مجله علمی- پژوهشی زیست فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی
بهار ۱۳۹۱، دوره چهارم، شماره دوازدهم، صفحه ۴۲-۳۵

شناسایی وتفکیک دقیق *سالمونلا انتریتیدیس* جدا شده از مراکز پرورش و نگهداری پرندگان ایران با استفاده از روش Multiplex PCR

میترا صالحی [۱]، مرضیه ع-نم نم [۲]، نادر مصوری [۳]

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران
۲. کارشناس ارشد دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران
۳. عضو هیات علمی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، حصارک- کرج، ایران

نویسنده مسئول: مرضیه ع- نم نم. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، گروه میکروبیولوژی، تهران، ایران. me.namnam@yahoo.com

دریافت: ۹۱/۱/۲۵ پذیرش: ۹۱/۳/۲۸

چکیده

زمینه و هدف: بیشترین گونه‌های سالمونلا که از افراد آلوده جدا گردیده سالمونلا انتریکا *سروار انتریتیدیس* می‌باشد. هدف از این مطالعه جداسازی و شناسایی *سالمونلا انتریتیدیس* جدا شده از لاشه و مدفوع پرندگان مختلف با استفاده از روش مولتی پلکس **PCR** می‌باشد.

روش بررسی: نمونه های مورد مطالعه در این پژوهش، از لاشه یا مدفوع جوجه های ۹ روزه موجود در مرغداری های شمال و غرب کشور و همچنین مدفوع یا لاشه پرندگان مختلف مانند عقاب طلایی،قو،غاز،فلامینگو موجود در چند مرکز نگهداری پرندگان در شهر تهران جمع آوری شدند. تفکیک اولیه‌ی ایزوله‌ها از طریق روش‌های میکروبیولوژی صورت گرفت. جهت شناسایی دقیق جنس و گونه، **DNA** ژنومی ایزوله‌ها و سویه‌ی استاندارد سالمونلا توسط پرایمرهای اختصاصی به روش **Multiplex-PCR** مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته ها: نتایج حاصل از شناسایی کلنی‌ها به روش متداول میکروبیولوژی نشان داد که ۱۱/۶۹٪ از کل پرندگان مورد بررسی، آلوده به باکتری سالمونلا می‌باشند. در مقایسه و بررسی نتایج حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در همه‌ی نمونه‌ها باند مربوط به جنس مشاهده شد در حالی که فقط در۳۴/۲۱٪ از آنها با اطمینان *سالمونلا انتریتیدیس* وجود داشت.

نتیجه‌گیری: براساس نتایج این تحقیق، روش **MPCR** به‌علت استفاده از پرایمرهای اختصاصی جنس و گونه‌ی *سالمونلا انتریتیدیس*،در مقایسه با روش‌های باکتریولوژیک و **PCR**، برای تشخیص وتفکیک *سالمونلا انتریتیدیس* ازسایر گونه‌های سالمونلا و نیز سایر انتروباکتریاسه‌ها، دقیق‌تر، سریع‌تر و اختصاصی‌تر است. لذا استفاده روش مولکولی**MPCR** برای کنترل عفونت‌های سالمونلایی و جلوگیری از گسترش بیماری در بین تمام پرندگان کمک شایانی خواهد نمود.

واژه‌های کلیدی: پرندگان، ژنوم، سالمونلوز، *سالمونلا انتریتیدیس*، مولتی پلکس **PCR**

www.SID.ir

مقدمه

جنس سالمونلا در بر گیرنده‌ی باسیل‌هایی است که به طور عمده انگل روده‌ای شمار زیادی از گونه‌های مهره‌دار از جمله انسان می‌باشند. این باکتری سبب تب روده‌ای، گاستروانتریت، سپتی سمی با یا بدون جراحت موضعی می‌شود و نیز می‌تواند در افراد به حالت حامل درآید(1). متجاوز از 2500 *سروار سالمونلا انتریکا* مشخص شده است (2). بیشترین گونه‌های سالمونلا که از افراد آلوده جدا گردیده *سالمونلا انتریکا سروار انتریتیدیس* می‌باشد که دارای زیادترین گزارش‌ها در مطالعات پیشین می‌باشند(5-3). *سالمونلا انتریتیدیس* به طور خاموش تخمدان‌های مرغ‌های به ظاهر سالم را قبل از شکل‌گیری پوسته‌ی تخم‌مرغ آلوده می‌نماید. حال اگر، این تخم‌مرغ به صورت خام یا نیم‌پز خورده شود، باکتری موجب بیماری می‌گردد (6). بیماری حاصل از *سالمونلا انتریتیدیس* از طریق غذا منتقل می گردد و مشکل تهدید کننده‌ی حیات در سراسر جهان است. فرآورده‌های ماکیان یک مخزن قابل توجّه برای سالمونلا و مهمّترین منبع در عفونت انسانی می‌باشند. سازمان بهداشت جهانی (WHO) تخمین زده است که سالانه 1/3 میلیارد مورد از التهاب معدی روده‌ای حاد یا اسهال به علت سالمونلوز غیر تیفوئیدی با 3 میلیون مرگ رخ می‌دهد. ارزیابی موقعیت سالمونلوز در کشورهای در حال توسعه به علت هدف محدود مطالعات و نبود سیستم‌های نظارت اپیدمیولوژیکی منطبق، معمولاً سخت می‌باشد (7، 8). عفونتهای سالمونلا در جوجه ها به عنوان یک مشکل بزرگ جهانی مطرح شده است و روش های مختلف کنترل آن در سراسر دنیا پیگیری می‌شود. زیان‌های اقتصادی اساسی به خاطر مرگ ومیر و رشد ضعیف جوجه‌های آلوده و نیز خطر ایجاد مسمومیت غذایی در انسان‌ها بروز کرده‌اند. عفونت اغلب در شرایط بهداشتی ضعیف و فقر غذایی بدتر می‌شود (9، 10). از آنجایی که شناسایی سالمونلای موجود در غذا با روش‌های کشت مرسوم به 4 تا 5 روز نیاز دارد، لذا لزوم استفاده از تکنیک‌های سریع‌تر و با دقت بالاتر برای شناسایی این باکتری احساس می‌گردد. تکنیک‌های ژنتیکی مانند Multiplex- PCR در تشخیص گونه‌های خاص و نیز تهیه‌ی اطلاعات بیشتراز بخشی از ژن در حال توسعه می‌باشند(13-11).این در حالی است که در PCRهای پیشین، نمونه‌هایی که به دو روش PCR و M PCR تهیه شده بودند، با هم مقایسه می‌شدند (14). بنابراین، هدف از این مطالعه، استفاده از واکنش زنجیره‌ی پلی‌مراز چندتایی به عنوان روش اصلی برای تشخیص و شناسایی *سالمونلا انتریتیدیس* جدا شده از لاشه و مدفوع پرندگان مختلف موجود در مراکز پرورش و نگهداری طیور می‌باشد.

روش بررسی

نمونه برداری: نمونه های مورد مطالعه در این پژوهش، از لاشه یا مدفوع جوجه های 9 روزه موجود در مرغداریهای شمال و غرب کشور و همچنین مدفوع یا لاشه پرندگان مختلف مانند عقاب طلایی، شاه بوف،طاووس، قو، بلدرچین، کبک، غاز، کبوتر، شترمرغ، فلامینکو، مرغ مینا موجود در مراکز علمی و تفریحی مانند موزه دارآباد و جهاد دانشگاهی شهر تهران جمع آوری شدند. نمونه‌های مدفوع بلافاصله بعد از نمونه‌گیری به محیط‌های غنی کننده مانند سلنیت F انتقال یافته و به مدت 12-8 ساعت در دمای 37 درجه‌ی سلسیوس قرار داده شدند. برای جداسازی اولیه از محیط مک کانکی آگار Mac-Conkey (agar)استفاده شد. از محیط ذکر شده بر روی محیط‌های اختصاصی و افتراقی مثل Xylose lysine deoxycholate) (agar) XLD agar و SS agar (Salmonella and Shigella (agarکشت داده شدند. بعد از گرماگذاری به مدت 24 ساعت در 37 درجه‌ی سلسیوس، پرگنه‌های مشکوک به سالمونلا انتخاب و در شرایط استریل بر روی محیط‌های افتراقی TSI (Triple sugar iron agar)،Urea، Simon's Citrate،MR VP (Methyl red vogesproskauer)، SIM (agar، Lysin iron agar، کشت داده شده و پس از 24-18 ساعت انکوبه شدن در دمای 37 درجه سلسیوس، واکنش‌های حاصل بررسی و با جدول تشخیصی انتروباکتریاسه مقایسه گردیدند (15).

PCR: برای انجام عمل PCR، باکتری از محیطTSIدر محیط آبگوشت LB (لوریا برتانی) کشت داده و به مدت 24 ساعت در گرم‌خانه با دمای 37 درجه‌ی سلسیوس قرار داده شد.

استخراج DNA: در این پژوهش برای جداسازی DNA باکتری از کیت ساخت شرکت Metabion استفاده گردید. در هر بار PCR، برای کنترل وتأیید عدم آلودگی مواد مورد استفاده، از شاهدی با عنوان کنترل PCR استفاده گردید. برای اطمینان از صحیح بودن مراحل استخراج نیز از سویه‌ی

www.SID.ir
Archive of SID

استاندارد S*almonella typhimurium*ATCC14028 به عنوان باکتری شاهد استفاده شد.

پرایمرها: برای تشخیص ژن‌های مربوط به جنس و گونه‌ی انتریتیدیس در سالمونلاها از پرایمرهای ST 11، ST 15، S1، S4 استفاده گردید(16) ، که این پرایمرها از شرکت Metabion تهیه شدند و ردیف بازهای آنها به شرح زیر می‌باشد(جدول1).

جدول 1. توالی پرایمرهای مورد استفاده برای تعیین جنس و گونه‌ی انتریتیدیس در سالمونلاهای جدا شده از پرندگان آلوده

		Sequences $5^{\rightarrow}3^{'}$	Target gene
ST 11	Genus *Salmonella*	**GCC AAC CAT TGC TAA ATT GGC GCA**	Random sequence*
ST 15		**GGT AGA AAT TCC CAG CGG GTA CTG G**	
S1	*S. enteritidis*	**GCC GTA CAC GAG CTT ATA GA**	Spv**
S4		**ACC TAC AGG GGC ACA ATA AC**	

* = Randomely cloned sequencespecific for the genus *Salmonella*** = *Salmonella* plasmid virulent gene

آماده کردن مخلوط اصلی: برای جلوگیری از تلف شدن معرف‌ها، افزایش دقت عمل، کاهش موارد انتقال معرف‌ها و در نتیجه امکان آلودگی کمتر مخلوطPCR(Mix PCR) با توجّه به حجم واکنش 25 میکرولیتری برای هر نمونه، برای نمونه‌های مورد آزمایش در هر روز تهیه می‌شد. بنابراین، برای تعیین حجم واکنش، تعداد نمونه‌ها را با احتساب شاهد مثبت، منفی و PCR در نظر گرفته و حجم نهایی آن‌ها، با در نظر گرفتن یک نمونه بیشتر برای تهیه‌ی مخلوط PCR محاسبه می‌گردید. پس از محاسبه‌ی مقادیر، مواد را به ترتیب جدول 2 در داخل تیوب 0/5 سی‌سی (به استثنای DNA الگو) ریخته و بدین صورت مخلوط PCR تهیه می‌شد. تیوب‌ها به مدت چند ثانیه در دور پایین ورتکس شده تا به خوبی با هم مخلوط گردیدند. سپس از تیوب حاوی محلول PCRMix به میزان 24 میکرولیتر در تیوب‌های 0/2 سی‌سی که قبلاً شماره‌ی نمونه‌ها روی درپوش آن‌ها نوشته شده بود، ریخته و از DNA مربوط به نمونه به میزان 1 میکرولیتر به هر تیوپ اضافه شد. در انتها، لوله‌ها در دستگاه ترموسیکلر قرار داده می‌شدند.

جدول 2. نحوه ی محاسبه ی مواد مورد نیاز برای تعیین همزمان جنس و گونه انتریتیدیس در سالمونلاها، با استفاده از PCR

مخلوط مواد PCR	مقدار مواد برای یک نمونه(µl)
آب دوبار تقطیر و دیونیزه	15/5
10PCR CompletBufferX	2/5
مخلوط (dNTP) 10میلی مولار	1
پرایمر (forward) ST 11	1
پرایمر(reverse) ST 15	1
پرایمر(forward) S1	1
پرایمر(reverse) S4	1
10X *Taq* DNA polymerase	1
DNA نمونه	1
حجم کلی بر حسب µl	25

برنامه‌ی سیکل حرارتی جهت تکثیر ژن‌های مربوط به تعیین جنس و گونه ی سالمونلا انتریتیدیس در دستگاه ترموسایکلر: واکنش PCR برای تکثیر ژن‌های یاد شده به منظور شناسایی میزان شیوع آن، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی جدول 1 طبق برنامه‌ای که جزئیات آن در جدول 3 آورده شده به اجراء گذاشته شد.

جدول شماره 3 . برنامه‌ی دستگاه ترموسایکلر مربوط به تعیین جنس و گونه سالمونلا انتریتیدیس در این تحقیق

مرحله	نگهداری پایانی	ساخت پایانی	تعداد سیکل	ساخت	اتصال	واسرشت	واسرشت اولیه
دما (^{0}C)	4	72	30	72	55	94	94
زمان	-	10 min		30s	1 min	30s	5 min

Archive of SID

www.SID.ir

نحوه‌ی الکتروفورز فرآورده‌های PCR: قبل از انجام الکتروفورز محلول‌های مورد نیاز (بافر TAE 50x و1x)، ژل آگارز و محلول اتیدیوم بروماید جهت رنگ آمیزی، آماده گردیدند. درصد ژل مورد استفاده در این تحقیق 1 درصد بود. پس از آماده شدن ژل، سینی ژل را در جای مخصوص آن در تانک قرار داده و تانک به وسیله‌ی بافر TAE1x پر می‌شد به طوری که 2-3 میلی‌متر از بافر روی ژل را هم می‌پوشاند. فرآورده‌های PCR را به نسبت 5 به 1 با Loading buffer ساخت شرکت Fermentas مخلوط کرده به داخل چاهک‌ها انتقال داده می‌شدند که البته بسته به نوع شانه، مقدار متفاوت بود. به میزان 5 میکرولیتر نیز از نشان‌گر 1000 جفت بازی ساخت شرکت Fermentas در چاهک اول ریخته می‌شد. در این تحقیق از ولتاژ 100 ولت و جریان 80 میلی‌آمپر برای الکتروفورز استفاده گردید. بعد از حدود 40-30 دقیقه و زمانی که رنگ مربوط به Loading buffer دو سوم از طول ژل را پیمود، برق سیستم را قطع کرده و ژل برای رنگ‌آمیزی در داخل اتیدیوم بروماید (0/5 تا 1 میکروگرم در میلی‌لیتر) به مدت 20-10 دقیقه (بسته به درصد ژل و کهنه و تازه بودن رنگ) قرار می‌گرفت و پس از شستشو در آب، بر روی دستگاه ماوراء بنفش (UVidoc) قرار داده و توسط دوربین مخصوص و چاپگر، عکس ژل را تهیه و نتایج بررسی می‌گردید(16).

یافته ها

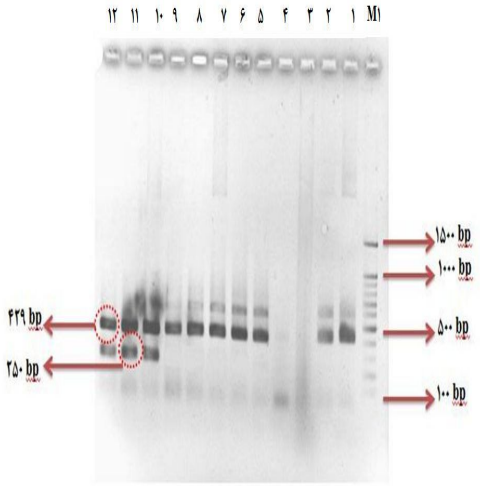
325 نمونه مورد مطالعه در این پژوهش، از چند مرکز نگهداری پرندگان در شهرهای مختلف ایران جمع‌آوری شدند و توسط آزمون‌های تشخیصی مانند خصوصیات مورفولوژیکی، رنگ آمیزی گرم، تولید پیگمان و تست‌های بیوشیمیایی مورد ارزیابی قرار گرفتند. سویه‌های جدا شده شامل جنس‌های پروتئوس، سیتروباکتر، سالمونلا بودند(جدول4).

جدول 4. میزان سویه‌های جدا شده در روش‌های میکروبیولوژی

سویه های ایزوله شده	تعداد	درصد
سالمونلا	38	%11/69
پروتئوس	161	%49/53
سیتروباکتر	89	%27/38
سایر انتروباکتریاسه ها	37	%11/38

در گام دوم 38 سویه‌ی سالمونلا برای بررسی همزمان جنس و گونه *سالمونلا انتریتیدیس* PCRMultiplex شدند. محصول افزایش یافته 429 جفت باز مربوط به تعیین جنس در کلیه‌ی نمونه‌هایی که در روش میکروبی سالمونلا تشخیص داده شده بودند (100 درصد)،مشاهده گردید(شکل 1، تمام ستون‌ها). در 34/21 درصد نمونه‌ها باندهای 429bp مربوط به تعیین جنس سالمونلا و باند 250bp مربوط به تعیین گونه‌ی *سالمونلا انتریتیدیس* دیده شد. بنابراین،مشاهده‌ی همزمان دو باند مربوط به جنس(429bp) و گونه(250bp)،وجود *سالمونلا انتریتیدیس* در این نمونه‌ها را بدون تکرار مجددPCR اثبات می‌نماید(شکل1و 2). در 65/79 درصد از نمونه های PCR شده تنها باند 429bp مربوط به تعیین جنس مشاهده شد و به نظر می رسد این نمونه ها گونه های دیگری از سالمونلا بوده باشند(شکل2 ستون 4).

شکل 1. ستونM : نشانگر 15kb، ستون 1- سویه‌ی استاندارد 14028 تیفی موریوم، ستون 2 - انتروباکتر (کنترل منفی)، ستون‌های 3 الی 9- گونه‌های سالمونلا انتریتیدیس



www.SID.ir

شکل 2. ستون M1 نشانگر 15kb، ستون 1- Salmonella typhimuriumATCC14028، ستون 2 - Salmonella typhimuriumPTCC1709، ستون 3 -انتروباکتر (کنترل منفی)، ستون 4 –*سالمونلا تیفی*، ستون‌های 5 الی 9 - *سالمونلا تیفی موریوم*، ستون‌های 10 الی 12 –*سالمونلا انتریتیدیس*

بحث

طیور یکی ازمهم‌ترین مخازن سالمونلا می‌باشند که می‌توانند باکتری را از طریق زنجیره‌ی غذایی به انسان منتقل کنند. طبق گزارش‌های منتشره، شایع‌ترین سروتیپ‌هایی که سبب بیماری در انسان می‌شوند، *سالمونلا انتریتیدیس* و *سالمونلا تیفی موریوم* هستند (17). شناسایی گونه‌های سالمونلا توسط آژانس‌های نظارتی صورت می‌گیرد و هنوز به طور عمده بر پایه‌ی تکنیک‌های استاندارد میکروبیولوژی که ممکن است 5 تا 7 روزبرای تأیید نتایج به طول انجامند، استوار است(۱۴،۱۸). از آنجایی که کنترل عفونت در بین طیور به طور فزاینده‌ای به دسترسی سریع و آزمون‌های تشخیصی دقیق برای مانیتورینگ بستگی دارد(2)و به علت نزدیکی مورفولوژیک *سالمونلا انتریتیدیس* با سایرگونه‌های سالمونلا و منحصر به فرد نبودن تظاهرات بالینی سالمونلوز، لزوم استفاده از تکنیک‌هایی با کارآیی بالاتر از روش‌های سنتی کشت احساس می‌شود. علاوه بر این تنوع ژنومی نقش مهمی را در شناسایی باکتری‌ها ایفا می‌کند. بنابراین استفاده از تکنیک‌های مولکولی که قادر به تشخیص تنوع ژنومی در سویه‌های مختلف هستند، لازم و ضروری به نظر می‌رسد (19). مطالعه‌ی حاضر به بررسی ایزوله‌ها توسط پروتکلMPCR و مقایسه‌ی آن با تکنیک‌های استاندارد میکروبیولوژی مورد استفاده بر روی لاشه و مدفوع پرندگان گوناگون که از چندین شهر مختلف ایران جمع‌آوری شده، پرداخته است. تعداد کل سالمونلاهای جدا شده به وسیله‌ی تکنیک‌های استاندارد میکروبیولوژی در این مطالعه 38 عدد یعنی 11/69% بود. امّا با این روش و بدون به‌کارگیری روش‌های تایپینگ بر اساس روش سرولوژیک به خاطر هزینه‌ی بالا و ایجاد واکنش متقاطع در زمان انجام سروتایپینگ و نیز به این علت که واکنش بیوشیمیایی اکثر سروتیپ‌های سالمونلا به جز چند سویه شبیه یکدیگر می‌باشند، شناسایی با استفاده از این تکنیک‌ها تنها به تشخیص جنس محدود گردید (14). حساسیت بالای روش PCR نسبت به کشت باکتریولوژیک می‌تواند به عوامل مختلفی که توسط Gallien و همکاران توضیح داده شده، نسبت داده شود (20). یکی از مواردی که از حساسیت بالای PCR به شمار می‌رود، توانایی آن در تکثیر و تشخیص مقادیر بسیار اندک DNA الگو می‌باشد. همچنین با استفاده از این روش زمان لازم برای تشخیص که البته با یک کشت خالص اولیه همراه است به یک یا دو روز کاهش می‌یابد(2). علاوه براین PCR مزیت‌های دیگری نیز نسبت به آزمایش اسلاید آگلوتیناسیون با آنتی سرم‌های پلی‌والان دارد، زیرا سروگروه کردن زمانی که سالمونلاهای جداسازی شده فاقد آنتی ژن O (سویه‌های خشن) یا فاقد هر دو آنتی‌ژن O و H باشند غیرممکن است(21). در این مطالعه ابتدا هر یک از دو جفت پرایمر انتخابی (ST 11، ST15 ، S 1، S 4) به صورت جداگانه همراه باDNA سویه‌های جداشده، توسط PCR مورد آزمایش قرار گرفتند تا از تولید محصول PCR با اندازه‌ی مورد انتظار و نیز عدم تولید محصولات اضافی یا غیر اختصاصی دیگر اطمینان حاصل شود. پرایمرهای ST 11وST15 توسط Aabo و همکارانش از توالی‌هایی که در تمام سروتیپ‌های سالمونلا حضور مکرر داشته‌اند، برای تعیین جنس در این مطالعه به کار گرفته شد. نکته قابل توجه، عدم وجود این قطعه تکثیر شده‌ی 429 جفت بازی در باکتری‌های دیگر بوده است. نتایج حاصل با گزارش‌هایSoumetو همکاران و نیز Pan وLui تطابق داشت(1، 16).

از ژن spv *سالمونلا انتریتیدیس* که دارای توزیع محدود در میان سروتیپ‌های سالمونلا می‌باشد، پرایمرهای S 1 وS 4 انتخاب گردید. قطعه تکثیر شده‌ی 250 جفت بازی برای *سالمونلا انتریتیدیس* مورد توجه قرار گرفت و با نتایج بدست آمده توسط Wood وهمکاران ،Soumet و همکاران ،Nashwa و همکاران و اکبرمهر و همکاران همخوانی داشت (2، 16، 22، 23). برای بالا بردن سرعت و دقت آزمایش از روش MPCR استفاده گردید. برای این منظور، هر دو جفت پرایمر به طور همزمان با DNA هر یک از سویه‌های جداشده مخلوط وسپسPCR شد (6، 13، 19، 25). استفاده از روش PCR معمولی نیز باعث تکرار، موجب اتلاف زمان و افزایش استفاده از مواد لازم برای PCR و به موازات آن افزایش هزینه‌هامی‌شود. لذا، با توجّه به یافته‌های به دست آمده و مطالعات پیشینیان، می‌توان گفت که تکنیک PCR معمولی از سرعت بالا و هزینه‌ی کم‌تری جهت شناسایی و جداسازی سویه‌های سالمونلا در مقایسه با روش‌های سنتی کشت برخوردار است ولی قدرت تمایز کافی ولازم و نیز دقت و سرعت MPCR را ندارد. علاوه‌براین، تشخیص *سالمونلا انتریتیدیس* با

Archive of SID
www.SID.ir

این روش در مدّت 2 روز در مقابل 5 تا 6 روز روش‌های باکتریولوژیک و سرولوژیک انجام گرفت. با استفاده از روش MPCR، ژن‌های متعدد می‌توانند در یک واکنش منفرد PCR تقویت شوند و به عنوان یک روش پر سرعت در کمتر از 3 ساعت موجب تمایز *سالمونلا انتریتیدیس* از سایر گونه‌های سالمونلا شوند. مطالعات انجام گرفته در کشورهای دیگر، شیوع سالمونلا در لاشه‌ی طیور را با درصد آلودگی در محدوده‌ی 3 تا 66 درصد گزارش داده‌اند (10، 25). در یک مطالعه‌ی صورت گرفته در ایالات متحده از 25 نمونه گرفته شده از روده و مدفوع پرندگان وحشی 24 درصد آن ها سالمونلا بوده‌اند (26). نتایج ما در این محدوده قرار داشتند. همچنین یافته‌های Ramyaو همکاران حاکی از شیوع بالای *سالمونلا انتریتیدیس* در مزارع مرغ بوده است(31). البته این نتایج به روش‌های به کار رفته شده نیز بستگی دارند، به عنوان مثال بسیاری از محققین که از روش‌های دیگری به جز کیت برای استخراج DNA استفاده نموده اند، از محیط غنی کننده‌ی MS RV برای حذف عوامل مهارکننده‌ی موجود در نمونه ها استفاده نموده‌اند(16،۲۸،۲۷). علاوه براین، به‌نظر می‌رسد شیوع گونه‌های مختلف سالمونلا به موقعیت جغرافیایی و نوع مصرف مواد غذایی نیز بستگی دارد (29). سروتیپ‌های غالب و عمده در کشورهای مختلف نیز متفاوت می‌باشند. اما سالمونلا تیفی موریوم به اندازه ی سالمونلا انتریتیدیس شایع نمی‌باشد(30). همچنین بررسی باندهای حاصل از الکتروفورز سویه‌های استاندارد و ایزوله‌های دامی با اندازه‌های مورد نظر معلوم ساخت که پرایمرهای به کار رفتهدر این مطالعه اختصاصی می‌باشند و علاوه بر کاهش زمان در شناسایی سالمونلا انتریتیدیس، از دقت بالایی نیز برخوردارند.

بررسی‌های صورت گرفته در این مطالعه فرکانس پایینی از سالمونلا انترتیدیس جدا شده از پرندگان تحقیقات صورت گرفته توسطMtshaliو همکاران(2012) میزان پایین (6% مثبت) گونه های سالمونلا - جداسازی شده از پرندگان مختلف - را نشان داده است(31)، نتایج یکسان توسط محققان دیگر گزارش شده است، به‌عنوان مثال در مطالعه ی دیگری که روی پرندگان وحشی منحصر به‌فرد نگهداری شده در قفس صورت گرفت ، هیچ یک از پرندگان، ناقل گونه‌های سالمونلا نبودند (32). بررسی های صورت گرفته در این مطالعه در این راستا (13/72% مثبت)قرار داشت.این در حالی است که میزان سالمونلا انتریتیدیس جدا شده از پرندگان آبزی مانند فلامینگو، اردک، قو و ... - که در برخی از مراکز در کنار هم نگهداری می‌شوند - بالاتر از (20/83% مثبت) سایر پرندگان بوده است. مطالعه‌ی صورت گرفته توسط Wobeserو همکاران (1997) نیز میزان بالای جداسازی گونه‌های مختلف سالمونلا از پرندگان آبزی را گزارش داده است (33). مطالعات زیادی نیزدر این زمینه در ایران صورت گرفته است که بیشتر محدود به مرغ و فرآورده‌های آن بوده و به علت دسترسی کمتر به سایر پرندگان، غیر بومی بودن برخی از آن‌ها، عدم حضور همه آن‌ها در اکثر مناطق ایران به آن‌ها به استثنای گنجشک،توجّه کمتری شده است (37-34). علت توجه به گنجشک می‌تواند به خاطر حضور این پرنده در بیشتر مناطق ایران و نیز حضور آن در مناطق نگهداری مرغ و جوجه چه به صورت صنعتی و چه به صورت سنتی و یا باغچه های روستایی باشد. این عدم توجه به سایر پرندگان در حالی است که در ایران مراکز علمی و تفریحی مانند باغ‌های پرندگان که گونه‌های زیادی از پرندگان مختلف در آن زندگی می‌کنند، وجود دارند که نباید ار آن‌ها غافل شد. زیرا بروز عفونت در یک گروه از آن‌ها می‌تواند سبب شیوع بیماری در سایر پرندگان شود، از سوی دیگر، تماس با پرندگان وحشی نیز موجب پخش آلودگی در سطح وسیع‌تری گردد.زیرا شواهد باکتریولوژیک و مولکولی نشان می‌دهند که پرندگان وحشی می‌توانند موجب انتقال عفونت به انسان و طیور شوند. این گزارش‌ها حاکی از حضور سویه‌های سالمونلا در این پرنده‌ها می‌باشند (38). در نتیجه تشخیص *سالمونلا انتریتیدیس* در مزارع پرورش و نگهداری پرندگان و همچنین پرندگان آزاد زی نشان می‌دهد که باید اقدامات لازم برای پیشگیری و جلوگیری از انتشار *سالمونلا انتریتیدیس* در میان پرندگان صورت پذیرد. لذا کنترل با کیفیت و پر سرعت آلودگی با استفاده از تکنیک‌های قابل اطمینان مولکولی مانند MPCR، در این مراکز لازم و ضروری به نظر می رسد.

نتیجه‌گیری

براساس نتایج این تحقیق، روش MPCR به علت استفاده از پرایمرهای اختصاصی جنس و گونه‌ی *سالمونلا انتریتیدیس*،در مقایسه با روش‌های باکتریولوژیک و PCR، برای تشخیص و تفکیک *سالمونلا انتریتیدیس* از سایرگونه‌های سالمونلا و نیز سایر انتروباکتریاسه‌ها ، دقیق‌تر، سریع‌تر و اختصاصی‌تر بود. لذا استفاده روش مولکولیMPCR برای کنترل عفونت‌های سالمونلایی و جلوگیری از گسترش بیماری در بین تمام پرندگان، به‌خصوص در مراکز پرورش و نگهداری پرندگان و

Archive of SID
www.SID.ir

طیور کمک شایانی خواهد نمود.

تشکر و قدر دانی

بدین وسیله از مسئولین محترم مجتمع آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال که در تأمین امکانات لازم جهت انجام این تحقیق اینجانبان را یاری نمودند، به خصوص از حسن همکاری و مساعدت‌های فراوان سرکار خانم مهندس رویا رضوی پور، کمال تشکر به عمل می‌آید.

Reference

1- Tikoo A, Tripathi AK, Verma SC, Agrawal N, Nath G. *Application of PCR fingerprinting techniques for identification and discrimination of Salmonella isolates***.** Current Science. 2001; 80 (8): 1049-1052.

2- Beuzón CR, Schiaffino A, Leori G, Cappuccinelli P, Rubino S, Casadesús J. *Identification of Salmonella abortusovis by PCR amplification of a serovar-specific IS200 element.* Appl Environ Microbiol. 1997; 63(5):2082-5.

3- Patrick ME, Adcock PM, Gomez TM, Altekruse SF, Holland BH, Tauxe RV, Swerdlow DL. *Salmonella enteritids*infection, United States, 1985-1999. Emerg. Infect. Dis.2004; 10 (1): 1-7.

4- Usera, MA, Popovic T, Bopp CA Strockbine, NA 1994. *Molecular subtyping of Salmonella enteritidis phage type 8 strains from the United States*. J ClinMicrobiol. 1994; 32(1): 194–198.

5- Wang SJ, Yeh DB, Wei CI. *Specific PCR Primers for the Identification of Salmonella enterica Serovar Enteritidis in Chicken-Related Samples.* J FOOD DRUG ANAL. 2009; 17 (3):183-189.

6- Moussa IM, Gassem MA, Al-Doss AA, Mahmoud WA, Abdel Mawgood AL. *Using molecular techniques for rapid detection of Salmonella serovars in frozen chicken and chicken products collected from Riyadh, Saudi Arabia*. Afr. J. Biotechnol. 2010; 9 (5): 612-619.

7- Maripandi A, Al-Salamah AA. *Analysis of Salmonella enteritidis Outer Membrane Proteins and Lipopolysaccharide Profiles with the Detection of Immune Dominant Proteins*. Am. J. Immunol. 2010; 6(1): 1-6.

8- Maripandi A, Al-Salamah AA. *Multiple antibiotic resistance and plasmid profiles of Salmonella enteritidis isolated from retail chicken meats*. Am. J. Food Technol. 2010; 5 (4): 260-268.

9- Konrad H, Smith PB, Dilling GW, John KH. *Production of Salmonella serogroup D (O9- specific enzyme-linked immunosorbant assay antigen.* Am J Vet Res. 1994; 55 (12): 1647-1651.

10- Zhao C, Ge B, Villena JD, Sudler R, Yeh E, Zhao s.*Prevalence of Campylobacter spp., Escherichia coli, and SalmonellaSerovars in Retail Chicken, Turkey, Pork, and Beef from the Greater Washington, D.C., Area.Appl. Environ. Microbiol.* 2001*;* 67 (12): 5431-5436.

11- Herrera León S, McQuiston JR, Usera MA, FieldsPI, GaraizarJ, Echeita MA. *MultiplexPCR for distinguishing the most common phase-1 flagellar antigens of Salmonella spp.*J. Clin. Microbiol. 2004; 42 (6): 2581-2586.

12- Herrera León S, Ramiro R, Arroyo M, Díez R, Usera MA, Echeita MA. *Blind comparison of traditional serotyping with three multiplex PCRs for the identification of Salmonella serotypes.* Res Microbiol. 2007; 158 (2): 122-127.

13- Porwollik S, BoydEF,Choy C, Cheng P, Florea L, Proctor E, McClellandM. *Characterization of Salmonella enterica Subspecies I Genovars by Use of Microarrays*. J Bacteriol. 2004; 186 (17): 5883–5898.

14- Stone GG, Oberst RD, Hays MP, McVey S, Chengappa MM.*Detection of Salmonella serovars from clinical samples by enrichmentbroth cultivation-PCR procedure*. J. Clin. Microbiol. 1994; 32(7):1742-1749.

15- Koneman EW, Allen SD, Janda WM,Scchreckenberger PC, Winn Jr WC. *Color atlas and text book of diagnosticmicrobiology*. 5th ed. Philadelphia:Lippincott; 1997; pp:171-230.

16- Soumet C, Ermel G, Rose N, Rose V, Drouin P, Salvat G, Colin P. *Evaluation of a multiplex PCR assay for simultaneous identification of Salmonella sp., Salmonella enteritidis and Salmonella typhimurium from environmental swabs of poultry houses.*LettApplMicrobiol. 1999 ; 28 (2): 113- 117.

17- Aktas Z, Martin D, Kayacan CB, Diren S , Threlfall EJ.*Molecular characterization of Salmonella Typhimurium and SalmonellaEnteritidis byplasmid analysis and pulsed-field gelelectrophoresis.* Inter. J. Antimicrob. Agent. 2007; 30 (6): 541-545.

18- Mirzaie S, Hassanzadeh M, Ashrafi I. *Identification and characterization of Salmonella isolates from captured house sparrows*. Turk. J. Vet. Anim. Sci. 2010; 34 (2): 181-186.

19- Mirzaie S, Hassanzadeh M, Ashrafi I. *Identification and characterization of Salmonella isolates from captured house sparrows*. Turk. J. Vet. Anim. Sci. 2010; 34 (2): 181-186.

20- Helmy NM, Mahmoud AH, Adawy SS. *Application of Multiplex Polymerase Chain Reaction (MPCR) for Identification and Characterization of Salmonella enteritidis and Salmonella Typhimurium*. J. Appl. Sci. Res. 2009; 5(12): 2343-2348.

Archive of SID

www.SID.ir

21- Gallien P, Dorn C, Alban G, Staak C, Protz D. *Detection of Brucella species in organs of naturally infected cattle by polymerase chain reaction.*Vet Rec. 1998; 142(19): 512-514.
22- Hoorfar J, Baggesen DL, Porting PH. *A PCR-based strategy for simple and rapid identification of rough presumptive Salmonella isolates.*J Microbiol Methods. 1999; 35(1):77-84.
23- Nashwa, M H, Mahmoud AH. and Sami. AS. *Application of Multiplex Polymerase Chain Reaction (MPCR) for Identification and Characterization of Salmonella enteritidis and Salmonella Typhimurium*. J. Appl. Sci. Res. 2009; 5(12): 2343-2348.
24- Akbarmehr J, ZahraeiSalehi T. and NikbakhtBrujeni GH**.** *Identification of Salmonella isolated from poultry by MPCR technique and evaluation of their hspgroEL gene diversity based on the PCR-RFLP analysis.* Afr J microbial. 2010; 4(15):1594-1598.
25- Jamshidi A, Bassami MR, Afshari-Nic S. *Identification of Salmonella spp. and Salmonella typhimurium by a multiplex PCR-based assay from poultry carcasses in Mashhad- Iran.* Int.J.Vet.Res. 2009; 3 (1): 43-48.
26- Uyttendaele MR, Debevere JM, Lips RM, Neyts KD. *Prevalence of Salmonella in poultrycarcasses and their products in Belgium.* Int J Food Microbiol. 1998; 40 (1-2): 1-8.
27- Cízek A, Literák I, Hejlícek K, Treml F, Smola J. *Salmonella contamination of the environment and its incidence in wild birds.* ZentralblVeterinarmed B. 1994; 41(5):320-7
28- Widjojoatmodjo MN, FluitAC, Torensma R, VerdonkGP, VerhoefJ. *The magnetic immuno polymerase chain reaction assay for direct detection of salmonellae in fecal samples.* J ClinMicrobiol. 1992; 30(12): 3195–3199.
29- FluitAC, WidjojoatmodjoMN, VerhoefJ. *Detection of Salmonella species in fecal samples by immunomagnetic separation and PCR.* J ClinMicrobiol. 1995; 33(4): 1046–1047.
30- Moussa IM, Ashgan MH, Mahmoud MH , Al-Doss A A**.** *Rapid detection andcharacterization of Salmonella entericaserovars by multiplex polymerase chain reaction assay.* Afr. J. Biotechnol. 2012;11(14): 3452-3458.
31- Uyttendaele MR, Debevere JM, Lips RM, Neyts KD. *Prevalence of Salmonella in poultry carcasses and their products in Belgium*. Int J Food Microbiol. 1998; 340(1-2):1-8.
32- Mtshali K, Mtshali MS, Nkhebenyane JS and Thekisoe OMM. *Detection of Salmonella, Clostridium perfringens and Escherichia coli from fecal samples of captive animals at the National Zoological Gardens of South Africa* Afr. J. Microbiol. Res. 2012; 6(15): 3662-3666.
33- Gopee NV, Adesiyun AA, Caesar K. *Retrospective and longitudinal study of salmonellosis in captive wildlife in Trinidad.* J. Wildl. Dis. 2000*;* 36(2): 284–293.
34- Wobeser GA.*Diseases of wild waterfowl*. 2nd ed. Plenum Press: York Plenum Publishing Corporation; pp. 75.
35- Nayebi N, Ghorashi SA, Harzandi N, Shamsara M, Tabarai B, Bakhtiari A. *Diagnostic value of PCR method for detection of Salmonella enteritidis contamination in poultry products in Karaj*. Medical Sciences Journal of Islamic Azad Univesity.2011; 21 (1): 32-37.
36- Mirhosseini SZ,Seidavi A,Shivazad M,Chamani M,Sadeghi AA,Pourseify R.*Detection of Salmonella spp. in Gastrointestinal Tract of Broiler Chickens by Polymerase Chain Reaction.* KafkasUniv Vet FakDerg . 2009; 15 (6): 965-970.
37- EmaddiChashniSH, Hassanzadeh M, BozorgmehriFard MH, Mirzaie S.*Characterization of the Salmonella Isolates from Backyard Chickens in North of Iran, by Serotyping, Multiplex PCR and Antibiotic Resistance Analysis***.** Archives of Razi Institute. 2009; 64 (2): 77-83.
38- Dilmaghani M, Ahmadi M, Zahraei-Salehi T and Talebi AR. *Detection of Salmonella entericaSerovarTyphimurium from Avians Using Multiplex-PCR.* Veterinary Research Forum. 2011; 2(3): 157 – 165.

Archive of SID

www.SID.ir