



شناسایی سالمونلاهای جدا شده از گاوداری‌های شیری استان تهران و البرز با استفاده از روش‌های کلاسیک و مولکولی

هادی غفاری^۱، تقی زهرایی صالحی^۲، فرهاد موسی خانی^۳

^۱ گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، کرج، ایران

^۲ گروه میکروبیولوژی و ایمنولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

^۳ گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، کرج، ایران

doi 10.22059/jvr.2020.232882.2626

تاریخ دریافت: ۲۵ فروردین ماه ۱۳۹۹، تاریخ پذیرش: ۲۷ خرداد ماه ۱۳۹۹

چکیده

زمینه مطالعه: سالمونلا در گاوداری‌های با تراکم بالا بومی می‌شود و سالمونلوز عامل مرگ و میر در گوساله‌ها می‌باشد. شیوع بیماری و تلفات معمولاً ناشی از اشتباهات مدیریتی و عوامل استرس‌زای محیطی است که باعث تضعیف سیستم ایمنی و در معرض قرار گرفتن میزبان به پاتوژن می‌شود.

هدف: در این مطالعه از روش PCR برای شناسایی سالمونلا انتریتیدیس، اینفنتیس، دابلین و سرووارهای دیگر در نمونه‌های اسهال گوساله و جنین سقط شده در گاوداری‌های شیری استان تهران و البرز استفاده شد. مشاهدات بعدی نشان داد که سالمونلا انتریتیدیس و سالمونلا اینفنتیس ارتباط نزدیکی با پودر گوشت مرغی آلوده که در جیره غذایی استفاده شده دارد.

روش کار: ۴۱ نمونه جدا شده از اسهال گوساله و جنین سقط شده در گاوداری‌های استان تهران و البرز پس از تایید با آزمایش‌های بیوشیمیایی، برای سروتایپینگ با آنتی سرم‌های پلی‌والان و منو‌والان مورد آزمایش قرار گرفتند. DNA باکتری‌ها با روش جوشاندن استخراج شد و حضور ژن‌های اختصاصی سالمونلا انتریتیدیس، اینفنتیس و دابلین با پرایمرهای اختصاصی ردیابی شد.

نتایج: تمام نمونه‌ها در آزمایش PCR مثبت بودند. ۳۲ نمونه سالمونلا انتریتیدیس (۷۸/۰۴ درصد)، ۴ نمونه سالمونلا اینفنتیس (۹/۷۷ درصد) و پنج نمونه سالمونلا دابلین (۱۲/۱۹ درصد) شناسایی شدند.

نتیجه‌گیری نهایی: با توجه به نتایج به نظر می‌رسد PCR می‌تواند به عنوان یک روش جایگزین به جای روش‌های بیوشیمیایی و سرولوژیکی گران قیمت و وقت گیر برای شناسایی سرووارهای سالمونلا باشد. جداسازی سالمونلا انتریتیدیس که معمولاً از طیور جدا می‌شود، ممکن است به دلیل استفاده از پودر گوشت مرغی در جیره غذایی گاوداری‌ها باشد.

کلمات کلیدی: سالمونلا، گوساله، PCR، سروتایپینگ، پودر گوشت

کپی‌رایت © تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است.

نویسنده مسئول: فرهاد موسی خانی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، کرج، ایران

پست الکترونیکی: fmoosakhani@kiaou.ac.ir

مقدمه

تمامی سرووارهای این باکتری بالقوه بیماری‌زا بوده و طیف وسیعی از میزبان‌ها از جمله انسان، طیور، پستانداران، ماهی‌ها و حتی برخی از بی‌مهرگان را آلوده می‌نماید (۱۰، ۱۱، ۲۹، ۳۰، ۳۱). سرووارهای سالمونلا را می‌توان به عنوان یکی از عوامل مهم ایجاد

جنس سالمونلا یکی از پنجاه و سه جنس و یکی از مهم‌ترین جنس‌های خانواده انتروباکتریاسه محسوب می‌شود. تاکنون بیش از ۲۶۵۸ سرووار در این جنس شناخته شده و هر سال ده‌الی بیست سرووار جدید شناسایی و به آن‌ها افزوده می‌شود (۱۲)،

مواد و روش کار

در مطالعه حاضر ۴۱ جدایه مشکوک به سالمونلا (۳۵ جدایه مربوط به اسهال گوساله‌ها و ۶ جدایه متعلق به جنین سقط شده) که از گاوداری‌های شیری استان تهران و البرز جداسازی شده بودند، مورد بررسی قرار گرفتند. این جدایه‌ها ابتدا با استفاده از خواص بیوشیمیایی و تعیین گروه سرمی با آنتی سرم‌های اختصاصی شرکت BD و Diffco شناسایی شده سپس جهت تأیید نهایی آن‌ها، از آزمون PCR استفاده گردید (۳،۲۷). برای انجام آزمون PCR ابتدا استخراج DNA باکتری‌ها به روش جوشاندن صورت گرفت. بدین شکل که چند کلنی از باکتری کشت داده شده در محیط LB آگار در ۳۰۰ میکرو لیتر آب مقطر استریل در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شد و پس از مرحله سانتریفیوژ مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر مایع رویی برداشت شده و تا زمان آزمون PCR در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید (۳،۲۷،۲۸،۳۱). در این تحقیق از سوش‌های سالمونلا انتریتیدیس، اینفنتیس و دابلین تأیید شده که در گنجینه میکروبی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران نگهداری می‌شدند به عنوان شاهد مثبت و از آب دو بار تقطیر دیونیزه نیز به عنوان شاهد منفی استفاده شد (۱،۲۴،۲۶).

انجام آزمون PCR: مواد مورد استفاده در واکنش PCR

از شرکت سینا کلون تهیه شد که شامل مسترمیکس و پرایمرهای اختصاصی برای تشخیص سالمونلاهای دابلین، انتریتیدیس و اینفنتیس بودند (جدول ۱، ۲، ۳). حجم واکنش برای هر نمونه ۲۵ میکرو لیتر محاسبه شد و برنامه حرارتی در ۳۵ سیکل انجام گرفت (۹،۳۰). در این تحقیق از ژل آگار ۱/۲ درصد استفاده شد و به میزان ۵ میکرو لیتر از محصول PCR به چاهک‌ها انتقال یافت و در کنار آن‌ها دو چاهک شاهد مثبت و منفی نیز در نظر گرفته شد (۱،۱۷،۲۴،۲۵). مارکر مورد استفاده در این مطالعه ۱۰۰bp و مربوط به شرکت سینا کلون انتخاب گردید. سپس ژل در داخل مخزن الکتروفورز حاوی بافر TBE 1X قرار گرفت و به مدت یک ساعت با ولتاژ ۱۲۰ و تواتر ۷۴ آمپر، الکتروفورز صورت گرفت. برای رنگ‌آمیزی به مدت ۱۰ تا ۲۰ دقیقه در محلول اتیديوم بروماید قرار گرفت و ژل بعد از شستشو با آب بر روی دستگاه ژل داکيومنتیشن قرائت شد (۹،۱۳،۲۷،۳۰).

بیماری در مرغداری‌ها و دامداری‌ها نام برد (۴). اگر فرآورده‌های غذایی اضافه شده به جیره دام به صورت اصولی و بهداشتی تهیه نشوند می‌توانند باعث ایجاد بیماری و خسارت‌های اقتصادی به صنعت دامپروری شوند. لذا برای جلوگیری از این موارد می‌توان از جداسازی عوامل بیماری‌زا بر پایه کشت، آزمون‌های بیوشیمیایی، سرولوژی و ملکولی به ویژه PCR کمک گرفت (۲۴). در مطالعه‌ای تحت عنوان بررسی چهره‌های بالینی سالمونلوز و میزان شیوع گروه‌های سرمی در گوساله که توسط Nadalian و همکاران در سال ۲۰۰۷ انجام گرفت پس انجام آزمون بر پایه کشت از مجموع ۱۳۲ نمونه مورد بررسی، ۱۸ نمونه سالمونلا شناخته شدند که از این تعداد بعد از آزمایشات تعیین گروه سرمی، ۱ نمونه (۵/۵ درصد) در گروه C1، ۱ نمونه (۵/۵ درصد) در گروه C2، ۵ نمونه (۲۷/۸ درصد) در گروه B و ۱۱ نمونه (۶۱/۲ درصد) در گروه D قرار داشتند (۱۹). Zahraei و همکاران در سال ۲۰۰۵ در مطالعه‌ای تحت عنوان کاربرد توام روش جداسازی ایمینومگنتیک و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز چندتابی جهت جستجو و ردیابی سالمونلا انتریکا تحت گونه انتریکا سروار تیفی موریوم در نمونه‌های مدفوع اسهالی گاو پس از آزمایش باکتريولوژی از ۴۰۰ نمونه مدفوع اسهالی گاو ۳۳ مورد سالمونلا تشخیص داده شد و بعد از آزمایش آگلوتیناسیون از این ۳۳ مورد، تعداد ۳ جدایه سالمونلا دابلین (۹/۱ درصد)، ۱ جدایه سالمونلا انتریتیدیس (۳ درصد) که هر دو در گروه D می‌باشند و ۲۲ نمونه سالمونلا تیفی موریوم (۶۶/۷ درصد) که در گروه B هستند نشان داده شد، سپس با استفاده از پرایمر اختصاصی مورد آزمایش PCR قرار گرفتند که از میان آن‌ها در نمونه‌های واجد سروتیپ دابلین و انتریتیدیس تنها یک باند ۲۸۴ جفت باز مربوط به ژن *invA* و چهار باند ۶۶۳، ۵۲۶، ۲۸۴ و ۱۸۳ که به ترتیب مربوط به ژن‌های *fliC*، *invA*، *fljB*، *rfbJ* در کلیه نمونه‌های واجد تیفی موریوم مشاهده شد (۳۴).

سالمونلاها به مدت طولانی در محیط خارج از بدن زنده می‌مانند ولی حاملین آن‌ها منبع مهمی در این رابطه می‌باشند و در انتشار آن در محیط دامداری نقش زیادی دارند. بنابراین شناسایی این حاملین در بروز بیماری‌ها نقش بسزایی در کنترل و پیشگیری از وقوع موارد جدید داشته و در نتیجه یکی از عوامل مهم در جلوگیری از ضررهای اقتصادی این بیماری است (۱۳،۱۵،۱۷،۳۱).

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده برای شناسایی سالمونلا دابلین (۲۷).

پرایمر	توالی (۵' - ۳')	دمای اتصال	ژن	طول باند
DMP1F DMP1R	ATCGGTGCTGGGTAATTTTG AGGAACGAGAGAAACTGCTT		1126 <i>SeD A</i>	۱۰۵ bp
DMP2F DMP2R	ACGCGAAATCTGATGGTCTT GCCACCAGTTGTGAAAGGC	۶۰ درجه سانتی‌گراد	1104 <i>SeD A</i>	۲۰۳ bp
DMP3F DMP3R	ATCACCTCGCAAATTGTC TCGGGCAATCAGGTCGCCGA		227 <i>SeD A</i>	۲۹۶ bp

جدول ۲. پرایمرهای مورد استفاده برای شناسایی سالمونلا اینتریتیدیس (۳۳).

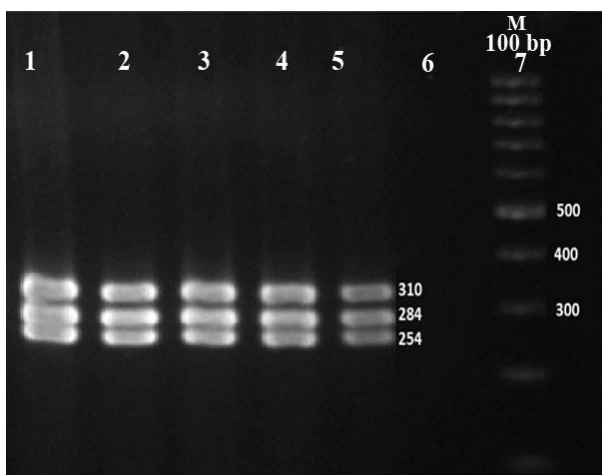
پرایمر	توالی (۵' - ۳')	دمای اتصال	ژن	طول باند
ST11 ST14	GCCAACCATTGCTAAATTGGCGCA GGTAGAAATCCCAGCGGGTAACTGG		<i>invA</i>	۴۲۹ bp
S1 S4	GCCGTACACGAGCTTATAGA ACCTACAGGGGCACAATAAC	۵۶ درجه سانتی‌گراد	<i>spv</i>	۲۵۰ bp
SEFA2 SEFA4	GCAGCGGTTACTATTGCAGC TGTGACAGGGACATTTAGCG		<i>sefA</i>	۳۱۰ bp

جدول ۳. پرایمرهای مورد استفاده برای شناسایی سالمونلا اینفنتیس (۳۲).

پرایمر	توالی (۵' - ۳')	دمای اتصال	ژن	طول باند
558F 1275R	TTGCTTCAGCAGATGCTAAG CCACCTGCGCCAACGCT	۵۶ درجه سانتی‌گراد	<i>ftjB</i>	۴۱۳ bp
Hut-F Hut-R	ATGTTGTCCTGCCCTGGTAAGAGA ACTGGCGTTATCCCTTCTCTGCTG		<i>hut</i>	۴۹۵ bp

نتایج

آزمایشات بیوشیمیایی و سروتایپینگ: پرگنه‌های لاکتوز منفی در محیط مک کانکی مربوط به تمامی ۴۱ جدایه، مورد آزمایش‌ها بیوشیمیایی قرار گرفتند که در محیط TSI به صورت *ALK/A* و *H2S* مثبت مشاهده شده و از نظر هیدرولیز اوره منفی بودند. آزمون اندول و وژس پروسکوئر جدایه‌ها منفی و آزمایش‌های متیل رد و مصرف سیترات آن‌ها مثبت بود. همچنین تمامی جدایه‌ها از نظر حرکت مثبت بودند. در آزمایش‌های مربوط به تعیین گروه سرمی، ۳۷ جدایه در گروه *D* و ۴ جدایه نیز در گروه *C* جدول کافمن - وایت قرار گرفتند (۲۳/۹۰ درصد). در تعیین سرووار تازکی مربوط به گروه *D*، ۳۲ جدایه (۱،۹،۱۲،g.m) سالمونلا اینتریتیدیس (۷۸/۰۴ درصد) و ۵ جدایه هم (۱،۹،۱۲،g.p) سالمونلا دابلین تشخیص داده شد (۱۲/۱۹ درصد). چهار جدایه مربوط به گروه *C* (۶،۷،۱۰،۱۵) نیز سالمونلا اینفنتیس شناسایی گردید (۹/۷۷ درصد) (نمودار ۱).



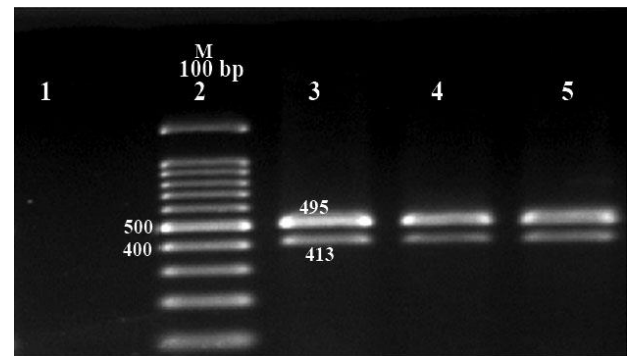
تصویر ۱. ژل الکتروفورز سالمونلا اینتریتیدیس: چاهک ۱: مارکر 100bp، چاهک ۲: کنترل منفی، چاهک ۳ تا ۶: مربوط به ژن *InvA* با وزن ۲۸۴، ژن *sefA* با وزن ۳۱۰ و ژن *spv* با وزن ۲۵۴، چاهک ۷: کنترل مثبت.

سالمونلا اینتریتیدیس، سالمونلا اینفنتیس و سالمونلا دابلین انجام شده بود در تصاویر ۱، ۲ و ۳ نشان داده شده است. باندهای مشاهده شده مربوط به تمامی ژن‌ها با کنترل مثبت مورد استفاده همخوانی داشته و در کنترل منفی باندهای مشاهده نشد.

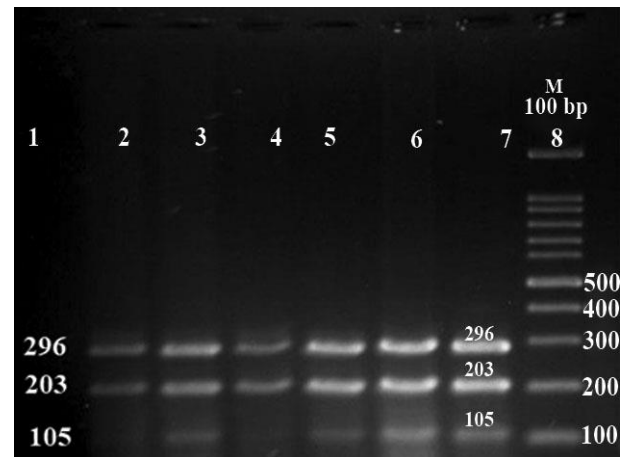
بحث

تشخیص آزمایشگاهی سالمونلا به طور معمول با محیط‌های غنی کننده انتخابی یا غیر انتخابی و متعاقب آن کشت روی محیط‌های انتخابی صورت می‌گیرد که حداقل ۴ تا ۵ روز زمان بر است و امکان بروز پاسخ منفی کاذب هم وجود دارد درحالی که می‌توان از روش PCR برای شناسایی سریع‌تر سالمونلا استفاده نمود (۵،۷،۸)

Rhan و همکاران در سال ۱۹۹۲ تکثیر ژن *invA* را به‌عنوان روش اختصاصی برای تعیین جنس سالمونلا استفاده نمود. در این مطالعه اشاره شده است که تمامی سالمونلاها حاوی ژن *invA* هستند و از این ژن در شناسایی جنس سالمونلا می‌توان استفاده کرد (۲۴). در مطالعه حاضر نیز از تکثیر ژن *invA* برای تعیین جنس سالمونلا استفاده شد که تمامی جدایه‌ها، این ژن را دارا بودند. Clouthier و همکاران در سال ۱۹۹۲ گزارش نمودند اپرون *sef* در سالمونلا اینتریتیدیس بیش از سایر فیمبریه‌ها مورد مطالعه قرار گرفته است (۸). اپرون *sef* در سالمونلا اینتریتیدیس دارای سه ژن *sefA*، *sefB*، *sefC* می‌باشد که عهده‌دار بیوسنتز فیمبریه SEF14 می‌باشند که در بین آن‌ها ژن *sefA* جز اصلی فیمبریه SEF14 (فیمبرین) را رمزدهی می‌نماید. البته ژن‌های *sefD* و *sefE* نیز بعداً در اپرون *sef* شناسایی گردیدند (۶). ژن *sef* فقط در سالمونلاهای گروه D حضور دارد (۵،۷). Choen و همکاران در سال ۱۹۹۶ موفق شدند بوسیله PCR و با استفاده از ژن *fimA* جدایه‌های متعلق به جنس سالمونلا را از جدایه‌های متعلق به غیر این جنس سالمونلا تفریق نماید (۵). اما ژن *fimA* برای تفریق سروتیپ‌های گوناگون سالمونلا از همدیگر قابل استفاده نبود (۵). در تحقیقی که Woodward و همکاران در سال ۱۹۹۶ بر روی شناسایی میکروبیوم‌های مواد غذایی بسته‌بندی شده با استفاده از روش Multiplex-PCR انجام دادند، سالمونلا اینتریتیدیس شناسایی شد. در گزارشاتمی که از مطالعات قبلی بدست آمده از پرایمرهای S1-S4 برای شناسایی ژن حدت SPV استفاده شده ولی این ژن در همه نمونه‌های جدا شده یافت نشده است (۳۲). در تحقیقات Woodward در سال ۱۹۹۶ این ژن فقط ۳۰ درصد

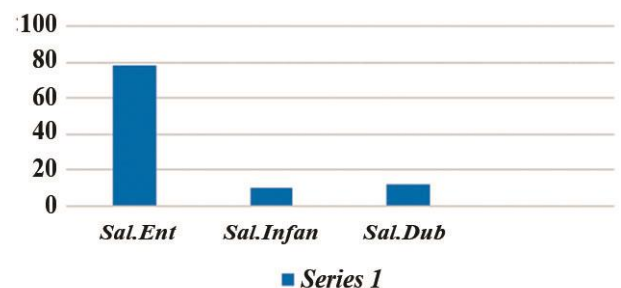


تصویر ۲. ژل الکتروفورز سالمونلا اینفنتیس: چاهک ۱: کنترل منفی، چاهک ۲: مارکر ۱۰۰ bp، چاهک ۳ و ۴: مربوط به ژن *fljB* با وزن ۴۱۳ و ژن *hut* با وزن ۴۹۵، چاهک ۵: کنترل مثبت.



تصویر ۳. ژل الکتروفورز سالمونلا دابلین: چاهک ۱: مارکر ۱۰۰ bp، چاهک ۲: کنترل مثبت، چاهک ۳ تا ۷: مربوط به ژن‌های *SeD_A1126* و *SeD_A1104* و چاهک ۸: کنترل منفی.

سروراهای جدا شده بر حسب درصد



نمودار ۱. آمار مربوط به سروراهای جدا شده: سالمونلا اینتریتیدیس (۷۸/۰۴ درصد) سالمونلا دابلین (۱۲/۱۹ درصد) و سالمونلا اینفنتیس (۹/۷۷ درصد) می‌باشد.

نتایج آزمون PCR: نتایج مربوط به این آزمون که به روش مولتی پلکس PCR و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی مربوط به

Zahraei و همکاران در سال ۲۰۰۷ در رابطه با شناسایی باکتری سالمونلا و سرووارهای آن‌ها از ۴۰۰ نمونه اسهال گاو با استفاده از آزمون Multiplex PCR و استفاده از چهار جفت پرایمر بنام پرایمرهای S₁₄₁ و S₁₃₉ برای ژن *invA* که تعیین کننده سالمونلا بودن است و پرایمرهای *RrfbJ*، *FliC* و *FljB* که به ترتیب ژن هدف آن‌ها *FliC*، *rffB* و *FljB* استفاده نمودند (۳۳). نتیجه آن ۳۳ مورد (۸/۲۵ درصد) از ۴۰۰ نمونه آلوده به سالمونلا بودند، از این ۳۳ مورد ۲۲ مورد سالمونلا انتریکا سروتپ تیفی موریوم (۶۶ درصد) و ۳ مورد مربوط به سروتپ دابلین بودند (۳۳). در این تحقیق از تکثیر ژن‌های *SeD_A1104*، *SeD_A1226* و *SeD_A2276* برای شناسایی سالمونلا دابلین استفاده گردید که پنج نمونه (۱۲/۱۹ درصد) سالمونلا دابلین شناخته شدند. ولی در مطالعه حاضر چه در آزمایش‌های سرمی و چه در روش PCR سالمونلا تیفی موریوم شناسایی نشد.

Amini و همکاران در سال ۲۰۱۰ از آزمون Multiplex PCR برای جداسازی سالمونلا انتریتیدیس و شناسایی حضور ژن‌های *spv* و *invA* در ۱۰۰۱ نمونه از پرندگان که از کشتارگاه‌های طیور استان کرمان ارسال شده بودند استفاده نمودند و در آن مطالعه از آزمایش‌ها بیوشیمیایی و سرولوژیکی برای شناسایی سالمونلا استفاده شد و میزان ۶۸ نمونه (۶/۷۹ درصد) سالمونلا بود نشان مورد تأیید قرار گرفت (۳). در این تحقیق از تکثیر ژن‌های *invA*، *spv* و *sefA* برای شناسایی سالمونلا انتریتیدیس استفاده شد که حدود ۳۲ نمونه (۷۸/۰۴ درصد) سالمونلا انتریتیدیس شناخته شدند.

در مطالعه‌ای تحت عنوان شیوع سالمونلا تیفی موریوم در شیرهای خام گاو، گوسفند و بز عرضه شده در استان چهارمحال و بختیاری که توسط Tadjbakhsh و همکاران در سال ۲۰۱۳ انجام گرفت پس انجام آزمون بر پایه کشت از مجموع ۵۵۰ نمونه مورد بررسی، ۲۰ نمونه سالمونلا شناخته شدند که از این تعداد نمونه‌های آلوده شامل ۱۴ نمونه (۲/۵۴ درصد) شیر گاو، ۲ نمونه (۰/۳۶ درصد) شیر گوسفند و ۴ نمونه (۰/۷۲ درصد) شیر بز بودند. از ۲۰ جدایه سالمونلا به روش کشت ۹ جدایه (۱/۳۶ درصد) در PCR به‌عنوان سالمونلا تیفی موریوم مورد تأیید قرار گرفتند (۲۸). Peyghambari و همکاران در سال ۲۰۱۴ در مطالعه‌ای تحت عنوان جستجوی سالمونلا انتریکا سرووار اینفنتیس با PCR در بین جدایه‌های گروه C سالمونلا طیور، پس از آزمایش آگلوتیناسیون روی لام برای تعیین گروه سرمی، کلیه ۱۰۰ جدایه سالمونلا در گروه C طبقه‌بندی شدند. سپس با استفاده از پرایمر

از سالمونلا انتریتیدیس‌های جدا شده از پرندگان یافت شد (۳۲) و حضور این ژن در مقایسه با سالمونلا انتریتیدیس‌های جدا شده در مطالعات Pan در سال ۲۰۰۲ به میزان بیشتری افزایش پیدا کرده است (۲۲). Jonathan و Chu در سال ۱۹۹۶ با استفاده از روش غنی سازی مدفوع روی ژن‌های *invA* و *spv* سالمونلا با روش PCR تحقیقاتی را انجام دادند و به این نتیجه رسیدند که محیط‌های غنی کننده به طور فزاینده‌ای باعث افزایش باکتری‌های مورد نظر شده و استخراج DNA راحت‌تر و بهتر صورت می‌گیرد (۷). همچنین Khan در سال ۱۹۹۹ نشان داد که ژن *invA* یک ژن ضروری برای ورود و تهاجم باکتری به قسمت‌های عمیق تر بافت است (۱۵). Pan در سال ۲۰۰۲ نشان داد برای شناسایی سالمونلا انتریتیدیس می‌توان از پرایمرهای SEFA که مربوط به تاژک آن‌هاست استفاده کرد (۲۲). در مطالعه حاضر ژن *sefA* و *spv* در همه جدایه‌های اینتریتیدیس مشاهده شد.

Itoh و همکاران در سال ۱۹۹۷ با پرایمرهای *rffB* و *fliC* که به ترتیب برای تکثیر ژن‌های *rffB* و *fliC* سالمونلا دابلین هستند استفاده نمودند (۱۳). Mirmoeini و همکاران نیز در سال ۲۰۰۸ با تکثیر ژن *Sope* و مشاهده باند آن در ۳۹۹bp حضور سالمونلا دابلین را تأیید کردند (۱۷). در این مطالعه نیز از تکثیر ژن‌های *SeD_A1104*، *SeD_A1226* و *SeD_A2276* برای شناسایی سالمونلا دابلین استفاده گردید که پنج نمونه (۱۲/۱۹ درصد) سالمونلا دابلین شناخته شدند.

با توجه به بیماری‌زایی سالمونلاها در انسان و دام و خسارات اقتصادی فراوان این باکتری، شناسایی سریع و قطعی آن در مراحل اولیه بسیار حائز اهمیت می‌باشد. برای این مورد مطالعات فراوانی صورت گرفته است (۲۴، ۲۸). Amavisit و همکاران در سال ۲۰۰۰ با استفاده از غنی‌سازی مدفوع اسب‌های مشکوک به سالمونلوز با استفاده از روش PCR به نتایج جالبی دست یافتند. پرایمرهای مورد نظر آن‌ها در این تحقیق S18 و S19 بود. با استفاده از این پرایمرها ژن مورد نظر یعنی *ompC* را تکثیر نمودند (۲). همچنین Oliveira در سال ۲۰۰۳ با آزمون PCR و با استفاده از پرایمر *invA* که مختص شناسایی جنس سالمونلا هستند توانست از نمونه‌هایی که بصورت منفی کاذب که بصورت متداول رخ می‌دهند بکاهد امروزه از ژن *invA* که یک استاندارد جهانی برای شناسایی جنس سالمونلا است به‌صورت متداول استفاده می‌شود (۲۱).

شده است مشخص شد که این گاوداری‌ها مدتی است که از پودر گوشت طیور استفاده می‌کنند و به نظر می‌رسد برای تهیه پودر گوشت، از درجه حرارت پایین‌تر از حد استاندارد در کارخانه‌های تولید کننده استفاده می‌گردد و همین دلیل موجب شده است که این سالمونلاها در پودر تهیه شده زنده بمانند و به گاوها منتقل شود.

سپاسگزاری

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند تا مراتب قدردانی خود را از زحمات دکتر علیرضا شقایق، دکتر ایرج اشرفی تمامی و سرکار خانم دکتر رامک یحیی رعیت به عمل آورند.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

اختصاصی، ۱۰۰ جدایه سالمونلای گروه C مورد آزمایش PCR قرار گرفتند که از مجموع آن‌ها ۷۹ جدایه باند اختصاصی ۴۱۳bp را برای سالمونلا/اینفنتیس نشان دادند (۲۳). در این تحقیق پس از تکثیر ژن‌های *hut* و *fljB* چهار نمونه (۹/۷۷ درصد) سالمونلا/اینفنتیس شناخته شدند (۲۲). Ghodusi و همکاران نیز در سال ۲۰۱۴ با بررسی ۴۶ نمونه اخذ شده از ماکیان شمال ایران و پس از سروگروپینگ و انجام آزمون PCR و با استفاده از پرایمرهای ۱۲۷۵r و ۵۵۸f، نشان دادند که ۴۴ نمونه مربوط به سالمونلا/اینفنتیس می‌باشند. در این مطالعه نیز ۴ جدایه سالمونلا/اینفنتیس تشخیص داده شدند (۹).

نتیجه‌گیری نهایی: با بررسی اپیدمیولوژیکی که انجام گرفت برای مشخص نمودن علت اینکه چرا سروارهای سالمونلا انتریتیدیس و سالمونلا/اینفنتیس که در تحقیقات مختلف بیشتر از طیور جدا شده است، از گاوداری‌های استان تهران و البرز جدا

References

1. Agron, G.P., Walker, R.L., Kind, H., Sawyer, S.J., Hayes, D.C., Wollard, J., Anderson, G.L. (2001). Identification by subtractive hybridization of sequence specific for *Salmonella serovar enteritidis*. Appl Environ Microbiol, 67(11), 4984–4991. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.11.4984-4991>
2. Amavisit, P., Browning, G.F., Lightfoot, D., Church, S., Anderson, G.A., Whithear, K.G., Markham, P.F. (2001). Rapid PCR detection of *Salmonella* in horse fecal samples. Vet Microbiol, 79, 63-74. [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(00\)00340-0](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(00)00340-0) PMID: 11230929
3. Amini, K., Zahraei Salehi, T., Nikbakht, G., Ranjbar, R., Amini, J., Ashrafganjooei, S.H. (2010). Molecular detection of *invA* and *spv* virulence genes in *Salmonella enteritidis* isolated from human and animals in iran. African J Microbiol Res, 4(21), 2202-2210.
4. Chloe, K.B., Mortimer., Tansy, M.P., Saheer, E.G, Julie, M.J.L., Catherine, A. (2004). Towards the development of a DNA-sequence based approach to serotyping of *Salmonella enterica*. J BMC Microbiology, 4(31), 1-10.
5. Choen, 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. PMID: 8953701
6. Chollighan, R.J., Woodward, M.J. (2001). The SEF14 fimbrial antigen of *Salmonella enteritidis* is encoded within a pathogenicity islet. Vet Microbiol, 80, 235-245. [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(01\)00309-1](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(01)00309-1) PMID: 11337139
7. Chu, C.H., Jonathan, T.O. (1996). Rapid identification of *Salmonella* serovars in feces by specific detection of virulence gene, *invA* and *spv* enrichment broth culture – multiplex PCR combination assay, J Clin Microbiol, 34, 2619-2622. PMID: 8880536
8. Clouthier, S.C., Muller, K.H., Doran, J.L., Collinson, S.K., Kay, W.W. (1993). Characterization of three fimbrial genes, *sefABC*, of *Salmonella enteritidis*. J Bacteriol, 175(9), 2523-33. <https://doi.org/10.1128/jb.175.9.2523-2533.1993>
9. Ghoddusi, A., Nayeri Fasaei, B., Karimi, V., Ashrafi, T.I. (2014). Molecular identification of *Salmonella infantis* isolated from backyard chickens and detection of their resistance genes by PCR. Iran J Vet Res, 16 (3), 293-7. PMID: 27175192
10. Gyles, C.L., Prescott, J.f., Songer, F.J., Thoen, C.O. (2010). Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals, (4th ed.) Wiley- Blackwell. Hoboken, Newjersey, USA.
11. Holmes, D.S., Quigley, M.A. (1993). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. Anal Biochem, 114(1), 193-7. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(81\)90473-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(81)90473-5) PMID: 6269464
12. Issenhuth-Jeanjean, S.I., Roggentin, P., Mikoleit, M., Guibourdenche, M., De Pinna, E., Nair, S., Fields, P.I., Weill, F.X. (2014). Supplement to the White-Kauffmann-Le Minor scheme, Res Microbiol, 165(7), 526-30. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2014.07.004>
13. Itoh, Y., Hirose, K., Miyake, M., Khan, A.Q., Hashimoto, Y., Ezaki, T. (1997). Amplification of *rfbE* and *fliC* genes by polymerase chain reaction for identification and detection of *Salmonella serovar enteritidis, dublin* and *gallinarum-pullorum*. Microbiol Immunol, 41(10), 791-4. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1997.tb01928.x> PMID: 9403503
14. Karimi, D.H., Esmaili Pour, F., Ebrahimi Mohamadi, K. (2013). Study of prevalence of fresh meat beef supply in the city of Sanandaj's *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium*. Lett in Applied Microbiol, 37(6), 463-469.
15. Khan, A.A., Nawaz, M.S., Khan, S., Serigelia, C.E. (1999). Detection of multidrug resistance *Salmonella typhimurium* DT104 by multiplex chain reaction. FEEMS Microbiol Lett, 182,355-360. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb08921.x> PMID: 10620692

16. McVey, D.S., Kennedy, M., Chengappa, M.M. (2013). Vet Microbiol, (3rd ed.) Wiley- Blackwell. Hoboken, Newjersey, USA.
17. Mirmomeini, M.H., Kiani, S., Sisakhtezhad, S. (2008). Rapid detection of *Salmonella dublin* by PCR Amplification of the *SopE* Gene and its Cloning. Pak J Microbiol Sci, 11(11),1497-501. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2008.1497.1501> PMID: [18817254](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18817254/)
18. Mirzaie, S., Hassanzadeh, M., Ashrafi, I. (2010). Identification and characterization of *Salmonella* isolates from captured house sparrows. Turkish J Vet and Animal Sci, 34(2), 181- 186.
19. Nadalian, M.G.H., Motahedin, A., Zahraei Salehi, M.T., Khajeh Nasiri, S.H.A.M., Lotfalizadeh, S. (2008). A study on the clinical features of salmonellosis and prevalence of *Salmonella* serogroups in calves. J Vet Res, 63(4), 241-246.
20. Nayebe, N., Ghoreyshi, S.A., Harzandi, N., Shams Ara, M., Tabardei Bakhtiari, A. (2011). PCR methods for detection of *Salmonella* infection in poultry products in the city of Karaj. Med Sci, 21(1), 32-37
21. Oliveira, S.D., Rodenbusch, C.R., Cé, M.C., Rocha, S.L., Canal, C.W. (2003). Evaluation of selective and non-selective enrichment PCR procedure for *Salmonella* detection. Lett Microbiol, 36, 217-221. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2003.01294.x> PMID: [12641714](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12641714/)
22. Pan, T.M., liu, Y.J. (2002). Identification of *Salmonella enteritidis* isolate by polymerase chain reaction and multiplex polymerase chain reaction. J Microbiol Immunol Infect, 35(3), 147-51. PMID: [12380786](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12380786/)
23. Peighambari, S.M., Sorahi Nobar, M., Morshed, R. (2014). Detection of *Salmonella enterica* serovar infantis among serogroup C *Salmonella* isolates from poultry using PCR and determination of drug resistance patterns. Scientific-Research Iranian Veterinary Journal, 11(2), 54-61
24. Radostits, O.M., Gay, C., Hinchcliff, K.W., Constable, P.D. (2007). Veterinary Medicine A Textbook of the Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs and Goats. (10th ed.) Saunders Ltd. london, UK.
25. Rhan, K.D., Grandis, S.A., Clarke, R.C., Curtiss, R. Gyles, C.L. (1992). Amplification of *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. Mol Cell Probes, 6(4), 271-9. [http://doi.org/10.1016/0890-8508\(92\)90002-f](http://doi.org/10.1016/0890-8508(92)90002-f)
26. Scholz, H.C., Arnold, T., Marg, H., Rösler, U., Hensel, A. (2001). Improvement of an *invA*-based PCR for specific detection of *Salmonella typhimurium* in organs of pigs. Berl Munch Tierarztl Wochenschr, 114(9-10), 401-3. PMID: [11570189](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11570189/)
27. Tadjbakhsh, F., Rahimi, E., Tadjbakhsh, E. (2013). Prevalence of *Salmonella typhimurium* in raw milk of cows, sheep and goats supplied in Chaharmahal and bakhtiari province. J Food Protection, 60, 1341-1346
28. Tadjbakhsh, H., Atashparvar, N., Zahraei Salehi, T., Nadalain, M. (2005). Application of combination, immunomagnetic separation plus multiplex PCR for the detection and identification of *Salmonella enterica* subspecies enterica serovar *Typhimurium bovine* diarrhoeic fecal samples. J Vet Res, 63(1), 41-46
29. Thrans, C.J., Sojka, M.G., Chasey, D. (1990). Detection of novel fimbrial structure on surface of *Salmonella enteritidis* by using a monoclonal antibody. J Clin Microbiol, 28(11), 2409-14. PMID: [1701443](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1701443/)
30. Turcotte, C., Woodward, M.J. (1993). Cloning, DNA sequencing and distribution of the gene encoding the SEF14 fimbrial antigen of *Salmonella enteritidis*. J Gen Microbiol, 139(7), 1477-85. <https://doi.org/10.1099/00221287-139-7-1477> PMID: [8371111](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8371111/)
31. Waltman, W.D., Gast, R.K., Mallinson, E.T. (1998). Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens. Swayane, D.E., Glisson, J.R., Jackwood, M.M., Person, J.E., Reed, W.M. (eds.). American Association of Avian Pathogenesis. Pennsylvania, USA. p. 4-13.
32. Woodward, M.J, Kirwan, S.E. (1996). Detection of *Salmonella enteritidis* in eggs by polymerase chain reaction. Vet Rec, 138(17), 411-3. <http://doi.org/10.1136/vr.138.17.411> PMID: [8733179](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8733179/)
33. Yang, L., Lou, Y.k., S.U, C.H., Zhang, H., Guan, M., XU., Jan, WEI. R., Chen, J.M., Peng, D.X. (2014). Development of Multiplex PCR for Rapid Identification of *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella gullinarum*. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 45(2), 268-273. <http://doi.org/10.11843/j.issn.0366-6964.2014.02.015>
34. Zahraeisalehi, T., Tadjbakhsh, H., Atashparvar, N., Nadalian, M.G., Mahzounieh, M.R. (2007). Detection and identification of *Salomonella typhimurium* in bovine diarrhoeic fecal samples by immunomagnetic separation and multiplex PCR assay. Zoonoses and Public Health, 54(6-7), 231-6. <http://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2007.01061>



Identification of Salmonella Isolated from Dairy Farms in Tehran and Alborz Provinces by Classical and Molecular Methods

Hadi Ghafari¹, Taghi Zahraei Salehi², Farhad Moosakhani³

¹ Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Karaj Branch, Karaj, Iran

² Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

³ Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Karaj Branch, Karaj, Iran

doi [10.22059/jvr.2020.232882.2626](https://doi.org/10.22059/jvr.2020.232882.2626)

Received: 13 April 2020, Accepted: 16 June 2020

Abstract

BACKGROUND: Salmonella are endemic on most large intensive dairy farms and salmonellosis is a common cause of neonatal morbidity and mortality. Disease and mortality usually reflect a variety of management events and environmental stressors that contribute to compromised host immunity and increased pathogen exposure.

OBJECTIVES: In this study, PCR method was used to identify *Salmonella Enteritidis*, *Infantis*, *Dublin* and serovars isolated from diarrhea samples and aborted fetuses of Tehran and Alborz provinces dairy Farms. Further observation showed that the isolation of *S. Enteritidis* and *S. Infantis* is closely related to the consumption of contaminated poultry meat powder in diet of cows.

METHODS: Forty-one Salmonella were isolated from diarrhea and aborted fetus samples in Tehran and Alborz provinces Farms and were confirmed by biochemical assays, then the isolates were identified by serological methods by polyvalent and monovalent *Salmonella antisera*. DNA of samples was extracted by Boiling method and was tested by PCR. *Salmonella* serovars were identified according to the presence of specific genes for *Salmonella Enteritidis*, *Infantis* and *Dublin*.

RESULTS: All samples were tested by PCR were positive. 32 samples were identified as *Salmonella Enteritidis* (78/04 %), 4 samples were identified as *Salmonella Infantis* (9/77 %) and 5 samples were identified as *Salmonella Dublin* (12/19 %).

CONCLUSIONS: According to the results, it seems that PCR can be used as a alternative method to the expensive and time consuming biochemical and serological methods for identifying *Salmonella* serovars. As *Salmonella Enteritidis* was usually isolated from poultry, isolation from cows may be due to has been used chicken meat powder in diet of the dairy farms.

Keywords: Salmonella, Calf, PCR, Serotyping, Meat powder

Copyright © 2020. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution- 4.0 International License which permits Share, copy and redistribution of the material in any medium or format or adapt, remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially.

Corresponding author's email: fmoosakhani@kiaau.ac.ir Tel/Fax: 026-33517422-23

How to cite this article:

Ghafari, H., Zahraei Salehi, T., Moosakhani, F. (2021). Identification of Salmonella Isolated from Dairy Farms in Tehran and Alborz Provinces by Classical and Molecular Methods. J Vet Res, 75(4), 529-536. <https://doi.org/10.22059/jvr.2020.232882.2626>

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Target genomic regions and primer sequences of the multiplex PCR.

Table 2. Target genomic regions and primer sequences of the multiplex PCR.

Table 3. Target genomic regions and primer sequences of the multiplex PCR.

Table 4. Target genomic regions and primer sequences of the multiplex PCR.

Figure 1. Electrophoresis gel documentation for *S. Enteritidis*.

Figure 2. Electrophoresis gel documentation for *S. Infantis*.

Figure 3. Electrophoresis gel documentation for *S. Dublin*.

Diagram 1. Measure of isolated serovar.