Archive of SID

مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۸۷، دوره ۶۳، شماره ۱، ۴۶-۴۱

کاربرد توأم روش جداسازی ایمیونومگنتیک و واکنش زنجیره‌ای پلی مراز چندگانه‌ای جهت جستجو و ردیابی سالمونلاانتریکاتحت‌گونه انتریکاسروار تیفی موریوم در نمونه‌های مدفوع اسهالی گاو

حسن تاجبخش[۱] نعمت آتش پرور[۲] تقی زهرایی صالحی[۱]* محمد قلی نادعلیان[۳]

۱) گروه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی تهران، تهران - ایران.
۲) آموزشکده دامپزشکی دانشگاه لرستان، خرم آباد - ایران.
۳) گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی تهران، تهران - ایران.

(دریافت مقاله: ۱ شهریور ماه ۱۳۸۴ ، پذیرش نهایی: ۲۷ اسفند ماه ۱۳۸۴)

چکیده

در این تحقیق تعداد ۴۰۰ نمونه مدفوع اسهالی گاو وگوساله اخذ و به موازات آزمایش‌های متداول کشت میکروبی وسروتایپینگ، بر روی نمونه‌ها آزمایش جداسازی با ذرات آهن ربای ایمن (ایمیونومگنتیک) و واکنش زنجیره‌ای پلی مراز چندگانه‌ای انجام گرفت. برای شناسایی سالمونلاها درسطح جنس از پرایمر عمومی *inv-A* و جهت جستجو و ردیابی سرو وار تیفی موریوم از سه جفت پرایمر اختصاصی *Rfbj*، *Fljb* و *Flic* مربوط به توالی ژن‌های سنتزکننده پادگن‌های O_4، H_2:1,2 و H_1:i استفاده شد. از ۴۰۰ نمونه مدفوع اسهالی گاو وگوساله که مورد آزمایش باکتریولوژیک قرار گرفت تعداد ۳۳ مورد (۸/۲۵ درصد) سالمونلا جداگردید. سالمونلا انتریکاسروار تیفی موریوم با ۲۲ مورد (۶۶/۷ درصد)، سالمونلا دابلین با ۳ مورد (۹/۱ درصد)، سالمونلا ویرشو و سالمونلاگلوچستر هرکدام با ۲ مورد (۶/۱ درصد)، سالمونلا انتریتیدیس، سالمونلا جورجیا، سالمونلاآگوستنبورگ و سالمونلا لیندنبورگ هرکدام با ۱ مورد (۳ درصد) بالاترین فراوانی را به خود اختصاص دادند. درآزمایش PCR چندگانه‌ای با استفاده از پرایمرهای مربوطه. چهار نوع محصول افزایش یافته ۶۶۳، ۵۲۶، ۲۸۴ و ۱۸۳ جفت بازی به‌ترتیب مربوط به ژن‌های *rfbj*، *fljb*، *inv-A* و *flic* در کلیه نمونه‌های واجد سروتیپ تیفی موریوم (1,4,5,12:i:1,2) مشاهده شد. نتایج این تحقیق نشان داد که تشخیص اختصاصی سرووار تیفی موریوم با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن‌های بیان کننده پادگن‌های O_4، H_1:i و H_2:1,2 می‌تواند بسیار موفقیت‌آمیز باشد، زیرا تنها سرووار است که از بین ۲۵۵۰ سرووار سالمونلا این نوع الگوی پادگنی را دارد.

واژه‌های کلیدی: سالمونلا تیفی موریوم، ایمیونومگنتیک، PCR چندگانه‌ای، مدفوع، ژن‌های *inv-A*، *fljb*، *rfbj*.

مقدمه

عفونت‌های سالمونلایی یکی از معضلات اصلی صنعت دامپروری جهان و یکی از بیماری‌های مشترک انسان و دام است که هر ساله خسارت‌های عمده‌ای به سرمایه دامی وارد می‌کند. درحال حاضر بیش از ۲۵۵۰ سروتیپ سالمونلاشناسایی شده (۲۵) که برخی از آنها میزبان اختصاصی نداشته و در انسان و اکثر حیوانات عفونت ایجاد می‌کنند که نمونه بارز آن، سالمونلا تیفی موریوم است. این جرم که در گروه B جدول کافمن-وایت با فرمول آنتی ژنی (۱و۴و۵و۱۲:i:۱و۲) قرار دارد از تنوع میزبانی بالایی برخوردار است به‌طوری‌که در اکثر حیوانات اهلی و وحشی به عنوان شایع‌ترین سروتیپ بیماریزا و در انسان یکی از مهم‌ترین عوامل مسمومیت غذایی شناخته شده است (۱۴). به همین دلیل کاربرد آزمایش‌های سریع و قابل اعتماد در آزمایشگاه‌های تشخیص پزشکی، دامپزشکی و صنایع غذایی به منظور تشخیص سالمونلاها امری مهم و ضروری به نظر می‌رسد. از آنجا که روش‌های متداول جداسازی سالمونلاها امری پرزحمت بوده و حداقل به ۳ روز وقت نیاز دارد امروزه سعی بر این است که از روش‌های سریع اما حساس و با ویژگی بالا استفاده گردد (۱،۱۷،۱۸،۱۹،۲۳،۳۰). در حال حاضر توسعه روش‌های زیست‌شناسی مولکولی این امکان را فراهم ساخته است که بتوان با این روش‌ها با دقت و سرعت زیاد به شناسایی عوامل بیولوژیک پرداخت. در این بین واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (PCR) از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است. علی‌رغم بالا بودن حساسیت و ویژگی PCR، این روش بوسیله عوامل ممانعت کننده موجود در نمونه‌های مرضی نظیر بیلیروبین، نمک‌های صفراوی و هپارین مهار می‌گردد از اینرو حذف و یا کاهش اینگونه عوامل در مراحل آماده سازی نمونه‌های بالینی جهت آزمایش مستقیم PCR اهمیت بسزایی دارد (۲۸،۲۹،۳۴). بسیاری از محققان با رقیق نمودن نمونه سعی بر غلبه کردن این عوامل دارند که این امر با کاهش حساسیت آزمایش همراه است. در سال‌های اخیر توجه دانشمندان به استفاده از تکنیک جداسازی ایمیونومگنتیک (Immunomagnetic separation (IM و توام کردن آن با PCR که (Magnetic immuno-PCR assay, MIPA) نامیده می‌شود معطوف گشته است. روش جداسازی ایمیونومگنتیک یک روش نسبتاً نوین آزمایشگاهی جهت به دام انداختن عوامل پاتوژن از نمونه‌های بالینی است که در آن از ذرات مغناطیسی واجد پادتن‌های پلی و مونوکلونال جهت به‌دام انداختن ارگانیسم هدف و حذف عوامل مهارکننده PCR در یک نمونه استفاده می‌شود (۴،۹،۲۴،۲۹،۳۰،۳۴). هدف از انجام این بررسی کاربرد توأم روش جداسازی ایمیونومگنتیک (IMS) و PCR چند گانه‌ای با استفاده از پرایمرهای اختصاصی به منظور شناسایی سالمونلا تیفی موریوم در

*)نویسنده مسؤول: تلفن: ۶۶۴۲۷۵۱۷-۰۲۱، نمابر: ۶۶۹۳۳۲۲۲-۰۲۱، Email:tsalehi@ut.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

نمونه‌های مدفوع اسهالی گاو و گوساله بود.

مواد و روش کار

در طی این تحقیق مجموعاً ۴۰۰ نمونه مدفوع از گاو و گوساله‌های مبتلا به اسهال از گاوداری‌های صنعتی و نیمه صنعتی استان‌های تهران، گلستان و لرستان اخذ گردید. نمونه‌ها پس از جمع‌آوری در ظروف استریل و در پوشدار در شرایط ۴ درجه سانتیگراد منتقل می‌گردیدند. در هنگام نمونه‌برداری ابتدا اطلاعات مربوط به دام (نام صاحب دام یا گاوداری، آدرس، سن، جنس، نژاد، علائم بالینی، تاریخ شروع اسهال،...) در فرم‌های مربوطه ثبت، سپس به شرط عدم مصرف آنتی بیوتیک، نمونه مدفوع اخذ می‌گردید.

آماده سازی نمونه‌ها: در آزمایشگاه جهت آماده سازی، ابتدا نمونه‌ها با محلول فسفات بافر سالین (PBS,PH:7.2(1:2.5 W/V یکنواخت کرده و سپس ذرات جامد و مواد خشبی موجود در مدفوع را با استفاده از سانتریفوژ با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه رسوب داده و مایع فوقانی در ظروف استریل دیگری در دمای ۴ درجه سانتیگراد جهت آزمایش‌های بعدی نگهداری گردید.

آزمایشات کشت میکروبی و سروتایپینگ: برای جداسازی سالمونلاها ابتدا نمونه‌ها برای غنی‌سازی بر روی محیط آبگوشت سلنیت-سیستئین برده شد. بدین منظور یک میلی لیتر نمونه آماده شده را با پیپت استریل داخل محیط برده و بعد از ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، از آن بر روی محیط ژلوز مکانکی به صورت خطی کشت داده شد. بعد از یک شبانه روز در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، پرگنه‌های مشکوک (لاکتوز منفی) را بر روی محیط‌های بیوشیمیایی نظیر ژلوز TSI، اوره، سیمون سیترات، آبگوشت MRVP و محیط SIM انتقال و بعد از تأیید بیوشیمیایی، سروتیپ باکتری با روش استاندارد آگلوتیناسیون با استفاده از آنتی سرم‌های اختصاصی O و H دیفکو تعیین گردید.

آزمایشات جدا سازی ایمیونو مگنتیک: به موازات آزمایش‌های کشت میکروبی، بر روی نمونه‌ها روش جداسازی ایمیونو مگنتیک انجام گرفت. بدین منظور از ذرات تجارتی (*Salmonella* (Dynal.A.S.,Oslo ,Norway Dynabeads-anti که ذرات ۴۵۰ میکرونی متحدالشکل کروی از جنس پلی استیرن با خاصیت سوپر پارامگنتیک بودند طبق دستورالعمل پیشنهادی استفاده شد. در این روش باکتری‌های هدف با اتصال بر روی ذرات مغناطیسی که واجد پادتن‌های مونو و پلی‌کلونال علیه پادگن‌های سطحی میکروارگانیسم‌های هدف هستند توسط دستگاه تغلیظ کننده ذرات مغناطیسی (Dynal.A.S., Oslo, Norway) (Concentrator, MPC Magnetic Particle) پس از یک دوره انکوباسیون کوتاه مدت در مخلوط کن از نمونه جدا می‌گردند. پس از جداسازی ارگانیسم هدف جهت آزمایش‌های بعدی نظیر استخراج DNA و آزمایش PCR مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۹،۲۹،۳۰،۳۴).

استخراج DNA: در این بررسی استخراج DNA از سالمونلاها به روش هولمز و گوئیکلی درسال ۱۹۸۱ با تغییراتی انجام گردید (۱۶). نمونه‌های ایمیونو مگنتیک شده را به مدت ۷ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد جوشانیده و سپس در g×۶۰۰۰ به مدت ۷ دقیقه سانتریفوژ گردیدند و از مایع رویی ۱۰ میکرولیتر جهت انجام آزمایش PCR چندگانه‌ای استفاده شد.

افزوده سازی با PCR چندگانه‌ای: برای انجام آزمایش PCR چندگانه‌ای از چهارزوج پرایمر استفاده شد (جدول ۱). پرایمرهای *Rfbj*، *Flic* و *Fljb* به ترتیب از ژن‌های سنتزکننده پادگن‌های O_4، H_1:i و H_2:1,2 جهت تشخیص اختصاصی سالمونلا تیفی موریوم و نیز سایر سروتیپ‌هایی که با سالمونلا تیفی موریوم ساختار آنتی ژنیکی مشابهی دارند، مورد استفاده قرار گرفتند (۲۰). پرایمر *inv-A* از ژن مسئول تهاجم سالمونلاها (*inv*) به عنوان پرایمر عمومی جهت تشخیص سالمونلاها در حد جنس در نمونه‌ها انتخاب گردید (۲۶). از سالمونلا تیفی موریوم استاندارد (ATCC 14028) اخذ شده از انستیتو تحقیقاتی اینسبروک اتریش به عنوان شاهد مثبت استفاده شد.

آزمایش PCR چندگانه‌ای در یک واکنش حجمی ۲۵ میکرولیتری انجام گرفت: بافر PCR(-۱۰mMTris ,5mMKCl ,HCl ,PH=8.7 ,$MgCl_2$ 1.5mM)، dNTPs (200µM)، پرایمرها هر کدام (1µM)، آنزیم تگ پلی‌مراز یک واحد و DNA الگو ۱۰ میکرولیتر از نمونه استخراج شده. برنامه PCR عبارت بود از سه مرحله: مرحله اول، دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه. مرحله دوم، شامل سی سیکل و هر سیکل شامل سه گام: گام اول، دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، گام دوم، ۶۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، گام سوم، ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه. مرحله سوم، یک واسرشت نهایی ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۷ دقیقه (۲۰). واکنش PCR در یک دستگاه ترموسایکلر مدل (England Techne,TC-512,) انجام شد. محصول PCR بر روی ژل آگاروز ۱/۲ درصد الکتروفورز شد و سپس با استفاده از ترانس ایلومیناتور بعد از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید مورد مشاهده و ارزیابی قرار گرفتند.

نتایج

از ۴۰۰ نمونه مدفوع اسهالی گاو و گوساله که مورد آزمایش باکتریولوژی قرار گرفت تعداد ۳۳ مورد (۸/۲۵ درصد) سالمونلا جدا گردید. فراوانی مطلق و نسبی گروه‌های سرمی و سروتیپ‌های جدا شده در جدول ۲ نشان داده شده است. همان‌طور که آمده است گروه سرمی B با ۲۴ مورد (۷۲/۸ درصد) بالاترین فراوانی را به خود اختصاص داد. بعد از آن گروه سرمی D و C_1 هرکدام با ۴ مورد (۱۲/۱ درصد) و گروه سرمی C_2 با ۱ مورد (۳ درصد) در درجات بعدی قرار گرفتند. سالمونلا تیفی موریوم با ۲۲ مورد (۶۶/۷ درصد)، سالمونلا دابلین با ۳ مورد (۹/۱ درصد)، سالمونلا ویرشوو سالمونلا گلوچستر هر کدام با ۲ مورد (۶/۱ درصد)، سالمونلا انتریتیدیس، سالمونلا جورجیا، سالمونلا آگوستنبورگ و سالمونلا لیندنبورگ هر کدام با ۱ مورد (۳ درصد) بالاترین فراوانی را به خود اختصاص دادند.

در آزمایش PCR چندگانه‌ای پنج الگو با استفاده از پرایمرهای مربوطه

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱ - پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق .

منبع	اندازه قطعه مورد انتظار (bp)	توالی (3′----5′)	طول پرایمر (bp)	ژن هدف	پرایمر
(26)	۲۸۴	GTGAAATTATCGCCACGTTCGGGCAA	۲۶	*inv-A*	ST-۱۳۹
		TCATCGCACCGTCAAAGGAACC	۲۲		ST- ۱۴۱
(20)	۶۶۳	CCAGCACCAGTTCCAACTTGATAC	۲۴	*rfbj*	*Rfbj*
		GGCTTCCGGCTTTATTGGTAAGCA	۲۴		*Rfbj*
(20)	۱۸۳	ATAGCCATCTTACCAGTTCCCCC	۲۴	*fliC*	*Flic*
		GCTGCAACTGTTACAGGATATGCC	۲۴		*Flic*
(20)	۵۲۶	ACGAATGGTACGGCTTCTGTAACC	۲۴	*flib*	*Fljb*
		TACCGTCGATAGTAACGACTTCGG	۲۴		*Fljb*

براساس ساختار آنتی ژنیکی سروتیپ‌های موجود در نمونه‌ها مشاهده شد(تصویر۱). چهار نوع محصول افزایش یافته ۶۶۳، ۵۲۶، ۲۸۴، ۱۸۳ جفت باز به‌ترتیب مربوط به ژن‌های *rfbj*، *fljb*، *inv-A* و *flic* در کلیه نمونه‌های واجد سروتیپ تیفی موریوم (1,4,5,12:i:1,2) مشاهده شد) تصویر۱، ستون۱). درنمونه‌های واجد سروتیپ دابلین، (1,9,12:g,p:-)، انتریتیدیس (1,9,12;g,m:-) و جورجیا (6,7:b:e,n,z15) تنها یک باند ۲۸۴ جفت باز مربوط به ژن *inv-A* مشاهده شد(تصویر۱، ستون۲،۷،۸). درنمونه‌هایی که سروتیپ آگوستنبورگ (6,7:i:1,2) و یا لیندنبورگ(6,8:i:1,2) داشتند سه باند ۵۲۶، ۲۸۴ و ۱۸۳ جفت باز به‌ترتیب مربوط به ژن‌های *fljb*، *inv-A* و *flic* دیده شد(تصویر۱، ستون ۴). درنمونه واجد سروتیپ ویرشو(6,7:r:1,2) دو باند ۵۲۶، ۲۸۴ جفت باز مربوط به ژن‌های *fljb* و *inv-A* مشاهده شد(تصویر۱،ستون۳). در نمونه واجد سروتیپ گلوچستر (1,4,12(27):i:I,w) سه باند۶۶۳، ۲۸۴، ۱۸۳ جفت باز مربوط به ژن‌های *rfbj*، *inv-A* و *flic* مشاهده گردید(تصویر۱،ستون۱۰). هر چهار باند قابل انتظار، ۵۲۶، ۶۶۳، ۲۸۴، ۱۸۳ جفت باز در شاهد مثبت مشاهده شد(تصویر ۱، ستون PC).

مقایسه آماری نتایج: جدول۳ مقایسه آماری روش کشت میکروبی و آزمایش IMS+mPCR را در خصوص جستجو و ردیابی سالمونلا تیفی موریوم در نمونه‌های مدفوع اسهالی نشان می‌دهد. همان‌طور که در جدول آمده است کلیه ۲۲ جدایه سالمونلا تیفی موریوم که در آزمایش کشت میکروبی مثبت بودند در آزمایش PCR چندگانه‌ای نیز مثبت تشخیص داده شده‌اند. حساسیت و ویژگی آزمون صددرصد و ضریب همخوانی آزمون‌ها با استفاده ازضریب کاپا، یک محاسبه گردید که نشان از توافق کامل بین دو آزمون به‌کار رفته دارد(۳۱).

بحث و نتیجه‌گیری

انجام آزمایش PCR مستقیم برروی نمونه‌های بالینی مدفوع با توجه به

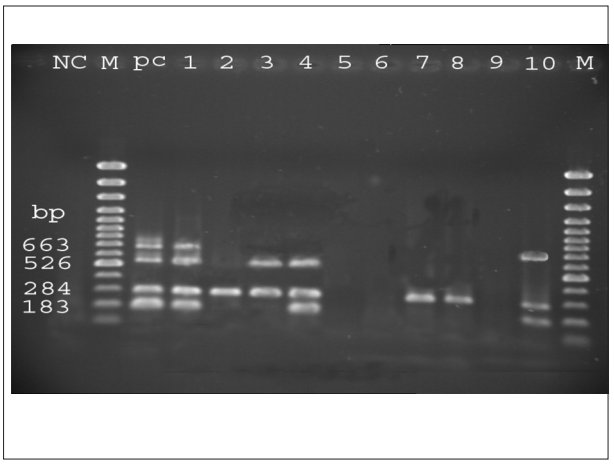
جدول ۲ - فراوانی مطلق و نسبی سروتیپ‌های جداشده از نمونه‌های مدفوع اسهالی.

گروه سرمی	تعداد	درصد	سروتیپ	تعداد	درصد
B	۲۴	۷۲/۸	سالمونلا تیفی موریوم	۲۲	۶۶/۷
			سالمونلا گلوچستر	۲	۶/۱
C1	۴	۱۲/۱	سالمونلا ویرشو	۲	۶/۱
			سالمونلا جورجیا	۱	۳
C2	۱	۳	سالمونلا آگوستنبورگ	۱	۳
			سالمونلا لیندنبورگ	۱	۳
D	۴	۱۲/۱	سالمونلا دابلین	۳	۹/۱
			سالمونلا آنتریتیدیس	۱	۳
جمع	۳۳	۱۰۰		۳۳	۱۰۰

ترکیبات مهار کننده نظیر بیلیروبین و نمک‌های صفراوی امری دشوار است(۲۸،۳۴). این ترکیبات به طور معنی‌داری حتی در غلظت‌های ۵۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم در هر میلی لیتر نمونه از PCR جلوگیری می‌کنند. انجام آزمایش PCR مستقیم بر روی اینگونه نمونه‌ها تنها زمانی امکان‌پذیر است که نمونه‌های مدفوع به حدی رقیق شوند تا غلظت عوامل مهارکننده به حداقل برسد لیکن این امر باعث کاهش حساسیت آزمایش به لحاظ کاهش تعداد باکتری‌های موجود در نمونه رقیق شده می‌گردد(۳۴). محققین زیادی استفاده از روش جداسازی ایمیونومگنتیک را به عنوان یک روش غیروابسته به رشد در تغلیظ سازی قبل از PCR و به هدف آزمایش مستقیم مورد ارزیابی قرار دادند و ادعا نمودند که در مقایسه با روش کشت استاندارد که در آن یک مرحله غنی‌سازی انجام می‌گیرد موارد مثبت واقعی مشابهی از خود نشان می‌دهد(Mansfield و Forsythe در سال۱۹۹۳)،(Fluit و همکاران درسال۱۹۹۳)،(Blackburn درسال ۱۹۹۳)و(Cudjoe و همکاران درسال ۱۹۹۵)،(Widjojoatmodjo و همکاران درسال ۱۹۹۲). در اغلب روش‌های متکی بر آزمایش PCR مستقیم جهت استخراج و خالص‌سازی DNA و به منظور حذف عوامل ممانعت کننده PCR از موادی نظیر آنزیم پرو تئیناز K، فنل - کلروفرم و رسوب با اتانل، ذرات شیشه‌ای و ژل سیلیکا استفاده می‌شود، لیکن استفاده از این روش‌ها اغلب وقت‌گیر و گران می‌باشد(۲). روشی که در بررسی حاضر جهت استخراج باکتری هدف از نمونه مورد استفاده قرار گرفت نه تنها سبب حذف عوامل مهارکننده می‌گردد بلکه در مقایسه با سایر روش‌ها کم هزینه‌تر بوده واز سرعت بیشتری نیز برخوردار می‌باشد. از طرفی ژن‌های متنوعی جهت جستجو و ردیابی جنس سالمونلاها و نیز بعضی از سروتیپ‌های خاص در آزمایش PCR به صورت منفرد و یا چندتایی مورد ارزیابی قرار گرفته است. نواحی از ژنوم سالمونلاها که در آزمایش PCR مورد استفاده قرار گرفته عبارت است از *agfA*(۱۰)، *fimA*(۸)، *hin*(۳۳)، *H-li*(۳۳)، IS200(۶)، *invA*(۷،۲۶)، *iroB*(۳)، *mkfA*(۲۷)، *ompC*(۷)، *spvR*(۲۱)، *spvC*(۷)و *viaB*(۱۵). بعضی از این روش‌ها دارای محدودیت‌هایی هستند به عنوان مثال انجام آزمایش PCR بر پایه IS200 با واکنش‌های مثبت کاذب به ویژه با سایر آنتروباکتریاسه‌ها نظیر شیگلا، اشریشیاکلی ورتوکسین‌زا، یرسینیا و لیستریا همراه بوده

www.SID.ir

Archive of SID



تصویر ۱- نتایج الکتروفورز محصولات PCR چندگانه‌ای بر روی ژل آگاروز ۱/۲ درصد: M: مارکر ۱۰۰bp، NC: شاهد منفی، PC: شاهد مثبت(typhimurium ATCC 14028 Salmonella)، ستون ۱: سالمونلاتیفی موریوم (1,4,5,12:i:1,2)، ستون ۲: سالمونلا آنتریتیدیس(1,9,12:g,m:-) ستون ۳: سالمونلا ویرشو(6,7:r:1,2)، ستون ۴: سالمونلا آگوستنبورگ(6,7:i:1,2) و سالمونلا لیندنبورگ(6,8:i:1,2)، ستون ۵،۶،۹: نمونه‌های منفی، ستون۷: سالمونلا دابلین(1,9,12:g,p:-)، ستون۸: سالمونلا جورجیا(6,7:b:e,n,z15)، ستون۱۰: سالمونلا گلوچستر[1,4,12,(27):i:l,w.].

است(۶). Hashimoto و همکاران در سال ۱۹۹۵ نیز عنوان کردند که استفاده از ژن *viaB* تنها منحصر به سالمونلا تیفی و پاراتیفی *C* است(۱۵). پرایمرهای طراحی شده از توالی ژن‌های *hin* و *H-li* تنها قادر به تشخیص سالمونلاهای متحرک می‌باشد و در خصوص سالمونلاهای غیرمتحرک نظیر گالیناروم و پولوروم مناسب نیستند(۳۳). با این حال محققین بسیاری اخیرا گزارشاتی راجع به تشخیص اختصاصی سالمونلا تیفی موریوم منتشر نمودند. Ebner و Mathew درسال ۲۰۰۱(۱۱) و Khan و همکاران در سال ۲۰۰۰(۱۸) گزارشی راجع به تشخیص اختصاصی سروار تیفی موریوم DT104 با استفاده از PCR چندگانه‌ای و استفاده از ژن‌های فلورفنیکول(*flo*)، اینتگرون(*int*)، ژن تهاجم(*invA*) و ژن حدت *spvC* منتشر نمودند. Bolton و همکاران درسال ۱۹۹۹ مشاهده کردند که ۹۸ درصد جدایه‌های سالمونلا تیفی موریوم که نامبردگان مورد بررسی قرار دادند برای ژن *invA* و ۸۸ درصد برای *spvC* مثبت می‌باشند(۵). به علاوه آنها مشاهده نمودند سایر سروتیپ‌های سالمونلا به غیر از سالمونلا تیفی موریوم واجد ژن‌های *int* و *spvC* نیز هستند. این نتایج نشان داد که تشخیص اختصاصی سالمونلا تیفی موریوم با استفاده از ژن‌های مذکور نمی‌تواند مثمر ثمر واقع شود(۵). Soumet و همکاران درسال ۱۹۹۹ نیز ادعا نمودند با به‌کارگیری ژن *fliC* که در بیان پادگن‌های تاژکی فاز اول مؤثر است می‌توان به تشخیص اختصاصی سروار تیفی موریوم دست یافت. لیکن بررسی‌ها نشان داد که استفاده به تنهایی از این ژن نیز نمی‌تواند امیدوارکننده باشد(۳۲). همچنین Echeita و همکاران درسال ۱۹۹۸ با انجام آزمایش PCR چندگانه‌ای با استفاده از ژن‌های بیان کننده فاز دوم پادگن‌های تاژکی اقدام به این مهم نمودند اما این بررسی‌ها کارگشا نبود(۱۲). در مطالعه حاضر کارایی چهار زوج پرایمر که توانایی ردیابی

جدول ۳- مقایسه آماری نتایج حاصل از آزمون IMS+Multiplex PCR با آزمایش کشت متداول میکروبی.

جمع	IMS+mPCR		کشت متداول میکروبی
	منفی	مثبت	
۲۲	۰	۲۲	مثبت
۳۷۸	۳۷۸	۰	منفی
۴۰۰	۳۷۸	۲۲	جمع

ژن‌های هدف *rfbj*، *fliC*، *fljb* و *invA* را دارند به‌طور همزمان در یک واکنش PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. این بررسی نشان داد که تشخیص اختصاصی سروتیپ تیفی موریوم با استفاده از ژن‌های بیان کننده پادگن‌های O_4، i: H_1 و H_2:1,2 می‌تواند ما را در جستجو و ردیابی سالمونلا تیفی موریوم کمک نماید زیرا تنها سروار تیفی موریوم است که از بین ۲۵۵۰ سروتیپ سالمونلا این الگوی پادگنی را دارد. این نتایج با مشاهدات Lim و همکاران درسال ۲۰۰۰ که خود از طراحان پرایمرهای مورد مطالعه در این بررسی بودند، همخوانی دارد. نامبردگان نیز توانستند با به‌کارگیری این پرایمرها و ردیابی ژن‌های هدف فوق الذکر، با موفقیت کلیه سروتیپ‌های تیفی موریوم را از سایر سروارهای سالمونلا حتی آنهایی که با سالمونلا تیفی موریوم مشابهت پادگنی داشتند از یکدیگر تفریق دهند(۲۰). در نتیجه با توجه به ضریب همخوانی آزمون‌ها، روش جداسازی ایمیونومگنتیک(IMS) و استفاده توأم آن با PCR چندگانه‌ای را می‌توان به عنوان یک روش سریع و قابل اعتماد در مقایسه با کشت میکروبی به لحاظ سرعت تشخیص بالا و نیز حساسیت و ویژگی زیاد آن برای تشخیص و شناسایی سالمونلاها در سطح جنس و سروتیپ در نمونه‌های بالینی نظیر مدفوع به‌کار برد.

تشکر و قدردانی

این مقاله از طرح تحقیقاتی شماره ۲۱۲/۶/۷۷۲ که بودجه آن از طرح تحقیقاتی قطب پاتوبیولوژی بخش میکروبیولوژی تامین شده است، استخراج گردیده. نگارندگان بر خود لازم می‌دانند مراتب تشکر و قدردانی را از وزارت علوم، تحقیقات و فناوری، شورای محترم پژوهشی دانشکده دامپزشکی و معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تهران به عمل آورند. از جناب آقای دکتر داریوش خاشابی عضو هیئت علمی موسسه اینسبروک اتریش به‌لحاظ در اختیار گذاشتن شاهد استاندارد سالمونلا تیفی موریوم قدردانی می‌شود. ضمنا از مدیریت گاوداری‌های مزرعه نمونه، رضایی و احسان نیا به لحاظ کمک در ارسال نمونه تشکر می‌گردد.

www.SID.ir

Archive of SID

References

1. Aabo, S., O. R. Rasmussen, P. D. Sorensen, and J. E. Olson.(1993)Salmonella identification by polymerase chain reaction. Mol. Cell. Probes 7:171-178.
2. AL-soud, W. a., Radstrom, P.(2000)Effects of amplification facilitators on diagnostic PCR in the presence of blood, feces, and meat. J. Clin. Microbiol. 38: 4463-4470
3. Baumler, A.J., Heiron,F., Reissbrodt, R.(1997)Rapid detection of Salmonella enterica with primers specific for iroB. J. Clin. M icrobiol. 35:1224-1230.
4. Blackburn, C. D. W.(1993)Rapid and alternative methods for the detection of Salmonellas in foods. J. Appl. Bacteriol. 75:199-214.
5. Bolton, L.F., Kelley, L.C., Lee, M.D., Fedorka-Cray, P.J. and Maurer, J. J.(1999)Detection of multidrug-resistant salmoneela enterica serotype Typhimurium DT104 based on a gene which confers cross-resistance to flofenicol and chloramphenicol. J. Clin. Microbiol. 37:1348-1351.
6. Cano,P.J., Rasmussen, S.R., Fraga,G.S.,Palomares, J. C.(1993)Fluorescent detection-polymease chain reaction(FD-PCR)as say on microwell plates as a screening test for Salmonellas in foods. J. Appl. Bacteriol.75:247-253.
7. Chiu,C.H., Ou, J.T.(1996)Rapid identification of Salmonella serovars in feces by specific detection of virulence genes inv-A and spv C, by an enrichment broth culture-multiplex PCR combination assay.J. Clin. Microbiol. 34:2619-2622.
8. Cohen, H. J., Mechanda, S. M., Lin W.(1996)PCR amplification of the fimA gene sequence of Salmonella typhimurium, a specific method for detection of Salmonella *Spp*. Appl. Environ. Microbiol. 62:4303-4308.
9. Cudjoe, K.S., Hagtvedt, T., Dainty, R.(1995)Immunomagnetic separation of Salmonella from foods and their detection using immunomagnetic particle(IMP)-ELISA. Int. J. Food Microbiol. 27, 11 - 25.
10. Doran, J.L., Collinson, S.K., Clouthier, S.C., Cebula, T.A., Koch, W.H., Burian, J., Banser, P.A., Todd, E.C.D., Kay, W.W.(1996)Diagnostic potential of sefA DNA probes to *Salmonella enteritidis* and certain other O-serogroup D1 Salmonella serovars. Mol. Cell. Probes 10: 233-246.
11. Ebner, P.D., Mathew, A.G.(2001)Three molecular methods to identify Salmonella enterica serotype Typhimurium DT104:PCR fingerprinting,multiplex PCR and rapid PFGE.FEMS Microbiol.Lett. 205:25-29.
12. Echeita, M. A., Usera, M. A.(1998)Rapid identification of Salmonella *Spp*. Phase 2 antigens of the H1 antigenic complex using"multiplex PCR". Res. Microbiol. 149:757-761.
13. Fluit, A.C., Widjojoatmodjo, M.N., Box, A.T.A., Torensma, R.,Verhoef, J.(1993)Rapid detection of Salmonellae in poultry with the magnetic immuno-polymerase chain reaction assay. Appl.Environ. Microbiol. 59:1342-1346.
14. Gay,J.(1995)Bovine herd Salmonellosis. Am.J.Infect. Control.23:56-62.
15. Hashimoto,Y., Itho,Y., Fujinaga,Y., Khan,A.O., Sultana,F., Miyake,M., Hirose,K., Yamamoto,H., Ezaki,T.(1995)Development of nested PCR based on the viaB sequence to detect Salmonella typhi.J. Clin. Microbiol. 33:775-777.
16. Holmes, D.S., Quigley, M.(1981)A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. Anal. Biochem.114:193-197..
17. Holt, P.S., Gast, R.K., Greene, C.R.(1995)Rapid detection of *Salmonella enteritidis* in pooled liquid egg samples using a magnetic bead-ELISA system. J. Food Prot. 58: 967- 972.
18. Khan,A.A., Nawaz, M.S., Khan,S.A., Cerniglia, C.E.(2000)detection of multidrug-resistant Salmonella Typhimurium DT104 by multiplex polymerase chain reaction. FEMS. Mcriobiol. Lett.182:355-360.
19. Kwang, J., Littledike, E. T., Keen, J. E.(1996)Use of polymerase chain reaction for Salmonella detection. Lett. Appl. Microbiol. 22:46-51.
20. Lim,Y.H., Hirose,K., Izumiya,H., Arakawa,E., Takahashi, H., Terajima,J., Itoh,K.I., Tamura,K., Kim, S. and Watanabe,H.(2003)Multiplex polymerase chain reaction assay for selective detection of Salmonella enterica serovar Typhimurium. Jpn. J. infect. Dis. 56:151-155.

www.SID.ir

Archive of SID

21. Mahon,J., Laz,A.J.(1993)A quantitative polymerase chain reaction method for the detection in avian faeces of Salmonella carrying the *spvR* gene. Epidemiol. Infect.111:455-464.
22. Mansfield, L.P., Forsythe, S. J.(1993)Immunomagnetic separation as an alternative to enrichment broths for Salmonella detection. Lett. Appl. Microbiol. 16:122-125.
23. Nguyen, A. V., Khan,M. I., Lu, Z.(1994)Amplification of Salmonella chromosomal DNA using polymerase chain reaction. Avian Dis. 38:119-126.
24. Parmar,N., Easter, M.C., Forsythe, S.J.(1992)The detection of *Salmonella enteritidis* and Salmonella Typhimurium using immunomagnetic separation and conductance molecular biology. Lett. Appl. Microbiol. 15:175- 178.
25. Popoff, M. M., Bockemuhl, J., Gheesling, L. L.(2004)Supplement 2002(no.46)to the Kauffmann-White scheme. Res. Microbiol. 155:568-70.
26. Rahn, K., De Grandis, S.A., Clarke, R.C., Gala´n, J.E., Ginocchio, C., Curtiss III, R., Gyles, C.L.(1992)Amplification of an invA sequence of Salmonella Typhimurium by polymerase chain reaction as a specificmethod of detection of Salmonella. Mol. Cell. Probes. 6: 271-279.
27. Rexach, L., Dilassier,F., Fach,P.(1994)Polymerase chain reaction for Salmonella virulence-associated plasmid genes:a new tool in Salmonella epidemiology.Epidemiol.Infect.112:33-43.
28. Rossen,L.,Novskov,P.,Holstrom,K.,Rassmussen,O.P. (1992)Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA extraction solution. Int. J. Food Microbiol. 14:37-45.
29. Safarýk, I., Safarýkova, M.(1999)Use of magnetic techniques for the isolation of cells. J. Chromatography, B. 722: 33-53.
30. Safarýk, I., Safarýkova, M., Forsythe, S.J.(1995)The application of magnetic separation in applied microbiology. J. Appl. Bacteriol. 78:575-585.
31. Thrusfield, M.(1995)Veterinary epidemiology. 2nd edition, Blackwell science publication, pp.280-282.
32. Soumet, C., Ermel, G., Rose, N., Rose, V., Drouin, P., Salvat, G., Colin, P.(1999)Evaluation of a multiplex PCR assay for simultaneous identification of Salmonella sp., *Salmonella enteritidis* and Salmonella Typhimurium from environmental swabs of poultry houses. Lett. Appl. Microbiol. 28: 113-117.
33. Way, J. S., Josephson, K. L., Pillai, S. D., Abbaszadagan, M., Gesba, C. P. and Pepper, I. L.(1993)Specific detection of Salmonella *Spp*. by multiplex polymerase chain reaction. Appl. Environ. Microbiol. 39:1473-1479.
34. Widjojoatmodjo, M. N., Fluit, A.C., Torensma, R., Verdonk, G.P., Verhoef, J.(1992)The magnetic immuno polymerase chain reaction assay for direct detection of Salmonella in faecal samples. J. Clin. Microbiol. 30:3195- 3199.

www.SID.ir

Archive of SID

APPLICATION OF COMBINATION, IMMUNOMAGNETIC SEPARATION PLUS MULTIPLEX PCR FOR THE DETECTION AND IDENTIFICATION OF *SALMONELLA ENTERICA* SUBSPECIES ENTERICA SEROVAR TYPHIMURIUM IN BOVINE DIARRHOEIC FECAL SAMPLES

Tadjbakhsh, H.[1], Atashparvar, N.[2], Zahraei Salehi,T.[1]*, Nadalain, M. [3]

[1]Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran,Tehran-Iran. [2]School of Veterinary Medicine,University of Lorstan,Khorram-Abad, Lorestan-Iran. [3]Department of [3]Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine,University of Tehran,Tehran-Iran.

(Received 22 August 2005 , Accepted 17 March 2005)

Abstract:

A total of 400 bovine diarrhoeic fecal specimens were obtained and conventional microbial culture, immunomagnetic separation and multiplex PCR were simultaneously carried out on samples. For detection of *Salmonella* at genus level, *inv-A* universal primer was selected. In order to identifiing of *Salmonella typhimurium*, specific primers of *Rfbj*, *Fljb* and *Flic* related to gene sequence of O_4, H_2:1,2 and H_1: i were used, respectively. Results showed, 33(8.5%)were culture positive for *Salmonella* serotypes. However, *Salmonella typhimurium* with(66.7%), *Salmonella dublin*(9.1%), *Salmonella virchow*(6.1%), *Salmonella gloucester*(6.1%), *Salmonella enteritidis*(3%), *Salmonella georgia*(3%), *Salmonella augustenborg*(3%)and *Salmonella lindenburg(*3%), were the most common isolated serovars, respectively. In the IMS+Multiplex PCR four amplified products(663,526,284 and 183 bp) were found in all specimens which had *typhimurium* serovar(1,4,5,12:i:1,2)from *rfbj*,*fljb*,*inv-A* and *flic* genes, respectively. Results showed that detection and identification of *Salmonella typhimurium* using specific primers of O_4, H_2:1,2 and H_1: i antigens can be useful.

Key words: *Salmonella typhimurium*,Immunomagnetic separation, Multiplex PCR, *inv-A*, *rfbj*, *fljb* Genes, Feces.

***Corresponding author's email: tsalehi@ut.ac.ir, Tel: 021-66427517, Fax: 021-66933222**

www.SID.ir