Archive of SID

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

هیوا کریمی‌دره‌آبی[1*]، مهرداد کریمی[2]، کیوان ابراهیمی محمدی[3]

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 شتشوی کافی لاشه ها، 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 سنندج 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 سنندج بالا می‌باشد

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

مقدمه

امروزه میزان عفونت‌ها ومسمومیت‌های 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 مهمترین‌ترین منابع آلودگی سالمونلا به شمار می‌روند. نظر به پژوهش‌های محققین و اطلاعات آماري، پرندگان بیش از دام‌ها در انتقال و انتشار سالمونلاها دخالت دارند .در آمریکا حدود ۳۷/٦ درصد سالمونلاهاي جدا شده منشا طیوری داشته‌اند (۱۱). از سوی دیگر بررسی‌های انجام گرفته در برخی کشورها میزان شیوع آلودگی سالمونلا در مرغداری‌ها را تا ٦۸/۹ درصد گزارش کرده ا ند و اغلب سالمونلاهای جدا شده از طیور، انسان را نیز آلوده می‌نمایند. آلودگی سالمونلایی در انسان به صورت مسمومیت غذایی، گاستروآنتریت، تب تیفوئید و گاهی اوقات سپتی سمی بروز می‌کند (١٦). مواد غذایی با منشاء دامی منبع مناسبي 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 منشاء ایجاد کننده

۱- استادیار، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سنندج، سنندج، ایران
۲- دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم وتحقیقات اراک، اراک- ایران
۳- استادیار، گروه علوم صنایع غذایی ، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مهاباد ، مهاباد ، ایران
*- پست الکترونیکی نویسنده مسئول: Hiva60iran@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

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 نمی کنند. بعضی از سویه‌های سالمونلا به عنوان سویه‌های مشترک نام برده می شوند که می توانند بهداشت عمومی را تهدید نمایند و احتمال انتقال سالمونلاهای مقاوم و دیگرپاتوژن‌های باکتر یایی مشترک بین انسان و دام را باعث شوند (٦). 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 می باشد 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 می باشند. هدف از انجام این مطالعه ارزیابی درصد آلودگی لاشه‌های طیور توزیع شده در سطح شهرستان سنندج با استفاده از روش کشت استاندارد و تائید آن با روش PCR بود.

مواد و روش کار

در این مطالعه ٦٠ 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 ٢٤ تا ٤٨ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شدند. بعد از بهم زدن بطریها به میزان ۱ میلی‌لیتر از هر بطری با رعایت شرایط سترون به لوله‌های محتوی ۱۰ میلی‌لیتر آبگوشت سلنیت سیستئسن 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 ودر ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ٢٤ تا ٤٨ ساعت گرمخانه گذاری شدند. برای تائید کلونی‌های حاصله آنها را بر روی محیط کشت‌های افتراقی LIA (Lysine , TSI (Triple sugar iron agar) 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 شناسائی 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 اسخراج شده از هر نمونه به میزان (میکرولیتر ۳). پرایمرهائی 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 ٩٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ٦٠ ثانیه، ٥٦ 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. دراین بررسی از نشانگر bp ۱۰۰ جهت مشخص نمودن اندازه باندها استفاده گردید. محصول نهائی در ژل اگاروز۲٪ 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.

www.SID.ir

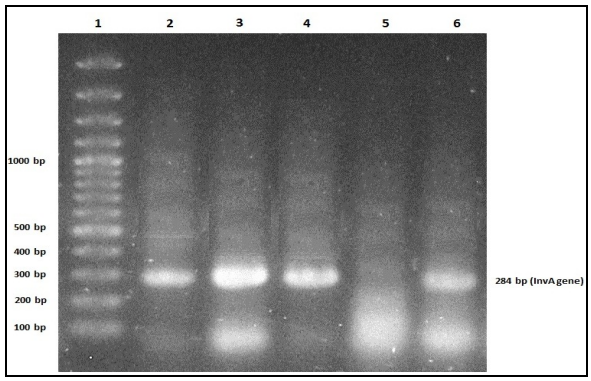
Archive of SID

جدول ۱-مشخصات پرایمرهای مورد استفاده جهت شناسایی جنس سالمونلا

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

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 می کنند. همچنین این باکتریها، در قسمت تحتانی لوله‌های LIA، قلیا (ارغوانی) همراه با H۲S و گاز تولید می‌نمایند. در مرحله بعد برای اطمینان ازجداسازی سالمونلا، همچنین مشاهده نتایج سایر آزمایشات بیوشیمیایی از آگارهای اوره نیز استفاده شد. در این تحقیق، از ٦٠ نمونه لاشه طیور تازه توزیع شده در سطح شهرستان سنندج 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 (١٦/٦٦ درصد) مورد سالمونلا مثبت بوده و دارای ژن invA بودند (تصویر۱).



تصویر ۱- تنیجه آزمایش PCR با استفاده از پرایمر اختصاصی ژن InvA به طول ٢٨٤ جفت باز. ستون ۱: نشانگرbp 100 DNA- ستون ٢،٣،٤: نمونه‌های مثبت سالمونلا- ستون ٥: کنترل منفی – ستون ٦: کنترل مثبت سالمونلا.

بحث

باکتری سالمونلا سالهاست که عامل بیماری روده‌ای شناخته شده‌اند و به عنوان مهمترین عامل مسمومیت غذائی قابل گزارش مطرح بوده و بررسیهای انجام شده در سالمونلوزیس حاصل از مصرف گوشت قرمز و طیور نشان می دهد که گوشت طیور آلوده یکی از منابع مهم آلودگی می باشد که انسان از طریق عمل آوری نادرست باعث اشاعه آن می گردد. سالمونلا را می توان در مناطق مختلف جغرافیایی پیدا کرد چون عوامل مختلفی از جمله انواع پستانداران، پرندگان، خزندگان و حشرات می توانند 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 می شود که شناسایی و جداسازی عوامل مسمومیت زا در مواد غذایی به طور سریع و دقیق صورت گیرد(٢٤).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 ١٦. ٦٦ می‌باشد. نتایج این مطالعه با بیشتر نتایج حاصل از مطالعات دیگران تطابق دارد. Steers و همکاران (١٩٩٦) 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 ٤٣ درصد و از سوی دیگر Izat (۱۹۹۰) درصد آلودگی به سالمونلا را در

www.SID.ir

Archive of SID

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 واشینکتن آمریکا را تنها ٤ درصد گزارش نمودند.

Cason و همکاران (۲۰۰٤) در بررسي خود بر روي ۱٤۰ نمونه مرغ، ۱۲ نمونه آلوده تشخیص و نسبت آلوده‌گي ۸/٦٪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 ٦٦ درصد می باشد این نتایج نشان دهنده گسترش وسیع این عامل بیماریزا می باشد 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 درحد 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 می تواند باعث آلودگی دیگر لاشه‌های طیور غو طه 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 اماده مصرف در اثر تماس با مواد غذائی خام آلوده به طور مستقیم و غیر مستقیم آلودگی پیدا می‌کند، از مهمترین عوامل مسمومیت سالمونلایی هستند (۱).

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 می توان به تولید خوراک دام عاری از سالمونلا، جلوگیری از آلودگی‌های تقاطعی، نظارت کافی بر مراحل مختلف کشتارگاهای طیور بخصوص نقاط بحرانی از جمله چیلرهای آبی، نظارت لازم بر توزیع ونگهداری لاشه‌های طیور اشاره کرد.

منابع

۱- رضویلر، و .(۱۳۸۲): میکروب‌های بیماریزا در مواد غذایی و اپیدمیولوژی مسمومیت‌های غذایی. انتشارات دانشگاه تهران، چاپ دوم، شماره ۲٤۳۱، صفحه۲-۱.

2- Amavisit, P., Browning, G.F., Lightfood, 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. Archv. 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 Technalog Institute. 8:11-24.

www.SID.ir

Archive of SID

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. Proteation 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. Mollucdam Cell. Probes. 17: 215-221.

10- Herikstad, H., Motarjemi, Y., Tauxe, R.V (2002): Salmonella surveillance: a global survey of publichelth 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 CommonPhase-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. Poultuy 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 Applgid Bacterlog 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 Microbiolg 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*. Moleculed 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. Appliyed. 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

www.SID.ir

Archive of SID

Detection of *Salmonella* Spp. And Shigella Spp. In Mussels. Lett. Applgid 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. Applgid. Microbioly., 37, 463.

www.SID.ir