تشخیص مولکولی سروتیپ سالمونلا تایفی موریوم در گوشت مرغ عرضه شده به بازار مصرف شهرستان اصفهان

فروغ تاج بخش[1]* ، الهه تاج بخش [2] ، فهام خامسی پور [3]

۱- استاد یار ، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، شهرکرد
۲- استادیار گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد
۳- دکترای دام پزشکی ، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان

***نشانی برای مکاتبه:** شهر کرد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، تلفن ۰۹۳۷۵۲۳۲۴۲۶، نمابر ۰۲۱۷۷۱۱۲۸۴۰،
foroghtajbakhsh@gmail.com

دریافت مقاله: خرداد نود و سه پذیرش برای چاپ:مرداد نود و سه

چکیده

سابقه و هدف :مصرف مواد غذایی گوشتی آلوده به سالمونلا، به ویژه *سالمونلا تایفی موریوم و سالمونلا انتریتیدیس*، به عنوان اصلی ترین منبع بیماری های منتقله از غذا می باشد. هدف از این مطالعه تعیین فراوانی سروتیپ *سالمونلا تایفی موریوم* در گوشت مرغ عرضه شده به بازار مصرف شهرستان اصفهان در سال ۱۳۹۲ بود.

روش کار: از فروردین تا شهریورماه ۱۳۹۲ تعداد ۲۰۰ نمونه گوشت مرغ، از فروشگاه های عرضه گوشت شهرستان اصفهان جمع آوری شد و از نظر حضور *سالمونلا تیفی موریوم* به دو روش کشت و PCR بررسی گردید.

یافته ها : از مجموع ۲۰۰ نمونه گوشت مرغ بر پایه روش کشت و آزمون های بیوشیمیایی ۲۸ نمونه (۱۴٪) *سالمونلا* تشخیص داده شدند. از ۲۸ جدایه ۱۴ نمونه (۵۰٪) بر پایه آزمون های مولکولی سروتیپ *تایفی موریوم* تشخیص و تائید شد.

نتیجه گیری : آلودگی این ماده غذایی به باکتری های بیماری زایی هم چون *سالمونلا* به معنی شیوع مسمومیت های غذایی آشکار و پنهان در میان افراد جامعه می باشد. این امر منجر به یک خطر بهداشتی و ضررهای جبران ناپذیر دیگری می گردد، لذا شناسایی سروتیپ های شایع این باکتری از اهمیت زیادی برخوردار است.

واژگان کلیدی : *سالمونلا، سالمونلا تایفی موریوم* ، گوشت مرغ ، PCR

مقدمه

باکتری های خانواده انتروباکتریاسه یکی از شناخته شده ترین گروه در باکتری های بیماری‌زا می باشند. سالمونلاها که یکی از مهم ترین اعضای این گروه هستند، بر خلاف اعضای دیگر این گروه انگل اختیاری درون سلولی بوه و همه آن‌ها بالقوه بیماری‌زا هستند. این باکتری‌ها به سادگی به روش‌های مستقیم یا غیر مستقیم از حیوان به حیوان، حیوان به انسان و انسان به انسان منتقل می‌شوند. بنابراین پیش گیری و کنترل سالمونلوز در انسان تا حد زیادی وابسته به پیش گیری و کنترل آن در حیوانات می-باشد. در انسان غالباً گوشت به ویژه گوشت طیور به عنوان منشأ عفونت شناخته می‌شود(۳-۱).

سالمونلوز یکی از مهم ترین بیماری‌های منتقله ناشی از مواد غذایی در سراسر جهان است. گونه سالمونلا برای سلامت عمومی خطر آفرین است و عفونت‌های ایجاد شده به وسیله این باکتری برای سیستم بهداشت و درمان و صنعت دام و طیور زیان اقتصادی را به هم راه دارد(۴). این باکتری با بیش از ۲۵۰۰ سروتیپ، جزء دومین موارد از بیماری‌های ناشی از مصرف مواد غذایی آلوده در آمریکا می‌باشد(۵). از بین سروتیپ های مختلف سالمونلا، سروتیپ های اینتریتیدیس و تیفی موریوم در مقام اول عفونت یا مسمومیت غذایی قرار دارند. این سروتیپ ها دارای شیوع گسترده ای در آسیا، کره، ژاپن، تایلند و ....می‌باشند(۵، ۶). اولین گزارش مربوط به شیوع مسمومیت غذایی ناشی از سالمونلا، توسط Gartner در سال ۱۸۸۸ در آلمان بود. در مطالعات متعدد، شیوع آن از ۲/۷۴٪ در آمریکا تا ۸/۳٪ در ایران گزارش شده است. این باکتری تقریبا ۲۵ میلیون عفونت و حدود ۲۰۰۰۰۰ مرگ را در سطح جهان ایجاد می‌نماید(۷،۸).

سالمونلاها دسته بزرگی از باسیل‌های گرم منفی اند که اندازه آن‌ها به طول ۱ تا ۳ و عرض ۰/۵ تا ۰/۸ میکرون می باشد. به جز دو سروتیپ سالمونلا گالیناروم و سالمونلا پولوروم مابقی دارای آنتی ژن H مربوط به تاژک بوده و توانایی حرکت را دارند. سالمونلاها مقاومت بالایی به عوامل شیمیایی نظیر غلظت زیاد صفرا و هم چنین عوامل فیزیکی نظیر حرارت و مواد ضدعفونی کننده دارند. باکتری سالمونلا سخت رشد نبوده و از محیط، نمونه کلینیکی، و مواد غذایی بعد از مرحله غنی سازی جدا می‌شود(۹). در این میان سالمونلا تیفی موریوم گونه ای است که باعث بروز سالمونلوز غیر

حصبه ای یعنی همان مسمومیت غذایی می‌شود(۱۰). به دلیل اهمیت فوق العاده گوشت مرغ از نظراقتصادی و تغذیه ای، مطالعات گسترده ای بر روی آلودگی های میکروبی و بیماری‌های منتقله از طریق گوشت در کشورهای مختلف انجام شده است. از آن جایی که تغذیه سالم از ارکان اصلی سلامتی و بهداشتی مردم محسوب می شود، امید است با بررسی فراوانی این باکتری در گوشت مرغ و انجام اقدامات لازم جهت شناسایی منابع آلودگی بتوان ابتلا به این عفونت را کنترل نمود.

روش کار

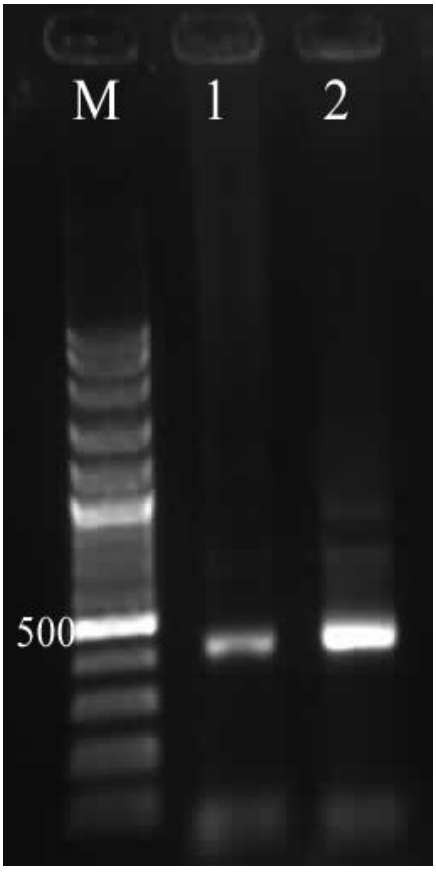
در این مطالعه توصیفی ۲۰۰ نمونه گوشت مرغ از فروشگا ه های شهرستان اصفهان تهیه و در شرایط استریل به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد منتقل گردید. سپس ۲۵ گرم از گوشت مرغ ریز شده در شرایط استریل را به ۲۲۵ سی سی محیط کشت لاکتوز براث اضافه کرده و کاملا هموژنیزه نموده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه نگهداری شد. سپس ۱ سی سی از این محیط را به ۹ سی سی محیط سلنیت سیستیئن (Selenite cystine broth,HiMedia) اضافه نموده و به مدت ۱۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه گرم‌خانه گذاری شد. یک لوپ از این محیط برروی محیط سالمونلا - شیگلا آگار کشت داده و به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه قرار داده شد. بعد از انجام تست های تشخیصی و افتراقی بر روی پرگنه های مشکوک و تأیید وجود این باکتری، نمونه‌های سالمونلا مثبت به منظور تشخیص مولکولی DNA آن ها استخراج گردید(۱۱، ۱۲). به منظور تشخیص سروتیپ *تایفی موریوم*، DNA نمونه های مشکوک جدا شده از روش کشت با استفاده از کیت استخراج DNA ساخت شرکت سیناژن طبق دستورالعمل کیت استخراج گردید. جهت تشخیص سروتیپ *سالمونلا تایفی موریوم* از پرایمرهای*ST11* و *ST15* استفاده گردید(۱۳). توالی های پرایمر مورد استفاده به شرح زیر می باشد.

*ST*11 F: 5’ GCCAACCATTGCTAAATTGGCGCA 3’
*ST*15 R: 5’ GGTAGAAATTCCCAGCGGGTACTGG 3’

واکنش PCR در حجم نهایی ۵۰ میکرو لیتر که شامل ۲ میکرولیتر از DNA استخراج شده، ۵ میکرولیتر PCR buffer 10x، ۱ میکرولیتر dNTP، ۲ میکرولیترMgcl2، ۲ میکرولیتر پرایمرهایF وR، ۰/۳میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase و آب مقطر)، با برنامه حرارتی ۹۴ درجه به مدت ۱ دقیقه،۳۵ سیکل تکراری ۹۴ درجه ۶۰ ثانیه، ۵۶ درجه ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه ۱ دقیقه و در نهایت ۷۲ درجه ۱۰ دقیقه انجام شد. مشاهده باند ۴۲۹ جفت بازی نشان دهنده مثبت بودن آزمون PCR می باشد(۱۳). جهت ردیابی محصول مورد نظر، ۲۰ میکرولیتر از محصول PCR روی ژل ۱/۵درصد آگارز واجد اتیدیوم برماید در ولتاژ ثابت ۸۰ ولت الکتروفورز و ژل حاصله با دستگاه تصویر بردار ژل (Uvitech U.K) قرائت گردید. مشاهده باند ۴۲۹ جفت بازی نشان دهنده وجود ژن *ST* می باشد.

یافته ها

در این تحقیق از ۲۰۰ نمونه گوشت مرغ بر پایه روش کشت و آزمون های بیوشیمیایی ۲۸ نمونه (۱۴٪) *سالمونلا* تشخیص داده شد. از ۲۸ جدایه ۱۴ نمونه (۵۰٪) بر پایه آزمون های مولکولی سروتیپ *تایفی موریوم* تشخیص و تائید شد(تصویر ۱).



تصویر ۱ : ژل حاصل از آزمون PCR در نمونه های مورد بررسی. ستون M : مارکر 100 bp ساخت شرکت فرمنتاز ، ستون های ۱، ۲ نمونه های مثبت دارای باند 429bp

بحث

سالمونلوزیس یکی از بیماری های عمده ناشی از مواد غذایی است که اخیرا منجر به نگرانی هایی در سطح بهداشت عمومی شده است. باکتری *سالمونلا* یکی از معمول ترین پاتوژن های منتقله از راه مواد غذایی است که در سرتاسر جهان در انسان و حیوان ایجاد بیماری می کند. محصولات گوشتی آلوده، منبع اصلی سالمونلا معرفی شده اند و به گزارش سازمان بهداشت جهانی، سالیانه بالغ بر ۱۶ تا ۳۳ میلیون مورد بیمار و ۵۰۰ تا ۶۰۰ هزار مرگ ناشی از سالمونلا اتفاق می افتد که این مسئله به عنوان یک معضل بزرگ بهداشتی در کشورهای در حال توسعه از جمله کشور ما مطرح می باشد. مهم ترین سروتیپ جدا شده از انسان *سالمونلا تیفی موریوم و انتریتیدیس* است، بنابراین، کنترل میکروبی مواد غذایی اهمیت خاصی دارد(۱۱). از سال ۱۹۷۰ آلودگی به *سالمونلا* در گوشت گاو در ایران مورد توجه محققان قرار گرفت. فراوانی آلودگی با *سالمونلا* در گوشت گاو حدود ۲/۶٪ بود. در آن سال مرکز کنترل بیماری ها باکتری *سالمونلا تیفی موریوم* را به عنوان یکی از عوامل بیماری های ناشی از مصرف مواد غذایی آلوده در گوشت گاو گزارش کرد(۱۴).

در تحقیق حاضر شیوع *سالمونلا* در نمونه های گوشت مرغ ۱۴٪ برآورد گردید که با بعضی از نتایج مشابه و با بعضی از نتایج متفاوت می باشد. در تحقیق انجام شده توسط نصرتی و هم کاران در ۲۰۱۲ به منظور بررسی شیوع سروتیپ های *سالمونلا تیفی موریوم، تیفی* و *اینتریتیدیس* در مواد غذایی در مرکز درمانی بیمارستان مفید آلودگی گوشت گاو به *سالمونلا* ۸/۸ درصد برآورد گردید. در این تحقیق از گوشت مرغ باکتری *سالمونلا* جدا نگردید(۱۱). در تحقیق انجام شده توسط ماهاراجان و هم کاران میزان شیوع سالمونلا در گوشت مرغ، ۱۴/۵٪ ، بوفالو ۱۳/۵٪، و بز ۳/۳٪ گزارش شد(۱۵).

گزارشات حاکی از متفاوت بودن میزان آلودگی به سااالمونلا در نمونه های مختلف گوشت می باشد به طوری که لو و استسونس در ویتنام و سنگال گزارش کردند که ۴۸/۹٪ از نمونه های گوشت مرغ و ۴۳٪ از نمونه های گوشت گاو به سالمونلا آلوده می باشند که نسبت به نتایج حاصل از تحقیق ما بیش تر می باشد. این مطلب بیان گر آن است که میزان فراوانی و جداسازی سالمونلا بر حسب نوع گوشت، منطقه جغرافیایی، متدولوژی به کار رفته بسیار متغیر می باشد(۱۶، ۱۷).

در تحقیق انجام شده توسط ناگوا و هم کاران در ۲۰۱۲ در یونان آلودگی به گونه های *سالمونلا* در جوجه های گوشتی ۱,۴٪، در گوشت مرغ فریز شده ۴٪ و در افرادی که مسمومیت غذایی داشتند ۱۰٪ گزارش گردید(۲). تفاوت در میزان آلودگی به *سالمونلا* در مطالعات انجام شده توسط محققین مختلف می تواند به علت تفاوت در روش نمونه گیری باشد(۱۸).

سالمونلا انتریکا سروار *تایفی موریوم و سالمونلا انتریکا* سروار *انتریتیدیس* از جمله سروارهای بسیار مهم منتقله از راه مواد غذایی می باشند که در زمینه جداسازی این سروارها تحقیقات متعددی صورت گرفته است. در بررسی انجام شده توسط جمشیدی و هم کاران در مشهد آلودگی به *سالمونلا تایفی موریوم* در لاشه های مرغ ۱/۶٪ گزارش گردید که با نتایج حاصل از تحقیق ما هم خوانی دارد(۸).

در پژوهش انجام شده توسط سلطان دلال و هم کاران در سال ۲۰۰۹، ۴۷,۸٪ از نمونه های مرغ و ۲۸,۸٪ از گوشت قرمز به *سالمونلا* آلوده بودند. در این بررسی سروتیپ غالب مربوط به *S.thompson* (۵۴,۹٪) و *S.enteritidis* (۹,۸٪) بوده است(۱۹).

در اسپانیا طی یک بررسی انجام شده مشاهده شد که انتشار سالمونلا در گوشت مرغ در طی کشتار و آماده سازی بیش تر است و سروتیپ های جدا شده بر حسب مناطق جغرافیایی متفاوت هستند. در اسپانیا بیش ترین سروتیپ های، ایزوله شده مربوط به *S.typhimurium*، *S.virchow*، *S.newport*، *S.haardt* می باشد(۲۰) در حالی که در بررسی انجام شده در نپال بیش تر ، *S.enteritidis*، *S.galinarom* ، *S.pulorom* و *S.heidelberg* جدا گردید(۱۵)

در بررسی دیگری در اتیوپی بر روی گوشت گاو ، گوسفند و شتر و نمونه های مدفوع کارکنان کشتارگاه نشان داده شد که *S.anatum* از تمام نمونه ها از جمله انسان جدا شد، درصورتی که *S.meleagridis*فقط از نمونه های مدفوع کارکنان کشتارگاه جدا شد، بنابراین این سروتیپ می تواند باعث آلودگی ثانویه در گوشت گردد(۲۱). گوشت و تخم پرندگان و فرآورده های آن ها همیشه به عنوان منابع اصلی سالمونلاها در مسمومیت‌های غذایی انسان مطرح بوده اند، لذا تشخیص این عوامل میکروبی در پیش گیری از گسترش آلودگی از اهمیت بسیار زیادی برخوردار می باشد.

REFERENCES

1.Carter GR, Wise DJ. Essentials in Veterinary Bacteriology and Mycology. 6th ed. Iowa State University Press; 2004. 290 pages.

2.D'Aoust SY. *Salmonella* and the international food trade. Int J Food Microbiol. 1994. 24 (1-2): 11-31.

3.De Freitas CG, Santana AP, Da Silva PH, Gonçalves VS, Barros Mde A,Torres FA, Murata LS, Perecmani S. PCR multiplex for detection of Salmonella Enteritidis, Typhi and Typhimurium and occurrence in poultry meat. Int J Food Microbiol. 2010; 139: 15-22.

4.Faramarzi T, Jonidi jafari A, Dehghani S, Mirzabeygi M, Naseh M, Rahbar Arasteh HA. Survey of Bacterial Contamination of Food Supply in the West of Tehran. Fasa Univ Med Sci. 2011; 2(5): 211-218.

5.Foley SL, Lynne AM. Food animal-associated Salmonella challenges: pathogenicity and antimicrobial resistance. J Anim Sci. 2008; 86: E173-187.

6.Solhan S, Chan PP, Kurupatham L, Foong BH, Lim Ooi P, James L, Phua L, Ling Tan L, Koh D, Tai Goh K. An outbreak of gastroenteritis caused by Salmonella enterica serotype Enteritidis traced to cream cakes. Western Pac Surveill Response. 2011; 2: 23-30.

7.Hoseynpour M, Sabokbar Azar, Bakhtiari A, Parsa Sh. Comparison of bacterial culture, elisa and pcr techniques for detection of salmonella in poultry meat samples collected from tehran. J Microb World. 2013; 6(1): 62-72.

8.Jamshidi A, Bassami MR, Afshari-Nic S. Identification of Salmonella spp. and Salmonella typhimurium by a multiplex PCR-based assay from poultry carcasses in Mashhad- Iran. Int J Vet Res. 2009; 3: 43-48.

9.Ghorbani Ranjbry A, Ghorbani Ranjbry N, Ghorbani Ranjbry Z, Asmarian Sh. Study on drug resistance in *salmonella* spp. Isolated form native edds in Fasa. J Modern Vet Res. 2012; 4(11):1-7.

10.Mousavi SL, Salimiyan J, Karimi Rahgerdi A, Amani J, Nazarian Sh, Ardestani H. Rapid and Specific Detection of Salmonella typhimurium using PCR - ELISA assay (PCR-ELISA). Iran J Clinic Infect Dis. 2006; 1(3): 113-119..

11.Nosrati Sh, Sabokbar A, Dezfolian M, Taraei B. Falah F. Prevalence of *Salmonella* serotype *typhimurium*, *S.enteritidis* in food from Mofid Hospital. J Res Med Sci. 2012; 36(1): 43-48.

12.Soltan Dalal MM, Taremi M, Modaesi Sh, Zolfaghareyan K, Moez Ardalan S, Zali M. Prevalence of Salmonella serotype in meat and poultry and detection of antibiotic resistance in Tehran. Pajohande. 2007; 3(57): 245-252.

13.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): 1-6.

14.Rastegar H, Ghahremani MH, Halaje Neyshabori SH, Jalali M, Enjerani S, Khosro Khavar R. Evaluation, separation and detection of *Salmonella typhimurium* in milk using traditional methods of cultivation and PCR. Iran J Nutr Sci Food Tchnol. 2008; 3(3): 45-52.

15.Maharjan M, Joshi V, Joshi DD, Manandhar P. Prevalence of *Salmonella* species in various raw meat samples of a local market in Kathmandu. Ann NY Acad Sci. 2006; 1081: 249-56.

16.Stevens A, Kaboré Y, Perrier-Gros-Claude JD, Millemann Y, Brisabois A, Catteau M, Cavin JF, Dufour B. Prevalence and antibiotic-resistance of *Salmonella* isolated from beef sampled from the slaughterhouse and from retailers in Dakar (Senegal). Int J Food Microbiol. 2006; 110(2): 178-186.

17.Luu QH, Fries R, Padungtod P, Tran TH, Kyule MN, Baumann MP, Zessin, K.H. Prevalence of *Salmonella* in retail chicken meat in Hanoi, Vietnam. Ann NY Acad Sci. 2006; 1081: 257-261.

18.Nagwa SR, Nashwa O, Khalifa Mervat EI, Radwan Jehan SA. Epidemiological and Molecular Studies of *Salmonella* Isolates from Chicken, Chicken Meat and Hum an in Toukh, Egypt. Global Veterinaria. 2012; 8 (2):128-132.

19.Soltan Dalal MM, Taremi M, Latif Gachkar L, Modarressi Sh, Sanaei M, Bakhtiari R, Sharifi Yazdi MK, Zali MR. Characterization of antibiotic resistant patterns of Salmonella serotypes .isolated from beef and chicken samples in Tehran. Jundishapur J Microbiol. 2009; 2(4): 124- 131

20.Carraminana JJ, Rota C, Augutin I, Herrera A. High prevalence of multiple resistance to antibiotics in *Salmonella serovars* isolated from poultry slaughterhouse in Spin.Vet Microbiol. 2004; 104(1-2):133-139.

21.Molla B, Alemayehu D, Salah W. Sources and distribution of *Salmonella* serotypes isolated from food animals, slaughterhouse personel and retail meat products in Ethiopia.1997-2002. Ethiop J Health Dev. 2003; 17(1): 63-70.