایی آماده مصرف در اثر تماس با مواد غذایی خام آلوده به طور مستقیم و غیر مستقیم آلودگی پیدا می‌کند، از مهمترین عوامل مسمومیت سالمونلایی هستند (۱).

- 6- Cason, J., Berrang, M., Buhr, R., Cox, N (2004): Effect of pre-chill fecal contamination on numbers of bacteria recovered from broiler chicken carcasses before and after immersion chilling. *J. Food. Protection* 67:1829-1833.
- 7- Center For Disease Control and Prevention (Cdc). (1996): *Salmonella* surveillance, annual summary, Atlanta, Georgia, USA.
- 8- Cunningham, F.E., Cox, N.A (1987): *Microbiology of Meat*. 1st ed. Academic Press INC. p. 193-205.
- 9- Fratamico, P. M. (2003): Comparison of culture, polymerase chain reaction (PCR), TaqMan *Salmonella* and Transia card *Salmonella* assays for the detection of *Salmonella* in naturally-contaminated ground chicken, and ground beef. *Molucdam Cell. Probes*. 17: 215-221.
- 10- Herikstad, H., Motarjemi, Y., Tauxe, R.V (2002): *Salmonella* surveillance: a global survey of public health serotyping. *Epidemiological. Infection*; 129: 1-8.
- 11- Herrera-León, S., McQuiston, J. R., Usera, M. A., Fields, P. I., Javier Garaizar, J., Echeita, M. A (2004): Multiplex PCR for Distinguishing the Most Common Phase-1 Flagellar Antigens of *Salmonella* spp. *Journal of Clinical Microbiology*; 42: 2581-2586.
- 12- Izat, A.L., Kopek, J. M., McGinnis, J. D. (1991): Incidence, numbers, and serotypes of *Salmonella* on frozen broiler chickens at retail. *Poultry Science* 70:1438-1440.
- 13- Kong, R.Y.C., Lee, S.K.Y., Law, T.W.F., Law, S.H.W., R.S.S. Wu, R.S.S (2002): Rapid detection of six types of bacterial pathogens in marine waters by multiplex PCR, *Wat. Res.* 36: 2802-2812.
- 14- Machado, J., Bernardo. F. (1990): Prevalence of *Salmonella* in chicken carcasses in Portugal. *Journal of Applied Bacteriol* 69:477-480.
- 15- Malorny, B., Bunge, C., Helmut, R. (2007): A realtime PCR for detection of *Salmonella* Enteritidis in poultry meat and consumption eggs. *Journal of Microbiol Methods*. 70: 245-251.
- 16- Malorny, B., Hoorfar, J., Bunge, C., Helmuth, R. (2003): Multicenter Validation of the Analytic Accuracy of *Salmonella* PCR: toward an international standard. *Appl. Environmoat of Microbiology*. 69: 290-296.
- 17- Puente, J. L., Alvarez-Scherer, V., Gosset, G. and Calva, E., (1989): Comparative Analysis Of The *Salmonella* Typhi And *Escherichia Coli* Ompc Genes. *Gene*, 83, 197-206.
- 18- Rahn, K.; De Grandis, S.A.; Clarke, R.C. Et al. - Amplification of an invA gene sequence of *Salmonella* typhimurium by PCR as a specific method of detection of *Salmonella*. *Molecul cell Probes*, 6: 271-279, 1992.
- 19- Soumet, C., Ermel, G., Rose, N., Rose, V., Drouin, P., Salvat, G., Colin, P (1998): Evaluation of a multiplex PCR assay for simultaneous identification of *Salmonella* sp., *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium from environmental swabs of poultry houses, *Lett. Applied. Microbiology*. 28: 113-117.
- 20- Steers and Heifers, (2013) U.S. Department of Agriculture, Food Safety Inspection Service, Washington D. C., [Internet, www]. Address. :<http://www.fsis.usda.gov/OPHS/baseline/steer>.
- 21- Vantarakis, A., Komninou, G., Venieri, D. And Papapetropoulou, M., (2000): Development of A Multiplex Pcr

Detection of *Salmonella* Spp. And *Shigella* Spp. In Mussels. Lett. Applid Microbioly, 31, 105–109.

22-Ziemer, C. J., Steadham, S. R. (2003): Evaluation of the specificity of *Salmonella* PCR primers using various intestinal bacterial species. Lett. Applid. Microbioly., 37, 463.