مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال سوم، شماره۳، پاییز ۱۳۸۷ ، صفحات ۵۲-۴۵

ارزیابی، جداسازی و تشخیص سالمونلا *تیفی‌موریوم* در شیر با روش‌های متداول کشت و PCR

حسین رستگار[۱]، محمد حسین قهرمانی[۲] ، شیما حلاج نیشابوری[۳]، مریم جلالی[۴]، صغری انجرانی[۵]، رویا خسروخاور[۶]

۱- نویسنده مسئول: استادیار مرکز تحقیقات آزمایشگاهی غذا و دارو ، پست الکترونیکی:mhrastegar@yahoo.com
۲- دانشیار دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۳- کارشناس ارشد بیوشیمی، مرکز تحقیقات آزمایشگاهی غذا و دارو
۴- کارشناس میکروب‌شناسی، مرکز تحقیقات آزمایشگاهی غذا و دارو
۵- متخصص مرکز تحقیقات و آزمایشگاه مرجع سلامت
۶- استادیار مرکز تحقیقات آزمایشگاهی غذا و دارو

تاریخ دریافت: ۸۶/۱۱/۱۶ تاریخ پذیرش: ۸۷/۸/۱

چکیده

سابقه و هدف: سالمونلاها یکی از مهم‌ترین عوامل ایجاد کننده مسمومیت غذایی هستند. شناسایی سالمونلا در مواد غذایی به طور معمول از طریق کشت میکروبی انجام می شود. اما این روش، زمان‌بر است و دقت کافی ندارد. به همین دلیل در این مطالعه، استفاده ازروش PCR بجای روش معمول کشت میکروبی به عنوان یک روش سریع و دقیق برای جستجوی *سالمونلا تیفی‌موریوم* در شیر مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: ۶ نمونه شیر پاستوریزه از بازار مصرف تهیه شد. ابتدا قسمتی از این شیر با تعداد مختلفی باکتری *سالمونلا تیفی‌موریوم* (10^{3} تا 10^{-1}) به صورت دستی آلوده شد. قسمت دیگری از شیر به عنوان نمونه مورد آزمون (بدون آلودگی با باکتری سالمونلا) در محیط BPW غنی‌سازی شد. سپس این نمونه‌ها تحت آزمون‌های PCR و روش معمول کشت میکروبی قرار گرفتند.

یافته ها: روش PCR در نمونه‌هایی که به صورت دستی با *سالمونلا تیفی‌موریوم*، آلوده شد. در محیط BPW غنی‌سازی شده بودند، توانست در ۸ ، ۱۲ و ۱۶ ساعت غنی‌سازی به ترتیب ۱۰، ۵ و ۱ عدد باکتری را شناسایی کند. وجود سالمونلا با روش کشت میکروبی با مدت زمان بیشتر و دقت و حساسیت کمتر شناسایی شد. شیرهای پاستوریزه تهیه شده از بازار مصرف طی آزمایش با هر دو روش، به *سالمونلا تیفی‌موریوم* آلوده نبودند.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد با روش PCR می‌توان در کمتر از ۲۴ ساعت، نسبت به جداسازی و شناسایی *سالمونلا تیفی‌موریوم* در شیر با شناسایی حداقل ۱ باکتری در نمونه اقدام کرد. در حالی‌که مدت زمان مورد نیاز در روش معمول کشت میکروبی حدود ۴ الی ۶ روز بود و با وجود تطابق بالا بین نتایج حاصل از روش PCR با روش کشت میکروبی، دقت و حساسیت روش PCR بالاتر است.

واژگان کلیدی: *سالمونلا تیفی‌موریوم*، PCR، کشت میکروبی، شیر

• مقدمه

جنس سالمونلا بر اساس ویژگی‌های بیوشیمیایی و همولوژی DNA دارای گونه *سالمونلاانتریکا* با هفت زیرگونه است (۱). جنس سالمونلا بر اساس آنتی‌ژن‌های فلازژلر و سوماتیک به بیش از ۲۶۰۰ سروار تقسیم می‌شود که بیشتر آنها برای انسان و حیوان بیماری‌زا هستند. عموماً انتقال بیماری از طریق آب و غذا صورت می‌گیرد و امکان انتقال از طریق مستقیم پایین است (۳، ۲). با وجود استفاده وسیع از کشت معمول میکروبی برای کنترل بیماری ناشی از سالمونلا روش‌های سریع و دقیق‌تری مورد نیاز است. به همین دلیل، روش‌های سریعی با پلی‌کلونال و مونوکلونال آنتی‌بادی (۷-۴) علیه آنتی ژن‌های فلاژلر وسوماتیک، سنجش با هیبریداسیون

Archive of SID
www.SID.ir

DNA با پروب پلی‌نوکلئوتید و اولیگونوکلئوتید (۱۴-۸) توسعه یافته است.

در حال حاضر، در آزمایشگاه‌های تشخیصی بر ای جستجوی بسیاری از میکروارگانیسم‌ها (*سالمونلا، بروسلا، لیستریا، اشریشیا کلی*) از روش‌های کشت میکروبی استفاده می‌شود. این روش در تشخیص آلودگی مواد غذایی به سالمونلا علاوه بر مشکلات انجام آزمایش و عدم دقت در پاسخ‌های حاصله، نیازمند مدت زمان زیادی جهت حصول به نتیجه نهایی است. در روش کشت میکروبی برای تشخیص آلودگی میکروبی مواد غذایی به *سالمونلا تیفی‌موریوم* ۴ الی ۶ روز وقت لازم است (۱۷-۱۵). به علاوه حساسیت و دقت پاسخ‌های حاصله نیز پایین است.

به منظور افزایش حساسیت و کاهش زمان انجام آزمون از روش‌های دیگری مانند جستجوی ژن‌های مربوط به این میکروارگانیسم‌ها از طریق روش PCR به عنوان روش جایگزین استفاده می‌شود. امروزه، در آزمایشگاه‌های میکروبیولوژی مرجع و مراکز تحقیقاتی از روش PCR استفاده می‌شود (۳۶-۱۸) و به زودی به عنوان روش مرجع از سوی مرکز بین‌المللی ایزو در کنار روش‌های معمول مانند استاندارد ایران به شماره ۱۸۱۰ و ایزو ۶۵۷۹ در مواد غذایی (۱۷-۱۵) استفاده خواهد شد. با توجه به افزایش روز افزون روش‌های تشخیص ملکولی و تعیین گونه‌های میکروبی آلوده‌کننده مواد غذایی با استفاده از روش PCR در این مطالعه تلاش شد که ضمن بررسی آلودگی شیر پاستوریزه تهیه شده از بازار مصرف به *سالمونلا تیفی‌موریوم*، مزیت روش PCR نسبت به روش میکروبی مورد مطالعه و مقایسه قرار گیرد.

• مواد و روش‌ها

برای انجام آزمون PCR قسمتی از شیرهای پاستوریزه که به شکل دستی با سالمونلا آلوده شده بودند یا هیچ گونه آلودگی تجربی نداشتند، پس از مراحل کشت، غنی‌سازی و استخراج DNA تحت آزمون PCR و الکتروفورز قرار گرفتند. (۲۷، ۲۳، ۲۲، ۱۹، ۱۸) قسمت دیگر شیرهای مورد آزمایش، نیز تحت آزمون کشت معمول میکروبی قرار گرفتند (۱۷-۱۵).

مرحله کشت میکروبی، رقیق سازی و غنی‌سازی: ابتدا سوش *سالمونلا تیفی‌موریوم* به صورت پودر لیوفیلیزه استریل از "مرکز تحقیقات آزمایشگاه رفرانس" تهیه شد. سپس با لوپ استریل، مقدار بسیار کمی از آن در ۱۰ml محیط کشت TSB کشت داده شد و به مدت ۱ شب در دمای ۳۷ °C روی دستگاه شیکر انکوباتور با چرخش rpm ۱۵۰قرار گرفت. در مرحله بعد با استفاده از دستگاه UV اسپکتروفتومتر (طول موج ۶۸۰nm) و محیط کشت TSB رقتی از شیر با تعداد 10^8 باکتری در میلی‌لیتر که معادل OD=۰/۲ بود، تهیه شد (۲۰). سپس با محیط کشت TSB رقت‌های دیگری از سالمونلا (از رقت 10^7 تا 10^{-1}) تهیه شد (۱۹). در ادامه کار در ۵ لوله آزمایش، هرکدام ۴ml محیط کشت غنی شده BPW (Buffer Peptone Water) ریخته و به آن ۹۰۰ µl از شیر مورد مصرف در بازار اضافه شد. در مرحله بعدی به لوله‌های اول ۱۰۰ µl از رقت 10^3 (معادل 10^2 باکتری سالمونلا)، به لوله دوم ۱۰۰ µl از رقت 10^2 (معادل 10^1 باکتری سالمونلا) و به لوله سوم ۱۰۰µl از رقت 10^1 (معادل 10^0 یا ۱ باکتری سالمونلا) و به لوله چهارم ۱۰۰µl از رقت 10^0 (معادل 10^{-1}باکتری سالمونلا) اضافه شد. برای به دست آوردن غلظت ۵ باکتری در شیر غنی شده با BPW به لوله پنجم مقدار ۵۰µl از غلظت 10^2 و ۵۰µl از BPW اضافه شد. همچنین دو لوله دیگر، یکی حاوی ۴ میلی لیتر BPW و ۱۰۰۰µl شیر مورد مصرف در بازار به عنوان نمونه مورد آزمون و دیگری فقط حاوی ۵ میلی‌لیتر BPW به عنوان نمونه کنترل منفی تهیه شد. سپس نمونه‌های تهیه شده در مرحله قبلی به مدت ۸ ساعت در شیکر انکوباتوردار با دمای ۳۷°C قرار داده شدند. پس از ۸ ساعت، آنها از انکوباتور، خارج و به مدت ۳۰ دقیقه با دور ۶۰۰۰ rpm سانتریفوژ شدند و محلول رویی دور ریخته شد و از سلول‌های رسوب داده شده در ته لوله آزمایش به صورت پلت جهت مرحله بعدی استخراج DNA استفاده شد (۲۵، ۱۹). کلیه مراحل ذکر شده با شرایط یکسان و تنها تفاوت در مدت زمان غنی‌سازی ۱۲ و ۱۶ ساعت دوباره انجام گرفت.

استخراج DNA: استخراج DNA با استفاده از روش Boom- method (۲۳) طبق مراحل زیر انجام شد.

Archive of SID

www.SID.ir

۱- یک میلی‌لیتر Lysis buffer 1 به هر یک از لوله‌های حاوی غلظت‌های 10^{-1}، 10^{-2}، ۵، 10^{1}، 10^{2} و 10^{3} عدد باکتری و نمونه شیرپاستوریزه تهیه شده از بازار مصرف و نمونه کنترل منفی افزوده شد.
۲- ۱۰ دقیقه در $65^{\circ}C$ انکوبه شد.
۳- محلول به مدت ۳ دقیقه در ۱۳۰۰۰rpm سانتریفوژ شد.
۴- محلول رویی به یک تیوپ تمیز انتقال داده شد.
۵- ۱۰ میکرولیتر glass milk اضافه کرده، ۳۰ ثانیه ورتکس شد. (glass milk قبل ازافزودن کاملاً مخلوط و یکنواخت شده بود).
۶- ۱ ساعت در $37^{\circ}C$ انکوبه شد.
۷- ۱۰ دقیقه در $65^{\circ}C$ انکوبه شد.
۸- به مدت ۳ دقیقه در ۱۳۰۰۰rpm سانتریفوژ شد.
۹- محلول رویی دور ریخته شد. به رسوب باقیمانده ۲۰۰ میکرولیتر Lysis buffer 2 افزوده شد. رسوب کاملاً شسته شد.
۱۰- به مدت ۱ دقیقه در ۱۳۰۰۰rpm سانتریفوژ شد. محلول رویی دور ریخته شد، رسوب باقیمانده، دوباره با Lysis buffer 2 شسته و سانتریفوژ شد.
۱۱- باقیمانده دوباره با اتانول ۷۰٪ سرد شسته شد.
۱۲- حدود ۵ دقیقه نمونه رها شده تا نسبتاً خشک شود (نباید کاملاً خشک شود).
۱۳- به رسوب باقیمانده ۱۰۰µl آب دیونیزه افزوده شد تا رسوب حل شود.
۱۴- سوسپانسیون ۲۰ دقیقه در $56^{\circ}C$ قرار داده شد تا DNA از glass milk جدا شده و در آب حل شود.
۱۵- به مدت ۲ دقیقه در ۱۳۰۰۰rpm سانتریفوژ شد.
۱۶- محلول رویی، بدون مخلوط شدن با رسوب glass milk به یک تیوپ تمیز انتقال داده شد.
۱۷- ژنوم به دست آمده در $4^{\circ}C$ نگهداری شد.

روش PCR : در ۷ لوله مخصوص PCR، مقدار ۴µl از نمونه‌های استخراجی فوق ریخته شد و بقیه اجزای واکنش PCR افزوده شد. شامل: آب دیونیزهٔ دو بار تقطیر ۳۴/۱ میکرولیتر، بافر PCR(10X) ۵ میکرولیتر، dNTP ۱ میکرولیتر، $MgCl_2$ ۱/۵ میکرولیتر، آنزیم Taq polymerase ۰/۴ میکرولیتر و ۲ میکرولیتر از پرایمر ST_{11} و ۲ میکرولیتر از پرایمر ST_{15} [سکانس عمومی مربوط به گونه‌های مختلف سالمونلا با سکانس‌های

ST 11: GCCAACCATTGCTAAATTGGCGCA
ST 15: GGTAGAAATTCCCAGCGGGTACTGG

و اندازه قطعه تکثیر شده ۴۲۹bp(۲۷)]. در مجموع، حجم کل نمونه ۵۰µl شد. برای افزایش دقت و صحت واکنش می‌توان کلیه اجزای PCR غیر از DNA استخراجی و آنزیم Taq (برای جلوگیری از انجام واکنش‌های غیراختصاصی) مربوط به ۷ تیوپ را در یک تیوپ به صورت Master mix تهیه و در ۷ لوله تقسیم و سپس دو جزء بعدی را به آنها افزود. در ۷ لوله مخصوص PCR دیگر، کلیه اجزای PCR مانند مراحل بالا تهیه شد. تنها تفاوت، اضافه کردن پرایمر Fli_{15} ,Tym [سکانس مربوط به ژن flic با سکانس‌های

Fli 15: CGGTGTTGCCCAGGTTGGTAAT
Tym: ACTCTTGCTGGCGGTGCGACTT

و اندازه قطعه تکثیر شده ۵۵۹bp (۲۷)] به جای پرایمرهای ST_{15},ST_{11} بود. واکنش PCR با ۳۵ سیکل با مراحل باز شده DNA در درجه حرارت $94^{\circ}C$ و ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمر در درجه حرارت $56^{\circ}C$ و ۴۵ ثانیه و مرحله پلیمریزه شدن با درجه حرارت $72^{\circ}C$ و۳۰ ثانیه انجام شد. واکنش PCR در مرحله انتهایی با درجه حرارت $72^{\circ}C$ و ۱۰ دقیقه صورت گرفت(۲۷). کلیه مراحل فوق برای نمونه‌های غنی شده درBPW در مدت زمان‌های ۸، ۱۲ و ۱۶ ساعت طی سه مرحله به طورجداگانه تکرار شد.

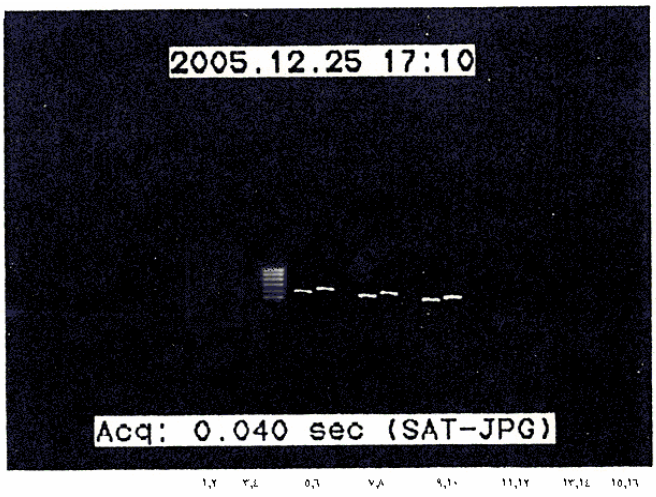
الکتروفورز نمونه‌های به دست آمده مرحله PCR: برای آماده کردن ژل آگاروز ۱/۵ گرم آگاروز به کمک حرارت در ۱۰۰ml بافر TAE 1x حل شد. در حین سرد شدن ژل در دمای حدود $50-60^{\circ}C$ مقدار ۲۵µl اتیدیوم برمایید به آن افزوده و در قالب ریخته شد. پس از بستن ژل در قالب، داخل تانک حاوی بافر TAE 1x قرار داده شد و به ۲۰µl از هر کدام از نمونه‌های PCR شده در مرحله قبل، مقدار ۵µl رنگ افزوده شد. سپس ۵µl از هر نمونه به ترتیب در حفره‌های ایجاد شده در ژل وارد شد. منبع تغذیه دستگاه الکتروفورز روشن و روی ۶۰ میلی‌آمپر تنظیم شد. به مدت ۱ ساعت حرکت DNA روی ژل صورت گرفت. سپس باندهای DNA مربوط به نمونه‌های PCR شده مرحله قبل زیر نور UV مشاهده شد (۳۷).

Archive of SID
www.SID.ir

جستجوی سالمونلا در شیر با استفاده از روش کشت میکروبی: همه نمونه‌های آماده شده در مرحله اول (پس از غنی سازی) روی پلیت‌های حاوی دو محیط کشت SS و BG کشت خطی داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور $37 \pm 1^{\circ}C$ قرار داده شد. عدم مشاهده کلنی یا پرگنه مشکوک در محیط‌های SS و BG نشان دهنده عدم آلودگی نمونه به سالمونلا است، اما در صورت وجود آلودگی، کلنی‌های مشکوک به سالمونلا در محیط SS به صورت کلنی‌های شفاف و بی‌رنگ، گاهی با مرکز سیاه رنگ و در محیط BG به رنگ صورتی قابل مشاهده است. برای شناسایی دقیق کلنی‌های مشکوک به سالمونلا، در مرحله بعد با انتقال آنها به لوله آزمایش حاوی ۰/۵ml آب مقطر و دیسک ONPG و انکوبه کردن در $37 \pm 1^{\circ}C$ به مدت ۲ تا ۶ ساعت اقدام شد. عدم تغییر رنگ محلول OPNG نشانه عدم آلودگی به سالمونلا بود. همچنین، با انجام آزمایش‌های افتراقی سرولوژی و بیوشیمیایی، مانند TSI و LIA، سیترات، اوره و اندل و تست VP می‌توان وجود *سالمونلا تیفی‌موریوم* را درنمونه‌های اولیه یا شیرهای مورد آزمایش تشخیص داد (۱۷-۱۵).

• یافته‌ها

الکتروفورز DNAهای استخراج شده از نمونه‌های *سالمونلا تیفی‌موریوم* در شیر پس از ۸ ساعت غنی‌سازی: پس از قرار دادن ژل الکتروفورز شده زیر نور UV مربوط به نمونه‌ای DNA استخراجی از غلظت‌های 10^{3}، 10^{2}، 10^{1}، ۵، 10^{0}، 10^{-1} عدد سالمونلا در شیر و نمونه شیر پاستوریزه تهیه شده از بازار مصرف و نمونه BPW (کنترل منفی) مشاهده شد پس از ۸ ساعت غنی‌سازی می‌توان تا 10^{1} باکتری *سالمونلاتیفی‌موریوم* را که به صورت دستی به شیر اضافه شده بود با روش PCR تشخیص داد، اما هیچ گونه باندی در آلودگی با غلظت‌های $5،10^{0}$ و 10^{-1} باکتری سالمونلا و نمونه شیر پاستوریزه و تهیه شده از بازار مصرف و نمونه BPW (کنترل منفی) مشاهده نشد (شکل ۱).



شکل۱- الگوی الکتروفورز DNA استخراج شده از غلظت‌های متفاوت *سالمونلاتیفی‌موریوم* در مواد غذایی پس از ۸ ساعت غنی‌سازی در محیط BPW روی ژل آگاروز

در شکل، به ترتیب از چپ به راست باندهای مربوط به جفت پرایمر ST_{11} و ST_{15} (اندازه قطعه تکثیر شده ۴۲۹bp) و جفت پرایمر Tym, Fli (اندازه قطعه تکثیر شده ۵۵۹bp) در نواحی ۵ و ۶ مربوط به غلظت 10^{3}، در نواحی ۷ و ۸ مربوط به غلظت 10^{2}، در نواحی ۹ و ۱۰ مربوط به غلظت 10^{1} و سایز مارکر بین نواحی ۴ و ۵ مشاهده می‌شود. در نواحی ۱ و ۲ باندهای مربوط به نمونه شیر پاستوریزه تهیه شده از بازار مصرف و در نواحی ۳ و ۴ مربوط به نمونه BPW (کنترل منفی) و همچنین نواحی ۱۱ و ۱۲ مربوط به غلظت ۵، نواحی ۱۳ و ۱۴ مربوط به غلظت 10^{0} و نواحی ۱۵ و ۱۶ مربوط به غلظت 10^{-1} که هیچ باندی مربوط به جفت پرایمر فوق مشاهده نمی‌شود.

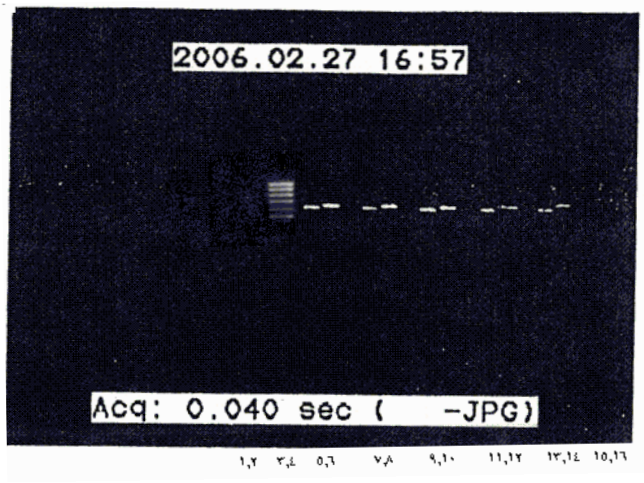
الکتروفورز DNAهای استخراج شده از نمونه‌های *سالمونلا تیفی‌موریوم* در شیر پس از ۱۲ ساعت غنی‌سازی: پس از قرار دادن ژل الکتروفورز شده زیر نور UV مربوط به نمونه‌های DNA استخراج شده از غلظت‌های 10^{3}،10^{2}، 10^{1}، ۵، 10^{0}، 10^{-1} سالمونلا در شیر و نمونه شیر پاستوریزهٔ تهیه شده از بازار مصرف و نمونه BPW (کنترل منفی) مشاهده شد. پس از ۱۲ ساعت غنی‌سازی می‌توان تا ۵ باکتری *سالمونلاتیفی‌موریوم* را که به صورت دستی به شیر اضافه شده بود با روش PCR تشخیص داد، اما هیچ گونه باندی در آلودگی با غلظت‌های 10^{0} و 10^{-1} باکتری سالمونلا و نمونه شیر پاستوریزهٔ تهیه شده از بازار مصرف و نمونه BPW (کنترل منفی) مشاهده نشد (شکل ۲).

Archive of SID

www.SID.ir

شکل ۲- الگوی الکتروفورز DNA استخراج شده از غلظت‌های متفاوت *سالمونلا تیفی‌موریوم* در مواد غذایی پس از ۱۲ ساعت غنی‌سازی در محیط BPW روی ژل آگاروز

در شکل به ترتیب، از چپ به راست، باندهای مربوط به جفت پرایمر ST_{11} و ST_{15} (اندازه قطعه تکثیر شده ۴۲۹bp) و جفت پرایمر Tym, Fli (اندازه قطعه تکثیر شده ۵۵۹bp) در نواحی ۵ و ۶ مربوط به غلظت 10^{3}در ناحیه ۷ و ۸ مربوط به غلظت 10^{2}، در نواحی ۹ و ۱۰ مربوط به غلظت 10^{1}و در نواحی ۱۱ و ۱۲ مربوط به غلظت ۵ و سایز مارکر بین نواحی ۴ و ۵ مشاهده می‌شود. در نواحی ۱ و ۲ باندهای مربوط به نمونه شیر پاستوریزهٔ تهیه شده از بازار مصرف و در نواحی ۳ و ۴ مربوط به نمونه BPW (کنترل منفی) و همچنین نواحی ۱۳ و ۱۴ مربوط به غلظت 10^{0} و نواحی ۱۵ و ۱۶ مربوط به غلظت 10^{-1} که هیچ باندی مربوط به جفت پرایمر فوق مشاهده نمی‌شود.



شکل ۳- الگوی الکتروفورز DNA استخراج شده از غلظت‌های متفاوت *سالمونلا تیفی‌موریوم* در مواد غذایی پس از ۱۶ ساعت غنی‌سازی در محیط BPW روی ژل آگاروز

در شکل به ترتیب، از چپ به راست، باندهای مربوط به جفت پرایمر ST_{11} و ST_{15} (اندازه قطعه تکثیر شده ۴۲۹bp) وجفت پرایمر Tym, Fli (اندازه قطعه تکثیر شده ۵۵۹bp) در نواحی ۵ و ۶ مربوط به غلظت 10^{3}، در نواحی ۷ و ۸ مربوط به غلظت 10^{2}، در نواحی ۹ و ۱۰ مربوط به غلظت 10^{1}، در نواحی ۱۱ و ۱۲ مربوط به غلظت ۵ و در نواحی ۱۳ و ۱۴ مربوط به غلظت 10^{0} و سایز مارکر بین نواحی ۴ و ۵ مشاهده می‌شود. در نواحی ۱ و ۲ مربوط به نمونه شیر پاستوریزه تهیه شده از بازار مصرف و در نواحی ۳ و ۴ مربوط به نمونه BPW (کنترل منفی) و همچنین نواحی ۱۵ و ۱۶ مربوط به غلظت 10^{-1} که هیچ باندی مربوط به جفت پرایمر فوق مشاهده نمی‌شود.

الکتروفورز DNAهای استخراج شده از نمونه‌های *سالمونلا تیفی‌موریوم* در شیر پس از ۱۶ ساعت غنی‌سازی: پس از قرار دادن ژل الکتروفورز شده زیر نور UV مربوط به نمونه‌های DNA استخراج شده از غلظت‌های 10^{3}، 10^{2}، 10^{1}، ۵، 10^{0}، 10^{-1} عدد سالمونلا در شیر و نمونه شیر پاستوریزهٔ تهیه شده از بازار مصرف و نمونه BPW (کنترل منفی) مشاهده شد. پس از ۱۶ ساعت غنی‌سازی می‌توان تا یک باکتری *سالمونلاتیفی‌موریوم* را که به صورت دستی به شیر اضافه شده بود با روش PCR تشخیص داد، اما هیچ گونه باندی در آلودگی با غلظت 10^{-1} باکتری سالمونلا و نمونه شیر پاستوریزهٔ تهیه شده از بازار مصرف و نمونه BPW (کنترل منفی) مشاهده نشد (شکل ۳).

افزایش مدت زمان غنی‌سازی در BPW از ۱۶ ساعت به ۲۰ و ۲۴ ساعت، تأثیری در افزایش حد شناسایی تعداد باکتری سالمونلا در غلظت‌های پایین‌تر نداشت و نتایج به دست آمده، مشابه نتایج حاصل از ۱۶ ساعت غنی‌سازی بود.

کشت معمول میکروبی و روش‌های تشخیص افتراقی بیوشیمیایی و سرولوژی: با استفاده از روش کشت معمول میکروبی و سپس روش‌های افتراقی بیوشیمیایی و سرولوژی انجام گرفته روی نمونه شیر پاستوریزه تهیه شده از بازار مصرف و نمونه کنترل منفی و نمونه‌های شیر آلوده شده با غلظت‌های مختلف *سالمونلاتیفی‌موریوم* که به مدت ۸ ، ۱۲ و ۱۶ ساعت در محیط BPW غنی سازی شده قرار داشتند، مشخص شد که هیچ گونه آلودگی در

Archive of SID

www.SID.ir

نمونه‌های شیر مورد مصرف در بازار مصرف مشاهده نمی‌شود. در حالی‌که وجود *سالمونلاتیفی‌موریوم* در نمونه‌های شیر آلوده شده با غلظت‌های مختلف سالمونلا طی مدت زمان ۴ الی۵ روز غیر از یک مورد، قابل تشخیص بودند.

• بحث

سالمونلا یکی از مهم‌ترین علت‌های شیوع بیماری‌های ناشی از غذا در جهان است. مهم‌ترین سروتیپ جدا شده از انسان *سالمونلاتیفی‌موریوم* و انتریتیریس است(۲۷). بنابراین، کنترل میکروبی مواد غذایی اهمیت خاصی دارد. عوامل میکروبی مختلفی می‌توانند موجب فساد مواد غذایی و بروز بیماری شوند. باکتری‌های خانواده سالمونلا جزء باکتری‌های مضری هستند که نباید در مواد غذایی وجود داشته باشند(۳۵). روش معمول برای کنترل آلودگی میکروبی مواد غذایی روش کشت میکروبی است. جهت کنترل میکروبی و شناسایی افتراقی سالمونلا در مواد غذایی با روش کشت میکروبی، حداقل ۴ تا ۶ روز وقت لازم است (۱۸، ۱۷).

با معرفی روش PCR مسیر جدیدی برای شناسایی میکروارگانیسم‌ها ایجاد شده است.در مطالعه حاضر، روش PCR به عنوان یک روش جدید در تشخیص آلودگی میکروبی (۳۶-۱۸) در مقایسه با روش معمول کشت میکروبی (۱۷-۱۵) در تشخیص یک سرووار از سالمونلاهای آلوده کننده مواد غذایی به نام *سالمونلا تیفی‌موریوم* از نظر مدت زمان پاسخ‌دهی، دقت و حساسیت دو روش بررسی شدند. همچنین، نمونه‌های شیر پاستوریزهٔ تهیه شده از بازار مصرف از نظر آلودگی به باکتری *سالمونلاتیفی‌موریوم* با دو روش فوق، مورد آزمایش قرار گرفتند.

در شکل ۱، الکتروفورزDNAهای استخراج شده از نمونه‌های PCR شده مربوط به شیرهای آلوده شده دستی با غلظت‌های 10^{3} تا 10^{-1} باکتری *سالمونلاتیفی‌موریوم* که ۸ ساعت در محیط کشت BPW غنی‌سازی شدند، نشان داده شده است. پرایمرهای ST_{11} و ST_{15} (پرایمرهای عمومی کلیه سالمونلاها با ایجاد باند با اندازه ۴۲۹ bp) و پرایمرهای Tym Fli_{15} (پرایمرهای اختصاصی *سالمونلا تیفی‌موریوم* با ایجاد باند با اندازه bp ۵۵۹) قادر به ایجاد باند در شیرهای آلوده شده دستی به *سالمونلا تیفی‌موریوم* با حد شناسایی ۱۰ باکتری با مدت زمان ۸ ساعت غنی‌سازی در BPW بودند. هیچ گونه باندی مربوط به هردو جفت پرایمر در نمونه شیر پاستوریزهٔ تهیه شده از بازار مصرف به عنوان نمونه مورد آزمایش و نمونه BPW (به عنوان نمونه کنترل منفی) مشاهده نشد. این موضوع به معنی آلوده نبودن نمونه‌های شیر پاستوریزهٔ تهیه شده از بازار مصرف و نمونه کنترل منفی به عنوان نمونه شاهد است.

در شکل‌های ۲ و ۳ در شرایط مشابه فوق، نتایج الکتروفورز روی DNAهای استخراج شده از نمونه‌های PCR شده شیرهای آلوده شده دستی با غلظت‌های 10^{3} تا 10^{-1} باکتری *سالمونلاتیفی‌موریوم* و نمونه‌های شیر پاستوریزهٔ تهیه شده از بازار مصرف و نمونه کنترل منفی با مدت زمان غنی‌سازی ۱۲ و ۱۶ ساعت در محیط BPW نشان داده شده است. افزایش مدت زمان غنی‌سازی به ۱۲ و ۱۶ ساعت منجر به مشاهده باند به ترتیب در غلظت‌های با حد شناسایی ۵ و ۱ باکتری *سالمونلاتیفی‌موریوم* در نمونه‌های شیر آلوده شده دستی با سالمونلا شد. اما هیچ گونه باندی در نمونه‌های شیر پاستوریزه تهیه شده از بازار مصرف و نمونه کنترل منفی مشاهده نشد. افزایش مدت زمان غنی‌سازی در BPW از ۱۶ ساعت به ۲۰ و ۲۴ ساعت تأثیری در افزایش حد شناسایی سالمونلا در نمونه‌های مورد آزمایش نداشت که نشان می‌دهد ۱۶ ساعت غنی‌سازی در این آزمایش‌ها، مناسب است. حداکثر مدت زمان مورد نیاز برای انجام این آزمایش از شروع غنی سازی ۱۶ ساعته تا انجامPCR و الکتروفورز و مشاهده نتیجه حدود ۲۴ ساعت است.

نتایج این مطالعه با بیشتر نتایج حاصل از مطالعات دیگران تطابق دارد. *Aado* و همکاران در سال ۱۹۹۳ نشان دادند که پرایمرهای ST11 و ST15 قادر به تکثیر قطعات bp ۴۲۹ در ۱۴۴ گونه سالمونلا از تعداد کل ۱۴۶ گونه (۱۱۶ سروار از ۱۱۸ سروار) با اختصاصیت و ویژگی بالا برای تشخیص بیماری ناشی از سالمونلا در غذا بودند. (۲۲).

Archive of SID

www.SID.ir

پس از آن پرایمرهای Fli15 و Tym با تکثیر قطعات ۵۵۹ bp به طور اختصاصی موجب شناسایی *سالمونلاتیفی‌موریوم* از سایر سالمونلاها شدند. (۲۷). بیشتر مطالعات انجام در زمینهٔ مقایسه روش PCR با روش کشت روتین میکروبی نشان داده که تطابق بالایی بین نتایج دو روش وجود داشته است. (۲۷-۲۵،۱۹-۱۸) اما در برخی مطالعات، تطابق روش PCR با روش کشت میکروبی در تشخیص سالمونلا پایین بوده است (۲۱).

در مطالعه حاضر تطابق بالایی بین روش PCR با روش کشت میکروبی وجود داشت و تمام نمونه‌های شیرهای مورد آزمایش با آلودگی تجربی به سالمونلا (غیر از یک مورد با کشت میکروبی) قابل تشخیص با هر دو روش بودند، اما در نمونه‌هایی که به صورت تجربی آلوده نشده بودند، هیچ‌گونه آلودگی با هر دو روش مذکور مشاهده نشد.

مطالعات نشان می‌دهد که دقت و حساسیت روش PCR بیشتر از روش کشت میکروبی است و روش PCR مدت زمان کمتری (حدود ۲۴ ساعت) در مقابل ۴ الی ۶ روز برای روش کشت میکروبی لازم دارد. این نتایج در راستای بیشتر مطالعات قبلی دیگران است (۲۷،۲۱،۱۹-۱۸). ضمناً ااین مطالعه ما نشان داد که شیرهای پاستوریزهٔ تهیه شده از بازار مصرف به *سالمونلاتیفی‌موریوم* آلوده نبودند.

بنابراین، نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که با روش PCR می‌توان طی مدت زمان حدود ۲۴ ساعت نسبت به شناسایی آلودگی مواد غذایی مانند شیر به *سالمونلاتیفی‌موریوم* اقدام کرد. ضمناً با افزایش مدت زمان غنی‌سازی شیر در محیط کشت BPW از ۸ ساعت به ۱۶ ساعت حد شناسایی را می‌توان تا تعداد ۱ باکتری سالمونلا در نمونه افزایش داد. در مقابل، انجام آزمایش با روش کشت معمول میکروبی برای شناسایی افتراقی *سالمونلا تیفی‌موریوم* به مدت زمانی حدود ۴ الی ۶ روز وقت نیاز دارد و به علاوه، دقت و حساسیت روش مذکور کمتر از روش PCR است.

سپاسگزاری

این طرح با حمایت مالی مرکز *ملی تحقیقات علوم پزشکی کشور* انجام شد که به این وسیله از ریاست محترم مرکز و همکاران گرامی خانم‌ها چینه‌کش، درخشانی و افلاکی تقدیر و تشکر می‌شود.

• References

1. Le Minor L, Popoff MY, Laurent B, Hermant D. Individualization dune septieme sous- espece de *Salmonella S. Choleraesuis* subsp. Indica subsp. nov. Annales de Institute Pasteur/ Microbiologie 1986; 137B: 211- 17.
2. Oesterom J. Epidemiological studies and Proposed Preventive measures in the fight against human Salmonellosis. Int J Food Microbiol 1991;12: 41- 52.
3. D Aoust JY. Pathogenecity of foodborne Salmonella. Int J Food Microbiol 1991; 12: 17- 40.
4. Krysinki EP, Heimsch RC. Use of enzyme labeled antibodies to detect Salmonella in foods. Appl Environ Microbiol 1977; 33: 947- 54.
5. Minnich S A, Hartman PA, Heimsch RC. Enzyme immunoassay for detection of Salmonella in foods. Appl Environ Microbiol 1982; 43:877- 83.
6. Rigby CE. Enzyme- linked immunosorbent assay for detection of Salmonella lipopolysaccharide in poultry specimens. Appl Environ Microbiol 1984; 47:1327- 30.
7. Mattingly JA.. An enzyme immunoassay for the detection of all Salmonella using a combination of a myeloma protein and an hybridoma antibody. J Immunol Methods 1984; 73: 147- 56.
8. Fitts R, Diamond M, Hamilton C, Neri M. DNA-DNA hybridization assay for detection of *Salmonella spp.* In foods. Appl Environ Microbiol 1983; 46: 1146- 51.
9. Gopo JM, Melis E, Fillipska E, MeneverI R, Filipski, J. Development of a Salmonella- specific biotinviated DNA probe for rapid routine identification of Salmonella. Mol Cell Probes1988; 2: 271- 9.
10. Tsen HY, Chen MH, Shiehm J S, Wang S J, Hu N T. Possible use of a 1.8kb DNA fragment for the specific detection of Salmonella in foods. J Ferment Bioeng 1989; 68: 1- 6.
11. Schaoll DR, Kaufman C, Jokllick JD, York CK, Goodrom GR, Charache P. Clinical application of a novel sample processing technology for the identification of Salmonella by using DNA Probes. J Clin Microbiol 1990; 28: 237- 47.
12. Olsen JE, Aabo S, Nieisen EO, Nielsen BB. Isolation of a Salmonella Specific DNA hybridization Probe. APMIS 1991;99: 114- 20.

Archive of SID

www.SID.ir

13. Wilson SG, Chan S, Deroo M, Vera- Garcia M, Johnson A, Lane DN. Development of a Colorimetric, Second generation nucleic acid method for detection for Salmonella in foods and a comparison with conventional culture procedure. J Food Sci 1990;55: 1394- 8.
14. Tsen HY, Wang SJ, Roe B A, Green SS. DNA sequence of oligonucleotide Probe for Salmonella detection. Appl Microbiol Biotechnol 1991; 35:339-47.
15. International Organization of Standardization Microbiology of food and animal feeding stuffs-Detection of Salmonella, ISO 6579, Switzerland: ISO; 2002.
16. Institute of Standards and Industrial Research of Iran, Detection and identification method of salmonellas. ISIRI no 1810. 2nd revision, Karaj: ISIRI; 1990. [in Persian]
17. International Organization of Standardization Microbiology of food and animal feeding stuffs: Horizontal method for the detection of Salmonella ISO 6579, Switzerland: ISO; 2003.
18. Rijpen N, Herman L, Vereecken F, Jannes G, Smedt JD, De Zutter L. Rapid detection of stressed Salmonella spp. In: Dairy and egg products using immunomagnetic separation and PCR Int J Food Microbiol 1999; 46:37- 44.
19. Trkov M, Majerikova I, Jerasek B, Stefanovicova A, Rijpens N, Kuchta T. Detection of Salmonella in food over 30 h using enrichment and polymerase chain reaction. Food Microbiol 1999; 16:393- 399.
20. Elizabeth AS, Bernard MM. Detection of *Salmonella enteritidis* by reverse transcription- Polymerase chain reaction (PCR). Int J Food Microbiol 1999; 51:113-112.
21. Michael PW, Catherine AA, Laurent LC, Ching CW. Evaluation of a PCR to detect Salmonella in fecal samples of horses admitted to a veterinary teaching hospital. J Vet Diagn Invest 2005; 17: 118- 123.
22. Aabo S, Rasmussen OF, Sorensen LPD, Olsen E. Salmonella identification by the polymerase chain reaction. Mol and Cell Probes 1993; 7:171- 178.
23. Boom R, Sol C, Beld M, Weel J, Goudsmit J, Dillen PW. Improved silica- guanidinium thiocyanate DNA isolation procedure based on seletive binding of bovin alpha- casein to silica particles. J clin microbiol 1999;Mar:615- 619.
24. Zahraei TS, Mahzounieh M, Saeedzadeh A. Detection of invA gene in isolated salmonella from broilers by PCR method. Int J Poultry Sci 2005;4 (8): 557- 559.
25. Bennett AR, Greenwood D, Tennant C, Banks JG, Betts RP. Rapid and definitive detection of salmonella in foods by PCR. Lett Appl Microbiol 1998; 26: 437- 441.
26. Kumar R, Surendran PK, Thampuran N. Evaluation of culture, ELISA and PCR assays for the detection of Salmonella in seafood. Lett Appl Microbiol 2008; 46:221-226.
27. Soumet C, Ermel G, Rose V, Rose N, Drouin P, Salvat G, Colin P. Identification by a multiplex PCR-based assay of *Salmonella typhimurium* and *Salmonella enteritidis* strains from environmental swabs of poultry houses Lett Appl Microbiol 1999; 29:1- 6.
28. Piknova, A. Detection of Salmonella in food, equivalent ISO 6579, by a three-day polymerase chain reaction- based method, Food Control, April 2002; Volume 13, Issue 3: Page 191-194 U.
29. Gooding CM, Chousary PV. Comparison of different primers for rapid detection of Salmonella using the polymerase chain reaction, Mol Cell Probes, 1999; 5: 341-347.
30. Microbiology of food and animal feeding stuffs-polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens- General method specific requirements, Draft international standards ISO/DIS 22174, 2002; ISO/TC 34/SC 9.
31. Karns JS, VanKessel JS, McCluskey BJ. Perdue ML. Prevalence of *Salmonella enterica* in bulk tank milk from US dairies as determined by polymerase chain reaction. J Dairy Sci, 2005; 88(10):3475-9
32. Chiu TH, Chen TR, Hwang WZ, Tsen HY. Sequencing of an internal transcribed spacer region of 16S-23S rRNA gene and designing of PCR primers for the detection of *Salmonella spp.* in food. Int J Food Microbiology 2005; 1, 97(3) :259-65.
33. Riyaz-Al-Hassan S, Verma V, Qazi GN. Rapid detection of Salmonella by polymerase chain reaction. Mol Cell Probes 2004; 18(5):333-9.
34. Wan J, King K, Craven H, McAuley C, Tan SE, Coventry MJ. Probeliatrade mark PCR system for rapid detection of Salmonella in milk powder and ricotta cheese. Lett Appl Microbiology 2000; 30(4): 267-71.
35. Lin JS, Tsen HY. Development and use of polymerase chain reaction for the specific detection of *Salmonella typhimurium* in stool and food samples. J Food Prot 1999;62(10):1103-10.
36. Cohen HJ, Mechanda SM, Lin W. PCR amplification of the fimA gene sequence of *Salmonella typhimurium*, a specific method for detection of Salmonella spp. Appl Environ Microbiology 1996; 62(12):4303-8.
37. Sambrook J and Russel DW. Molecular cloning: A laboratory manual. 3rd ed: New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001:5.14-5.15.

Archive of SID

www.SID.ir