فصلنامه علوم زیستی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان
شماره پیاپی۸، جلد۳، شماره ۱، زمستان ۱۳۸۸، صفحه ۳۷ تا صفحه ۴۵

تعیین طرح پلاسمیدی سالمونلاهای جدا شده از مواد غذایی

رباب رفیعی طباطبائی[۱]، سید علی پوربخش[۲]، محمد حسین ناظم شیرازی[۳]

۱- استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال. rrtabatabaei@yahoo.com
۲- دانشیار موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، کرج.
۳- استادیار سازمان دامپزشکی استان تهران.

تاریخ دریافت: ۸۸/۹/۲۵ تاریخ پذیرش: ۸۸/۱۱/۲۰

چکیده

در بین باکتری‌های گرم منفی عامل التهاب‌های روده‌ای حاصل از مواد غذایی، مهم‌ترین ارگانیسم‌ها مربوط به اعضای جنس سالمونلا می‌باشند. در این بررسی سه روش سروتایپینگ، رزیستوتایپینگ و تعیین طرح پلاسمیدی برای بررسی سویه‌های سالمونلای جدا شده از مواد غذایی استفاده شده مجموع ۵۰ سویه سالمونلا جدا شده از مواد غذایی ارسال شده به سازمان دامپزشکی استان تهران و آزمایشگاه دامپزشکی پاستور، از اردیبهشت تا مرداد ۱۳۸٤ مورد بررسی قرار گرفتند. سروتایپینگ با استفاده از Mast Diagnostic Kit صورت گرفت. رزیستوتایپینگ با استفاده از انتشار دیسک به روش Kirby and Bauer براساس رهنمودهای NCCLS انجام شد. پلاسمیدها با استفاده از کیت تاکارا ساخت شرکت تاکارا (ژاپن)، استخراج شده و بر روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز گردیدند. ۵۰ سویه سالمونلای مورد بررسی متعلق به ۱۱ سروتیپ بودند. از سروتیپ‌های به دست آمده، بیشترین درصد مربوط به *S. Durban* و پس از آن مربوط به *S. Nigeria* و سپس مربوط به *S. Thompson* بوده است. هر ۵۰ سویهٔ سالمونلا به آنتی بیوتیک‌های آمپی سیلین و استرپتومایسین مقاوم بودند. مقاومت به سه آنتی بیوتیک یا بیشتر (MDR) در ۵۸٪ از سروتیپ‌ها مشاهده شد. در سویه‌های مورد بررسی، ٦ الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی به دست آمد که شایع ترین آن S.Am.Gm.Cz.Te بوده است. ۵۰ سروتیپ سالمونلا دارای یک تا چهار پلاسمید بودند و ٤ طرح پلاسمیدی متفاوت را نشان دادند. همه سروتیپ‌ها دارای یک پلاسمید ۳/۰۳٦ مگا دالتونی بودند و همه سروتیپ‌های دارای این پلاسمید به آنتی بیوتیک‌های آمپی سیلین و استرپتومایسین مقاوم بودند. روش سروتایپینگ نسبت به دو روش دیگر، سروتیپهای بیشتری را افتراق داد و از آن‌جائی که سروتیپ‌های مورد بررسی ما تعداد پلاسمیدهای کمی را داشتند، این روش سویه‌های کمتری را افتراق داد. اما تعیین طرح پلاسمیدی نشان داد که همه سروتیپ‌های مورد بررسی دارای یک پلاسمید ۳/۰۳٦ مگا دالتونی بودند که می‌تواند به عنوان یک خصوصیت مشترک سروتیپ‌های سالمونلای جدا شده از مواد غذایی در نظر گرفته شود.

کلید واژه: سالمونلا، طرح پلاسمیدی، مقاومت آنتی بیوتیکی، سروتایپینگ، مواد غذایی.

مقدمه

سروتیپ‌های جنس سالمونلا از مهم‌ترین باکتری‌های میله‌ای گرم منفی، عامل التهاب‌های روده‌ای حاصل از مواد غذایی است که با منشا انسانی و حیوانی پراکنش وسیعی در طبیعت دارند. زیستگاه اصلی سروتیپ‌های سالمونلا، روده جانورانی همانند پرندگان، خزندگان، جانوران مزرعه‌ای و انسان می‌باشد. این ارگانیسم‌ها از طریق مدفوع دفع شده و می توانند موجب آلوده شدن آب‌ها گردند. مصرف آب‌های آلوده و مواد غذایی آلوده شده توسط حشرات یا دیگر واسطه‌ها به وسیله انسان و سایر جانوران موجب تکرار چرخه آلودگی می‌شود. تکرار این

www.SID.ir

چرخه از طریق تبادلات بین‌المللی فرآورده‌های جانوری و خوراک دام عامل عمده انتشار جهانی سالمونلوزیس است(۶،۱۶). برای درمان عفونت‌های سالمونلایی از آنتی بیوتیک‌های مختلفی استفاده و مصرف بی‌رویه در انسان و حیوان موجب از بین رفتن سویه‌های حساس و انتخاب سویه‌های مقاوم می‌شود(۱۱،۱۶). استفاده از آنتی بیوتیک‌ها نه تنها باعث انتخاب سویه‌های مقاوم باکتری‌های پاتوژن شده بلکه باعث انتخاب سویه‌های مقاوم در فلورای آندوژن جانوران و انسان‌ها می‌گردد. افزایش مصرف آنتی بیوتیک‌ها در پرندگان بسیار بالا بوده و در نتیجه فلورای مدفوعی آن‌ها حاوی میزان نسبتاً بالایی از باکتری‌های مقاوم می‌باشد. این سویه‌های مقاوم در هنگام ذبح از دستگاه گوارش به راحتی لاشه طیور را آلوده و مستقیماً از طریق غذا می‌توانند در دستگاه گوارش انسان کلنیزه شده و ممکن است ژن های مقاومت را به فلورای آندوژن انسان انتقال دهند(۱۱). یکی از مهم‌ترین علت‌های مقاومت آنتی بیوتیکی، توانایی باکتری‌ها در انتقال فاکتور مقاومت به باکتری‌های دیگر است به طوری که باکتری‌های روده‌ای دارای پلاسمید R می‌توانند از طریق آب‌های آلوده (به فاضلاب) وارد دستگاه گوارشی انسان شده و فاکتورR خود را به فلورای دستگاه گوارش انتقال دهند. نظر به این که ویژگی‌های فنوتیپی از قبیل الگوهای بیوشیمیایی، وجود آنتی ژن‌های سطحی سلول و الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی طبق تغییرات شرایط رشد متغیر بوده استفاده از این ویژگی برای بررسی‌های اپیدمیولوژیکی بیماری‌های ایجاد شده توسط گونه هتروژن مفید نبوده و یا ارزش محدودی خواهد داشت. بررسی الگوی پلاسمیدی، روش مولکولی رایجی در بررسی‌های اپیدمیولوژیک و بررسی ارتباط بین سویه‌های باکتریایی می‌باشد. در بررسی شیوع عفونت‌های سالمونلایی و تشخیص منبع عفونت و افتراق سویه‌های سالمونلای عامل عفونت از تایپینگ، باکتری‌های سالمونلا استفاده می‌شود. به طور کلی تایپینگ باکتری‌ها به روش‌های مختلفی مانند: ژنوتایپینگ، بیوتایپینگ، سروتایپینگ، فاژتایپینگ، رزیستوتایپینگ، باکتریوسینتایپینگ انجام می‌شود. اما استفاده از روش‌های مولکولی مانند بررسی طرح پلاسمیدی (Plasmid Profile Analysis=PPA) نیز به عنوان روش‌های قابل قبولی در بررسی‌های اپیدمیولوژیکی باکتری‌های گرم منفی مورد استفاده قرار می‌گیرند. PPA به عنوان یک ابزار اپیدمیولوژیکی در بررسی شیوع بیماری‌های عفونی، تشخیص منبع عفونت، تشخیص سویه اپیدمیک باکتری‌ها، تشخیص پلاسمید اپیدمیک و تایپینگ سویه‌های باکتری استفاده می‌شود(۲۱). در ایران اکثر بررسی‌های اپیدمیولوژیکی روی عفونت‌های سالمونلایی به بیوتایپینگ، سروتایپینگ و رزیستوتایپینگ محدود بوده و هدف از این تحقیق تعیین سروتیپ، الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و طرح پلاسمیدی سالمونلاهای جدا شده از مواد غذایی است.

مواد و روش‌ها

سویه‌های باکتریایی

۵۰ سویه سالمونلا از اردیبهشت سال ۱۳۸۴ تا مرداد سال ۱۳۸۴ از مواد غذایی (گوشت، مرغ، ماهی و غیره) ارسال شده به سازمان دامپزشکی استان تهران و آزمایشگاه دامپزشکی پاستور، جداسازی شدند در ابتدا بررسی‌های باکتریولوژیکی و تست‌های بیوشیمیایی روی همه نمونه‌ها انجام و تشخیص نهایی باکتری‌های جدا شده با استفاده از روش‌های سرولوژیکی صورت پذیرفت.

آزمایش‌های باکتریولوژیکی و بیوشیمیایی

کشت و جداسازی سالمونلا از مواد غذایی براساس روش استاندارد ملی ایران انجام شد(۷). براساس این روش ابتدا از نمونه مورد بررسی سوسپانسیون اولیه تهیه و برای پیش غنی‌سازی در محیط مایع غیر انتخابی از آبگوشت لاکتوز (Lactose broth) و آب پپتونه بافر (Buffered peptone water) استفاده و سپس غنی‌سازی در محیط‌های مایع انتخابی آبگوشت سلنیت(Selenit F broth) F و آبگوشت تتراتیونات نووبیوسین (Tetrathionate novobiocine broth) صورت گرفت. پس از آن کشت در محیط‌های جامد

Archive of SID

www.SID.ir

انتخابی شامل آگار سبز درخشان قرمز فنل(Edel & Kampelmacher)، مکانکی آگار (MacConkey Agar)، سالمونلا-شیگلا آگار (*Salmonella Shigella* Agar) صورت و به منظور انجام آزمایش‌های بیوشیمیایی، تست‌های IMViC, SIM, TSI و اوره انجام شد.

آزمایش‌های سرولوژیک

این آزمایش‌ها براساس روش آگلوتیناسیون مستقیم روی لام و با استفاده از آنتی سرم‌های پلی والانت و مونو والانت O و آنتی سرم‌های H موجود در Mast Diagnostic kit (Mast group Ltd, Merseyside, UK) انجام و با استفاده از جدول Kauffmann-White گروه و واریته سرولوژیکی باکتری ها مشخص شد(۱،۹).

تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی سالمونلاها

تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی به روش انتشار دیسک Kirby and Bauer و براساس دستورالعمل NCCLS انجام شد(۹،۱۸). آنتی بیوتیک‌های مورد استفاده در این بررسی شامل آمپی سیلین (AM)، استرپتومایسین (S)، سپیر وفلوکساسین (Cp)، فورازولیدون (Fu)، جنتامیسین (Gm)، کلرامفنیکل (C)، سفازولین (Cz)، تتراسیکلین (Te) و تری متوپریم سولفامتوکسازول (SxT) بودند.

آزمایش‌های استخراج پلاسمید

استخراج پلاسمید براساس دستورالعمل موجود در کیت Takara ساخت ژاپن انجام و DNA پلاسمیدی به دست آمده در میکروتیوب‌های درب‌دار در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری و با استفاده از رانینگ بافر (TBE)، لودینگ بافر (برموفنل بلو ۰/۷ درصد، SDS ۷٪ و گلیسرول ۳۳٪) در ژل آگارز ۱٪ (شرکت Roche آلمان) با ولتاژ ۱۰۰ به مدت ۱ ساعت الکتروفورز و ژل توسط ایتدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شده و باندهای به دست آمده زیر نور UV مشاهده شدند. برای تخمین وزن مولکولی پلاسمیدهای به دست آمده از مارکر bp۱۰۰ استفاده گردید. این مارکر تعداد ۱۶ باند روی ژل آگارز ایجاد می‌کند. تعیین وزن مولکولی پلاسمید با استفاده از نمودار Semi-Log plots و استفاده از نرم افزار UVI صورت پذیرفت. پس از به دست آوردن سایر باندها توسط هر کدام از این دو روش، وزن مولکولی باندها با استفاده از تناسب هر کیلو جفت باز مساوی ۶۶۰۰۰۰ دالتون (۰/۶۶ مگا دالتون) است، محاسبه گردید(۱۵).

نتایج

آزمایش‌های باکتریولوژیکی و بیوشیمیایی

از ۴۴۷ نمونه گوشت قرمز، مرغ منجمد بسته‌بندی شده و بدون بسته‌بندی، خمیر مرغ، پودر ماهی، قلم گاو، ران مرغ و شنیسل مرغ ارسال شده به سازمان دامپزشکی استان تهران، ۴۰ مورد و هم چنین از ۴۵ نمونه ارسال شده به آزمایشگاه پاستور ، ۱۰ مورد به سالمونلا آلوده بودند. در محیط آگار سبز درخشان و قرمز فنل، پرگنه‌های مشخص سالمونلا به رنگ صورتی، در محیط SS آگار اکثر سویه‌ها، H_2S مثبت و لاکتوز منفی و پر گنه‌های شفاف با مرکز سیاه و تعداد کمی از سویه‌ها H_2S منفی و لاکتوز منفی با پرگنه‌های شفاف بدون مرکز سیاه مشاهده شدند. هم چنین در محیط مک کانگی آگار، پرگنه‌های بی رنگ یا هم رنگ محیط مشاهده شد که نشان دهنده عدم تخمیر قند و عدم تولید اسید بوده است. در محیط TSI سطح مایل محیط، قلیایی (قرمز رنگ) و عمق محیط، اسیدی (زرد رنگ) همراه با تولید سولفید هیدروژن سیاه رنگ و تشکیل گاز بوده و در محیط SIM تست اندول، منفی و حرکت، مثبت بود. از سایر واکنش‌های بیوشیمیایی عدم تولید آنزیم اوره‌آز، واکنش مثبت متیل رد و واکنش منفی وژس پروسکوئر و سیترات متغیر بوده است.

آزمایش‌های سرولوژیک

با استفاده از جدول کافمن-وایت، ۱۱ سروتیپ شناسایی شد. از سروتیپ‌های به دست آمده بیشترین درصد مربوط به *S.durban* (۴۲٪) و پس از آن مربوط به *S.nigeria* (۱۸٪) و سپس مربوط به *S.thompson* (۱۲٪) بود (جدول ۱).

تعیین مقاومت دارویی

هر۵۰ سویه سالمونلای مورد بررسی، به آنتی

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- تعداد و درصد سروتیپ‌های شناسایی شده در ۵۰ سویه سالمونلا

ردیف	تعداد سویه ها	درصد سویه ها	سروتایپ	گروه سروتایپ
۱	۲۱	٪۴۲	*S.durban*	D_1(۹ ،۱۲)
۲	۹	٪۱۸	*S.nigeria*	C_1(۶ ،۷)
۳	۶	٪۱۲	*S.thompson*	C_1(۶ ،۷)
۴	۴	٪۸	*S.II*	C_1(z۶ ،z۷)
۵	۲	٪۴	*S.uno*	C_2(۶ ،۸)
۶	۲	٪۴	*S.newport*	C_2(۶ ،۸)
۷	۲	٪۴	*S.enteritidis*	D_1(۹ ،۱۲)
۸	۱	٪۲	*S.II*	C_1(z۴۲ ،gt)
۹	۱	٪۲	*S.II*	C_1(۵ ،۱ ،z۲۹)
۱۰	۱	٪۲	*S.II*	C_1(- ،z۲۹)
۱۱	۱	٪۲	*S.IImjimwema*	D_1(۹ ،۱۲)
مجموع	۵۰	٪۱۰۰		

بیوتیک‌های آمپی سیلین واسترپتومایسین مقاوم و بالاترین میزان حساسیت به سیپروفلوکساسین و بعد از آن نسبت به کلرامفنیکل و سولفومتوکسازول بوده است (جدول ۲). مقاومت به سه یا بیشتر آنتی بیوتیک Multiple Drug Resistance=MDR در ۴۰ مورد یا (٪۵۸) از سروتیپ‌ها و در سویه‌های مورد مطالعه ۶ الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی به دست آمد که شایع‌ترین آن .S.Am Gm .Cz .Te بوده است که در ۱۴ نمونه مورد بررسی (٪۲۸) مشاهده شده است (جدول ۳).

استخراج پلاسمید

استخراج پلاسمید بر طبق روشی که در مواد و روش‌ها توضیح داده شده صورت گرفت و برای هر نمونه، حداقل ۴ بار تکرار گردید. سروتیپ‌های سالمونلای مورد بررسی دارای یک تا چهار پلاسمید با وزن‌های مولکولی ۴/۸۱، ۴/۳۵۶، ۳/۷۶۲، ۳/۰۳۶ مگادالتون بودند. ۵۰ سروتیپ سالمونلا که دارای ۶ الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی بودند، ۴ طرح پلاسمیدی متفاوت را نشان دادند. همه سروتیپ‌های دارای پلاسمید ۳/۰۳۶ مگادالتونی بوده و به آنتی بیوتیک‌های آمپی سیلین و استرپتومایسین مقاوم بودند (اشکال۱تا۳ و جدول۴).

بحث و نتیجه‌گیری

مسمومیت غذایی سالمونلایی از خوردن مواد غذایی

جدول ۲- حساسیت و مقاومت سروتیپ‌های شناسایی شده نسبت به هر آنتی بیوتیک

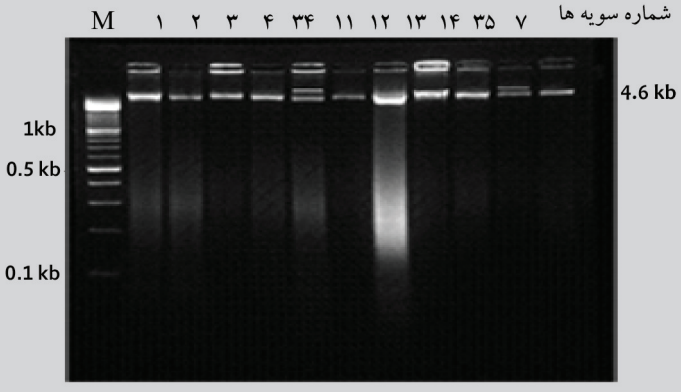
ردیف	نام آنتی بیوتیک	درصد حساسیت	درصد مقاومت
۱	استرپتومایسین	٪۰	٪۱۰۰
۲	آمپی سیلین	٪۰	٪۱۰۰
۳	تتراسیکلین	٪۱۰	٪۹۰
۴	سفازولین	٪۱۸	٪۸۲
۵	جنتامیسین	٪۱۸	٪۸۲
۶	فورازولیدون	٪۴۲	٪۵۸
۷	تری متوپریم سولفامتوکسازول	٪۷۶	٪۲۴
۸	کلرامفنیکل	٪۸۰	٪۲۰
۹	سیپروفلوکساسین	٪۹۶	٪۴

Archive of SID

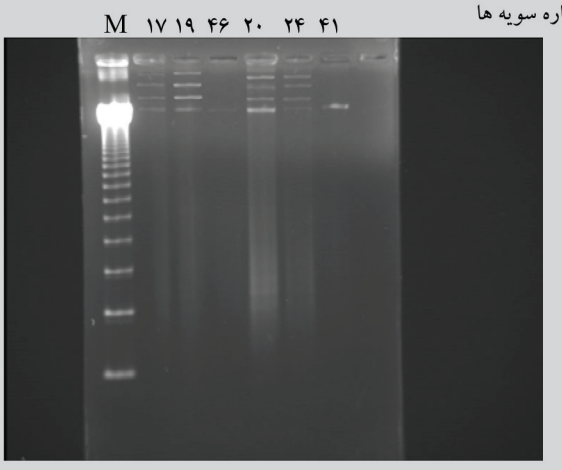
www.SID.ir

جدول۳- تعداد و درصد الگوهای مقاومت آنتی بیوتیکی در سروتیپ‌های مورد بررسی

ردیف	الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی	درصد سویه ها	تعداد سویه ها	الگوی مقاومت
۱	۱	٪۴	۲	S.Am.Cp.C.Fu.Gm.Te.Cz.SxT
۲	۲	٪۱۶	۸	S.Am.C.Fu.Gm.Cz.Te.SxT
۳	۳	٪۱۰	۵	S.Am.Fu.Gm.Cz.Te
۴	۴	٪۲۸	۱۴	S.Am.Gm.Cz.Te
۵	۵	٪۲۰	۱۰	S.Am.Te
۶	۶	٪۲۲	۱۱	S.Am
مجموع		۱۰۰	۵۰	



شکل ۱ـ تصویر حاصل از الکتروفورز پلاسمیدهای استخراجی از سروتیپ‌های دارای طرح یک و دو باندی
M=۱۰۰ bp (۰/۱kb) Marker ،۱۶ bands: ۱- ۰/۱ kb ۲- ۰/۲ kb ۳- ۰/۳kb ۴- ۰/۴ kb ۵- ۰/۵ kb ۶- ۰/۶ kb ۷- ۰/۷ kb ۸- ۰/۸ kb ۹- ۰/۹ kb ۱۰- ۱ kb ۱۱- ۱/۱ kb ۱۲- ۱/۲ kb ۱۳- ۱/۳ kb ۱۴- ۱/۴ kb ۱۵- ۱/۵ kb ۱۶- ۲/۶۴۲ kb



شکل ۲ـ تصویر حاصل از الکتروفورز پلاسمیدهای استخراجی از سروتیپ‌های دارای طرح یک و چهار باندی
M=۱۰۰ bp (۰/۱kb) Marker

www.SID.ir

جدول ٤- مشخصات گروه های پلاسمیدی از نظر اندازه و وزن باندهای پلاسمیدی

ردیف	اندازه باندها (هزار جفت باز)	وزن باندها (مگادالتون)
۱ تا ۱۵	۴/۶	۳/۰۳۶
۱۶ تا ۲۴	۴/۶ – ۵/۷	۳/۰۳۶ – ۳/۷۶۲
۲۵ تا ۲۶	۴/۶ – ۵/۷ – ۶/۶	۳/۰۳۶ – ۳/۷۶۲ – ۴/۳۵۶
۲۷	۴/۶ – ۵/۷ – ۶/۶ – ۷/۳	۳/۰۳۶ – ۳/۷۶۲ – ۴/۳۵۶ – ۴/۸۱

حاصل می‌شود که حاوی سروتیپ‌های ویژه‌ای از این جنس به تعداد کافی هستند (۴،۵). تخم مرغ، طیور، گوشت و فرآورده‌های گوشتی عمده‌ترین عوامل انتقال سالمونلوزیس به انسان می‌باشند(۵). سروتایپ‌های سالمونلا از خوک، گاو، طیور، مرغ و ماکیان در کشورهای مختلف جداسازی شده است (۲،۳،۱۳،۱۴،۱۶،۲۲). در این بررسی نیز ما سروتیپ‌های سالمونلا از گوشت قرمز، مرغ منجمد بسته‌بندی شده و بدون بسته‌بندی، شنیسل مرغ، خمیر مرغ، قلم گاو، پودر ماهی و دان مرغ جدا گردیدند. سروتیپ‌های سالمونلا آگونا، سالمونلا مونته ویدئو، سالمونلا سنفتنبرگ و سالمونلا کنتاکی (۱۲)، سالمونلا تیفی موریوم، سالمونلا دوبلین، سالمونلا کلراسوئیس، و سالمونلا اینفنتیس (۱۳،۱۴)، سالمونلا دربای، سالمونلا براندربرگ و سالمونلا هاوانارا (۱۶)، سالمونلا پاراتیفی(۳)، سالمونلا انتریتیدیس (۲) از حیوانات، مواد غذایی و انسان جدا شدند(۱۷). در این تحقیق نیز ۱۱ سروتیپ سالمونلا شناسایی شد که نشان می‌دهد مواد غذایی به وسیله سروتیپ‌های مختلفی از سالمونلا آلوده می‌شوند. در این بررسی سروتیپ‌های سالمونلا درصد مقاومت بالایی نسبت به آنتی بیوتیک‌های مورد استفاده را نشان دادند. هر ۵۰ سویه سالمونلای مورد بررسی به آنتی بیوتیک‌های آمپی‌سیلین(۱۰۰٪) و استرپتومایسین (۱۰۰٪)، مقاوم و بیشترین میزان مقاومت پس از این دو آنتی بیوتیک نسبت به تتراسیکلین (۹۰٪) و سفازولین (۸۲٪) بود. شایع‌ترین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی S.Am.Gm. Cz .Te بود که در ۲۸٪ از نمونه‌ها مشاهده شد. Anna و همکاران در کالیفرنیا (۲۰۰۴)، مقاومت آنتی بیوتیکی سروتیپ‌های سالمونلا نیوپورت معاصر و قدیمی (۱۹۹۴-۱۹۸۸) را با هم مقایسه کردند. نمونه‌های قدیمی نسبت به سفالوسپورین‌ها حساس بودند در حالی که نمونه‌های معاصر نسبت به سفالوسپورین‌ها، مقاوم بودند(۱۰). Lailler و همکاران در فرانسه در سال ۲۰۰۲ اعلام کردند که ۴۸٪ سروتیپ‌های سالمونلا تیفی موریوم جدا شده از طیور، خوک و گاو نسبت به آنتی بیوتیک‌های آمپی سیلین، استرپتومایسین، کلرامفنیکل، تتراسیکلین و سولفونامیدها مقاومت نشان دادند(۱۴). Shelly و همکاران در پنسیلوانیا در سال ۲۰۰۲، الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سروتیپ‌های سالمونلا نیوپورت جدا شده از حیوانات را تعیین کردند، اکثر سویه‌ها مقاومت به آمپی‌سیلین، کلرامفنیکل، تتراسیکلین، استرپتومایسین، سفالوتین، سفتیوفور (Ceftiofur) و سولفومتوکسازول را نشان دادند (۲۰). Wondwossen و همکاران در ایالات کارولینای شمالی در سال ۲۰۰۲ ، مقاومت آنتی بیوتیکی سالمونلا تیفی موریوم جدا شده از خوک را به دست آوردند که دو الگوی مقاومتی مشاهده شد که شامل:

۱- سولفومتوکسازول، استرپتومایسین، کلرامفنیکل، آمپی سیلین.

۲- تتراسیکلین، سولفومتوکسازول، استرپتومایسین، کاناماسین، آمپی سیلین بوده است(۲۲). Hidetake و همکاران در توکیوی ژاپن در سال ۲۰۰۴، مقاومت آنتی بیوتیکی سروتیپ‌های سالمونلای جدا شده از گاو، خوک و طیور را به دست آوردند. همه سروتیپ‌ها، مقاومت به آمپی سیلین، دی هیدرواسترپتومایسین، کاناماسین و اکسی تتراسیکلین را نشان دادند(۱۳). Nadine و همکاران در بلژیک در سال ۲۰۰۴، مقاومت آنتی بیوتیکی سروتیپ‌های

Archive of SID

www.SID.ir

سالمونلای جدا شده از خوک و محیط کشتارگاه را تعیین کردند. سویه‌های جدا شده میزان بالایی از مقاومت به آنتی بیوتیک‌های تتراسیکلین، سولفادیازین، آمپی سیلین، کلرامفنیکل و استرپتومایسین را نشان دادند(۱۶). D.L.Baggesen و همکاران در دانمارک در سال ۲۰۰۰، مقاومت آنتی بیوتیکی سروتیپ سالمونلا تیفی موریوم فاژ تایپ DT ۱۰۴ جدا شده از دانمارک، اروپا و ایالات متحده را با هم مقایسه کردند. اکثر سویه‌ها مقاوم به آمپی سیلین، کلرامفنیکل، اسپکتینومایسین، استرپتومایسین، سولفونامیدها و تتراسیکلین بودند(۸). Nanna و همکاران در فنلاند در سال ۲۰۰۲ ، مقاومت آنتی بیوتیکی سروتیپ سالمونلا آگونا جدا شده از حیوانات، مواد غذایی و انسان را تعیین کردند. مقاومت به تتراسیکلین و استرپتومایسین به میزان بالایی در این سروتیپ‌ها مشاهده شد(۱۷). بنایی و همکاران در تهران در سال ۱۳۸۲، مقاومت آنتی بیوتیکی سروتایپ‌های سالمونلای جدا شده از ماکیان تجاری را تعیین کردند. بر اساس این بررسی همه سروتیپ‌های جدا شده نسبت به آنتی بیوتیک‌های اریترومایسین و پنی سیلین، مقاوم بودند(۱۶). همان طور که مشاهده شد در این بررسی و سایر بررسی‌های انجام شده در ایران و خارج از ایران، سویه‌های مورد بررسی، مقاومت چند آنتی بیوتیکی بالایی را نشان می‌دهند. یکی از دلایل افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی، مصرف بی‌رویه و کنترل نشده آنتی بیوتیک‌ها هم در پزشکی و هم در دامپزشکی است که باعث از بین رفتن باکتری‌های حساس و انتخاب سویه‌های مقاوم می‌شود. Schuman و همکاران در مارس و آوریل سال۱۹۸۵، شیر پاستوریزه آلوده شده با سالمونلا تیفی موریوم را عامل بزرگ‌ترین اپیدمی سالمونلوزیس تا آن زمان در ایالات متحده معرفی کردند. این سویه دارای ۴ نوع پلاسمید با سایزهای ۱۵۸،۹۸،۱۰،۶ کیلوباز بود (۱۹).Halver و همکاران در نروژ در سال ۲۰۰۰، از تعیین طرح پلاسمیدی برای بررسی‌های مولکولی سروتیپ‌های سالمونلای جدا شده از کارخانجات سازنده غذای ماهی و اجزای غذای ماهی و یافتن منشاء آلودگی استفاده کردند. در این بررسی سروتیپ سالمونلا سنفتنبرگ جدا شده از نمونه Corngluten مورد آزمایش، طرح پلاسمیدی یکسانی را با طرح پلاسمیدی نمونه‌های جدا شده از محیط کارخانه و نمونه‌های غذای ماهی داشته و احتمالاً منبع آلودگی در این کارخانه بود(۱۷). Shelly و همکاران در پنسیلوانیا در سال ۲۰۰۲، طرح پلاسمیدی سالمونلا نیوپورت جدا شده از حیوانات را تعیین کردند. از ۴۴ سروتیپ مورد بررسی، ۳۷ سروتیپ یک پلاسمید ۱۴۰ کیلوبازی را حمل می‌کردند و یازده سویه دیگر سه طرح پلاسمیدی را نشان دادند که شامل دو طرح سه باندی و یک طرح دو باندی بود. وجود این پلاسمید ۱۴۰ کیلو بازی در اکثریت سویه‌ها نشان دهنده ارتباط اپیدمیولوژیک بین این سویه‌ها بود (۲۰). D.L.Baggesen و همکاران در دانمارک در سال ۲۰۰۰ ، طرح پلاسمیدی سروتیپ سالمونلا تیفی موریوم فاژ تایپ۱۰۴ DT جدا شده از دانمارک ، اروپا و ایالات متحده را با هم مقایسه کردند. همه سویه‌ها دارای یک پلاسمید ۹۵ کیلو بازی بودند که نشان دهنده منشأ مشترک این سروتیپ در نواحی مختلف جهان است (۸). Nanna و همکاران در فنلاند در سال ۲۰۰۲ ، طرح پلاسمیدی سالمونلا آگونا به دست آمده از حیوانات ، مواد غذایی و انسان را تعیین کردند. ۳۵٪ سروتیپ‌ها، پلاسمیدهایی بزرگ‌تر از ۲۰ کیلوباز و ۱۵٪ سروتیپ‌ها، پلاسمیدهایی با ۶ طرح پلاسمیدی متفاوت را حمل می‌کردند (۱۷). سروتیپ‌های سالمونلای مورد بررسی دارای یک تا چهار پلاسمید بودند و چهار طرح پلاسمیدی متفاوت را نشان دادند. همه سروتیپ‌های سالمونلای مورد بررسی دارای یک پلاسمید ۳/۰۳۶ مگا دالتونی بودند. در تعیین طرح پلاسمیدی، تعداد و اندازه پلاسمید موجود به عنوان راهی برای شناسایی بهتر سویه‌های باکتریایی به کار می‌رود. استفاده از تعیین طرح پلاسمیدی برای شناسایی سویه‌هایی که حاوی پلاسمیدهای چندگانه باشند بهتر جواب داده و زمانی که تعداد پلاسمیدها کمتر از سه عدد باشد قدرت افتراق تعیین طرح پلاسمیدی کاهش می‌یابد. در بررسی فوق تعداد پلاسمیدهای سروتیپ‌های مورد بررسی

Archive of SID

www.SID.ir

کم بوده و این روش نتواست برای تیپ‌بندی و افتراق سویه‌های مورد بررسی به کار رود اما همه سویه‌های مورد بررسی دارای یک پلاسمید ۳/۰۳۶ مگادالتونی بود، که نشان دهنده ارتباط اپیدمیولوژیک این سروتیپ‌ها است. هم‌چنین همه سروتیپ‌های مورد بررسی نسبت به آنتی بیوتیک‌های آمپی سیلین و استرپتو مایسین مقاوم بودند بنابراین، این احتمال وجود دارد که ژن کد کننده مقاومت به آمپی سیلین و استرپتو مایسین در این پلاسمید قرار گرفته باشد. در این پژوهش ما از سه روش سرو تایپینگ، تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و تعیین طرح پلاسمیدی برای بررسی سروتیپ‌های سالمونلای جدا شده از مواد غذایی استفاده نموده‌ایم. روش سروتایپینگ نسبت به سه روش دیگر سروتیپ‌های بیشتری را افتراق داد و از آن جایی که سروتیپ‌های مورد بررسی تعداد پلاسمیدهای کمی را داشتند این روش سویه‌های کمتری را افتراق داد. اما تعیین طرح پلاسمیدی نشان داد که همه سروتیپ‌های مورد بررسی دارای یک پلاسمید ۳/۰۳۶ مگادالتونی بودند که می‌تواند به عنوان یک خصوصیت مشترک سروتیپ‌های سالمونلای جدا شده از مواد غذایی در نظر گرفته شود.

منابع

۱ـ ادیب، فرپرویز. ۱۳۸۰. میکروب‌شناسی پزشکی.نشر نوردانش. ۴۵۰-۴۳۱.

۲- بنایی، منصور.، پوربخش، سیدعلی.، خاکی، پژواک.، نیکوخصال گیلوایی، حسن. ۱۳۸۲. تعیین سروتیپ و حساسیت دارویی سالمونلاهای جدا شده از ماکیان تجاری و کبوترهای اهلی ارجاعی به مؤسسه رازی.مجله پژوهش و سازندگی. ۱۶(۲) (پی آیند ۵۹ در امور دام و آبزیان): ۹۱ تا ۹۹.

۳- عبودی، برات.، مزبود، آرش.، مسعودی، محسن.، پورعباس تحویلداری، بهمن.، البرزی، عبدالوهاب.، کریمی، عبدالله. ۱۳۸۰. بررسی میزان آلودگی مرغ و تخم مرغ های محلی و کارخانه ای به باکتری سالمونلا در شیراز.مجله بیماری های عفونی و گرمسیری در ایران.۶(۱۴) : ۴۰-۴۳.

٤- مرتضوی، سیدعلی.، کاشانی‌نژاد، مهدی.، ضیاء الحق، حمیدرضا. ۱۳۷۹. میکروبیولوژی مواد غذایی. انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد.

۵- مرتضوی، سیدعلی.، معتمدزادگان، علی.، اعلمی، مهران.، گوهری اردبیلی، اشرف. (مترجمان) ۱۳۸۲. میکروبیولوژی غذایی مدرن (جی - ۲۰۰۰) جلد دوم. انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد.

٦- مرتضوی، سیدعلی.، صادقی ماهونگ، علیرضا. (مترجمان) ۱۳۸۱. میکروبیولوژی مواد غذایی ادمز ـ ام.آر.ادمز ـ ام.آ.موس. انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد. ویرایش دوم.

۷- مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. آبان ماه ۱۳۸۱. میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام . روش جستجوی سالمونلا در مواد غذایی.

8.Baggesen, D.L., Sandvang, D., Aarestrup, F.M. (2000). Characterization of *Salmonella enterica Serowar typhimurium* DT104 isolated from Denmark and comparison with isolates from europe and the United States. J.Clin. Microbiol, 38(4),1581-1586.

9.Baron, E.J., Finegold, S.M., Diagnostic, S. (2002). Microbiology.The C.V. Mosby Company.

10. Berge, A.C.B., Adaska, J.M., Sischo, W.M. (2004). Use of antibiotic susceptibility patterns and pulsed-field gel electrophoresis to compare historic and contemporary isolates of multi-drug-resistant *Salmonalla enterica* subsp.enterica *Serowar newport*. AEM, 70(1), 318-323.

11. Bogaard, A.E., London, N., Driessen, C., Stobberingh, E.E. (2001). Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. JAC, 47(6), 763-771.

12. Halvor, N., Gudmund, H.. (2003). Molecular analyses of *Salmonella enterica* isolates from fish feed factories and fish feed ingredients.

13. Hidetake, E., Moripka, A., Ishihara, K. (2004). Antimicrobial susceptibility of *Salmo-*

Archive of SID

www.SID.ir

nella isolated from cattle, swine and poultry (2001-2002): report from the Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring Program. JAC, 53,266-270.

14. Lailler, R., Grimont, F., Jones, Y., Sanders, P., Brisabois, A. (2002). Subtyping of *Salmonella typhimurium* by pulsed-field gel electrophoresis and comparisons with phage types and resistance types. NCBI, 50(6),361-368.

15. Martin, R. (1996). Gel electrophoresis . Nucleic Acids, 4(17),55-56.

16. Nadine, B., Lieve, H., Rijpens, N. (2004). Phenotypic and molecular typing of *Salmonella* strains reveals different contamination sources in two commercial Pig slaughterhouses. AEM,70(9),5305-5314.

17. Nanna, L., Siitonen, A., Pelkonen, S. (2002). Molecular follow-up of *Salmonella enterica* subsp.enterica *Serovar agona* infection in cattle and humans. J.Clin. Microbiol, 40 (10),3648-3653.

18. Performance standard for antimicrobial disk susceptibility tests, (2002) Nccls 22, 1.

19. Schuman, J.D., Zottola, E.A. (1989). Preliminary characterization of a food-borne multiple-antibiotic resistant *Salmonella typhimurium* Strain. AEM, 55(9),2344-2348.

20. Shelley, C., Aceto, R.H., Cassidy, J., Holt, J., Young, S. (2002). Molecular characterization of cephalosporin-resistant *Salmonella enterica* serotype newport isolates from animals in pennsylvania. J.Clin. Microbiol, 40(12), 4679-4684.

21. Smith, T.F., Tenorer, F.C., White, T.J. (1993). Diganostic molecular microbiology: principles and applications, D. H. Presing.American Society for Microbiology. Washington, D. C. AEM. Feb, 69(2), 1075-1081.

22. Wondwossen, A., Altier, C. (2002). Molecular characterization of multidrug-resistant *Salmonella enterica* subsp. enterica *Serovar typhimurium* isolates from Swine. J. Clin. Microbiol, 40(8), 2813-2822.

Archive of SID

www.SID.ir