شناسایی همزمان آلودگی به *سالمونلا و E.coli* با حضورژن های *inv A* و *lam B* در نمونه های گوشت مرغ با روش Multiplex PCR

الهام سیاسی [1]*، نجمه حسن پور باغبانچیان[2]، جمیله نوروزی[3]

1-استادیار، گروه میکروبیولوژی،دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی ،واحد تهران شمال، تهران، ایران
2-کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی،دانشگاه آزاد اسلامی ، واحد تهران شمال، تهران ، ایران
3-استاد، گروه میکروبیولوژی،دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی ،واحد تهران شمال، تهران، ایران.

***نشانی برای مکاتبه:** میدان هروی – خیابان مکران جنوبی – بوستان دهم – دانشکده علوم زیستی - گروه میکروبیولوژی (هیئت علمی تمام وقت). تلفن : 09124056746- نمابر : 02122924833 - ایمیل : emi_biotech2006@yahoo.ca

دریافت مقاله: مهر نود و هفت پذیرش برای چاپ: آذر نود و هفت

چکیده

سابقه و هدف: *سالمونلا و E.coli از مهم ترین پاتوژن‌های مواد غذایی به ویژه گوشت مرغ هستند . تشخیص سریع، اختصاصی و همزمان این پاتوژن‌ها با شناسایی ژن‌های اختصاصی از اهمیت بالایی برخوردار است. هدف این مطالعه تشخیص همزمان سالمونلا و E.coli در گوشت مرغ بر مبنای تکثیر دو ژن inv A و lamB با روش Multiplex PCR بود.*

روش کار: *تعداد 100 نمونه گوشت مرغ جمع‌آوری شد. نمونه ها با نرمال سالین شسته شدند و بر روی محیط های بیوشیمیایی کشت داده شدند. جدایه‌های سالمونلا و E.coli خالص سازی شدند و استخراج DNA انجام گرفت. سپس تکثیر همزمان ژن های invA وlamB با واکنش Multiplex PCR انجام شد.*

یافته ها: *از 100 نمونه گوشت مرغ، 9 نمونه و 26 نمونه به ترتیب باکتری سالمونلا و E.coli ، با تست های بیوشیمیایی جداسازی شدند. نتایج واکنش Multiplex PCR فراوانی ژن invA را در 9٪ و ژن lamB را در 26٪ ، همچنین فراوانی هم زمان هر دو ژن را در 1٪ ، نمونه ها نشان داد.*

نتیجه گیری: *در این مطالعه نتایج واکنش Multiplex PCR که بر اساس ژن‌های بیماریزای اختصاصی سالمونلا و E.coli انجام شد نتایج حاصل از روش تست های بیوشیمیایی را تایید کرد. بنابراین مقایسه نتایج نشان داد واکنش Multiplex PCR جهت شناسایی سریع و همزمان پاتوژن‌های مواد غذایی از حساسیت بالایی برخوردار است و می تواند به عنوان روشی قابل اعتماد در کنترل آلودگی‌های مواد غذایی مطرح باشد.*

واژگان کلیدی: گوشت مرغ، سالمونلا، E.coli، ژن اختصاصی، Multiplex PCR

مقدمه

یکی از مشکلات مهم در جوامع بشری، آلودگی موادغذایی است(1). لزوم سالم بودن غذاهایی با منشأ دامی از نظر میکروبیولوژی موضوعی است که اخیرا تبلیغات زیادی در مورد آن صورت گرفته است(2). آلودگی مواد غذایی را می توان به دو گروه بزرگ تقسیم کرد: آلودگی اولیه که از همان ابتدا با مواد غذایی همراه است و آلودگی ثانویه که ماده غذایی در اصل فاقد آلودگی است اما به تدریج در اثر ورود میکروب ها، تخم یا لارو، انگل ها ، مواد شیمیایی و در حین تولید، حمل و نقل و تهیه غذا آلوده می شود(3). یکی از علل آلودگی موادغذایی وجود باکتری و یا سم حاصل از آنها در مواد اولیه تولیدات غذایی و یا تولیدات غذایی است که باعث آلودگی و غیر قابل مصرف شدن غذا می گردد(1). بسیاری از میکروب‌ها که در گذشته به عنوان عامل مسمومیت غذایی محسوب نمی‌شدند اخیراً به عنوان میکروب‌های بیماری‌زا مطرح شده‌اند(3). از مهمترین عوامل تولیدکننده مسمومیت های غذایی می توان به *استافیلوکوک ها، کلستریدیوم بوتولینوم* و خانواده انتروباکتریاسه که شامل چندین جنس *(اشریشیا، سالمونلا، شیگلا، انتروباکتر، کلبسیلا، سراشیا، پروتئوس)* است اشاره نمود(4).

دو باکتری *سالمونلا و E.coli* از عوامل ایجاد کننده مسمومیت گوارشی در بین اعضای خانواده انتروباکتریاسه هستند(5). *سالمونلا* در انسان عامل بیماری هایی همچون گاستروانتریت ، تب روده ای تیفوئید، پارا تیفوئید و باکتریمی است. بیماری زایی گونه های *سالمونلا* با توانایی وارد شدن و زنده ماندن در سلولهای میزبان ارتباط دارد. سالمونلوز یکی از بیماری های مشترک انسان و حیوان (زئونوز) است که شایع ترین مسمومیت های غذایی در جهان را ایجاد می کند و طیور به ویژه مرغ از گسترده ترین مخازن *سالمونلا* به شمار می رود(4). *E.coli* بیماری زای روده ای عامل مهم اسهال در کشورهای در حال توسعه و مکان هایی با فقر بهداشتی می باشد که بیماری های مهمی در انسان و دام ایجاد می نماید از آن جمله می توان به سویه های (*Avianpathogenic E.coli*) APEC عامل بیماری زایی طیور ،(*E.coli* EPEC (Enteropathogenic عامل مسمومیت غذایی در کودکان و (*E.coli* UPEC (Uropathogenic عامل عفونت دستگاه ادراری در انسان اشاره نمود(6).

امروزه از روش های مولکولی به عنوان جایگزین مناسب به جای روش های مبتنی بر کشت و تست های بیوشیمیایی، جهت شناسایی باکتری ها در مواد غذایی آلوده می توان استفاده کرد. بررسی حضور ژن *invA* در باکتری سالمونلا و ژن *lamB* در باکتری *E.coli* روشی مناسب جهت تشخیص سریع این باکتری ها در نمونه های غذایی آلوده است. ژن *inv A* در *سالمونلا*، کد کننده یک پروتئین درون غشایی است که مسئول تهاجم و چسبندگی به سلول های اپیتلیال میزبان می باشد و سبب می گردد باکتری به قسمت های عمقی تر روده نفوذ کند(6 و 7). حضور این ژن برای جنس *سالمونلا* اختصاصی است و شامل توالی منحصر به فردی مخصوص جنس *سالمونلا* است و تکثیر این ژن با PCR به عنوان یک استاندار جهانی به منظور تشخیص جنس *سالمونلا* شناخته شده است(8 و 9). ژن *lam B* در باکتری *E.coli* پروتئین اینتگرال غشای خارجی به نام پروتئین *lam B* را کد می کند. این پروتئین از زیر واحد های مشابه که به طور انتخابی به مالتوز و مالتودکسترین ها نفوذ پذیر می باشند، تشکیل شده است. همچنین پروتئین *lam B* گیرنده برخی از فاژها مانند *K10 وTP1* می باشد. این ژن خاص باکتری *E.coli* بوده و برای شناسایی مولکولی این باکتری به طور اختصاصی استفاده می شود(10).

با توجه به اهمیت شیوع بیماری های منتقل از مواد غذایی با منشأ دامی و لزوم تشخیص آلودگی آنها به باکتری ها، هدف از این مطالعه شناسایی همزمان *سالمونلا و E.coli* از طریق حضور ژن های *invA و lamB* با روش Multiplex PCR ، در نمونه های گوشت مرغ بود که روشی سریع و اقتصادی برای تشخیص آلودگی این منبع غذایی می باشد.

روش کار

این مطالعه با مراجعه به فروشگاه ها و مراکز تهیه مرغ برای مصارف خانگی صورت گرفت و تعداد 100 نمونه به طور تصادفی در ساعات اولیه روز انتخاب شد و نمونه ها در کنار یخ به آزمایشگاه منتقل شدند. نمونه ها در آزمایشگاه میکروبیولوژی به پلیت ها انتقال داده شدند و نرمال سالین 0/08٪ روی آنها ریخته شد، بعد از گذشته 30 دقیقه با استفاده از سمپلر مقداری از نرمال سالینی که نمونه در آن غوطه ور بود در محیط کشت مک کانکی و سلنیت F به صورت چمنی کشت داده و به مدت 24 ساعت در انکوباتور 37 درجه سانتیگراد نگهداری شدند. همچنین بعد از گذشته 24 ساعت، برای شناسایی اختصاصی باکتری *سالمونلا*، نمونه هایی که کشت سلنیت F در آنها مثبت بود (ایجاد کدورت شده بود) را بر روی محیط کشت انتخابی SS یا سالمونلا_شیگلا آگار ابتدا به صورت چمنی، و بعد از گذشته 24 ساعت در 37 درجه سانتی گراد به صورت 4 مرحله ای کشت داده شدند. سپس از محیط های افتراقی و تست های بیوشیمیایی برای تعیین سویه های جدا شده، استفاده شد (محیط های کشت تهیه شده از شرکت مرک المان بودند)

از محیط های کشت زیر برای انجام تست های بیوشیمیایی و شناسایی سویه ها استفاده شد (محیط های کشت تهیه شده از شرکت مرک المان بودند) :. مک کانکی آگار، سلنیت F ، سالمونلا_شیگلا آگار، تریپل شوگر ایرون آگار، متیل رد-وگس پرسکوئر، SIM ، سیمون سیترات ، اوره آز و تست های کاتالاز و اکسیداز به این ترتیب که نمونه ها بر روی این محیط ها، کشت داده شدند و به مدت 24 ساعت در انکوباتور 37 درجه سانتیگراد نگهداری شدند. سپس نتایج بررسی شد.

استخراج ژنوم به روش Boiling یا جوشاندن و ایجاد شوک حرارتی صورت گرفت. به این ترتیب که از تک کلنی های حاصل از کشت 4 مرحله ای بر روی محیط کشت سالمونلا_شیگلا آگار و محیط کشت مک کانکی به ترتیب

برای باکتری *سالمونلا* و باکتری *E.coli*، در محیط لاکتوز براث کشت داده شد. سپس محیط کشت را به مدت 24 ساعت در 37 درجه سانتی گراد انکوبه کرده و بعد از مخلوط کردن و همزدن(به دلیل یکنواخت شدن محیط کشت) مقدار 4 میلی لیتر از محیط کشت را در لوله ریخته و به مدت 5 دقیقه در دور 15000 g سانتریفوژ گردید. برای دست یابی به میزان بیشتر DNA، این مرحله 2 یا 3 بار تکرار شد. بعد از مرحله سوم روی رسوب کف لوله، مقداری آب مقطر ریخته و ورتکس انجام شد تا رسوب حل شود. لوله را درون بن ماری 100 درجه سانتیگراد به مدت 10 دقیقه قرار داده بلا فاصله لوله ها را در ظرف یخ به مدت 3 دقیقه گذاشته تا به وسیله ی شوک حرارتی دیواره باکتری متلاشی شود. لوله به مدت 3 دقیقه با دور g10000 سانتریفوژ شد، پروتئین ها، دیواره سلولی و مواد اضافی در کف لوله رسوب کردند و DNA بدون پوشش در مایه رویی لوله باقی ماند.

با استفاده از دستگاه نانودراپ محلول DNA را در طول موج 260 نانومتر (طول موج جذب اسید نوکلئیک) و 280 نانومتر (طول موج جذب پروتئین) اندازه گیری و در نهایت نسبت جذب نوری محلول های DNA در طول موج 260 نانومتر به 280 نانومتر (260/280) که شاخص خلوص DNA می باشد، بدست آمد. همچنین برای بررسی کیفیت DNA استخراج شده، نمونه ژنوم های استخراج شده بر روی ژل آگارز 1٪ الکتروفورز شدند.

به منظور ارزیابی حضور ژن *inv A* و *lam B* در باکتری های *سالمونلا* و*E.coli* ، تکثیر ژن ها با استفاده از توالی جفت پرایمرهایی که تهیه شده توسط شرکت پیشگام بودند و در جدول 1 آورده شده است، انجام گردید (11). حجم نهایی واکنش 25µl بوده که طبق جدول 2 تهیه شد و برنامه دستگاه PCR برای انجام واکنش در جدول شماره 3 آورده شده است.

برای مشاهده باندهای حاصل از تکثیر ژن های مورد مطالعه محصولات واکنش Multiplex PCR بر روی ژل اگاروز 2٪ برده و الکتروفورز شدند. سپس تصویر باندها بوسیله ژل داک مشاهده شد.

جدول 1- توالی پرایمرهای تکثیر ژن های *invA ،lamB* (11)

پرایمر	باکتری	توالی	اندازه
lam B	E.coli	Forward: 5´CTGATCGAATGGCTGCCAGGCTCC3´ Reverse: 5´CAACCAGACGATAGTTATCACGCA3'	309 bp
inv A	Salmonella	Forward: 5´CCTGATCGCACTGAATATCGTACTG3´ Reverse: 5´GACCATCACCAATGGTCAGCAGG3'	598 bp

جدول 2- مواد و حجم مورد نیاز برای واکنش PCR

مواد	غلظت	حجم
بافر PCR	10x	5 میکرو لیتر
کلرید منیزیم	50 میلی مول	3 میلی لیتر
dNTPs	0/5 میکرومول	1 میلی لیتر
آنزیم Taq	0/2 میکرومول	0/5 میلی لیتر
هر یک از پرایمرهای چپ و راست (4 مورد)	10 پیکو مول	1 میلی لیتر
DNA الگو (2 مورد)	0/4 میکرومول	1 میلی لیتر
آب	-	9/5 میکرولیتر
حجم نهایی	-	25 میکرولیتر

جدول 3- برنامه دستگاه برای واکنش Multiplex PCR برای ژن های *lamB، invA*

زمان	دما	مراحل
2 دقیقه	95c	واسرشتی اولیه
30 ثانیه	95c	چرخه واسرشت
30 ثانیه	60c	اتصال پرایمر
2 دقیقه	72c	گسترش
7 دقیقه	72c	گسترش نهایی

چرخه به تعداد 30 سیکل تکرار شد.

یافته ها

در این مطالعه از 100 نمونه گوشت مرغ تازه مورد بررسی براساس واکنش های بیوشیمیایی 35 نمونه آلوده به باکتری های *سالمونلا* و *E.coli* بودند. از این تعداد 9 نمونه باکتری *سالمونلا* و 26 نمونه باکتری *E.coli* شناسایی شد. فقط در یک نمونه همزمان دو باکتری شناسایی شد.

رشد *سالمونلا* بر روی محیط سلنیت F باعث ایجاد کدورت شد. رشد *سالمونلا* بر روی محیط *سالمونلا- شیگلا* آگار باعث ایجاد کلنی های زرد متمایل به شفاف که دارای مراکز سیاه بود شد.

رشد باکتری *E.coli* روی محیط مک کانکی آگار با تولید اسید، این محیط کشت را به رنگ قرمز و صورتی تبدیل نمود.

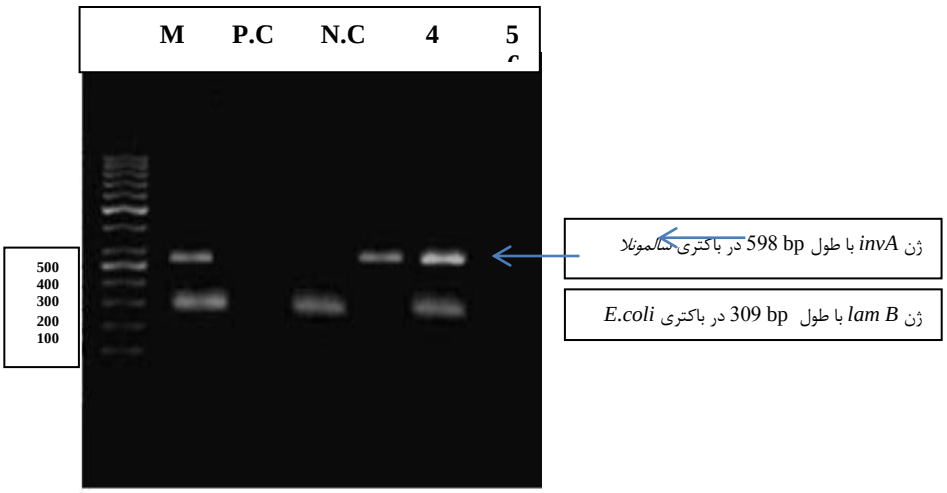
نتایج واکنش های بیوشیمیایی برای تشخیص باکتری های *سالمونلا* و *E.coli* در جدول 4 اورده شده است.

آزمایش	باکتری *E.coli*	باکتری *سالمونلا*
TSI	A/A	Alk/A H_2S
سیترات	-	+
MR	+	+
VP	-	-
اوره	-	-
کاتالاز	+	-
اکسیداز	-	-
SIM (اندول)	+	-
SIM (تولید H2S)	-	+
SIM (حرکت)	+	-

جدول 4- نتایج تست های افتراقی برای تشخیص باکتری های سالمونلا وE.coli

در دستگاه نانو دراپ میزان جذب نور تمامی DNA های استخراج شده بین 2-1/8 بود و باند حاصل از نمونه های استخراج شده با بردن روی ژل اگاروز 1٪ مشاهده شد.

پس از انجام واکنش PCR برای ژنوم نمونه هایی که آلوده به باکتری های سالمونلا و *E.coli* بودند، محصول PCR بر روی ژل اگاروز 2٪ الکتروفورز شد و باندهای مربوط به ژن*invA* با طول 598 bp مربوط به باکتری *سالمونلا* در 9 نمونه و ژن *lamB* با طول 309 bp مربوط به باکتری *E.coli* در 26 نمونه مشاهده شد. همچنین در یک نمونه حضور هر دو ژن گزارش شد. نتایج تکثیر همزمان ژن های *invA* و *lamB* در باکتری های *سالمونلا* و *E.coli* ، *با واکنش* PCR Multipelx در شکل 1 آورده شده است.



شکل 1- نتایج تکثیر ژن *invA* با طول 598 bp در باکتری *سالمونلا* و ژن *lam B* با طول 309 bp در باکتری *E.coli*
(چاهک M : مارکر مولکولی 100 bp ، چاهک P.C : کنترل مثبت، چاهک N.C : کنترل منفی، چاهک 4: نمونه ژن *invA* با طول 598 bp در باکتری *سالمونلا* ، چاهک 5 : نمونه ژن *lam B* با طول 309 bp در باکتری *E.coli*، چاهک 6 : نمونه دارای هر دو ژن (ژن *invA* با طول 598 bp در باکتری *سالمونلا* و ژن *lam B* با طول 309 bp در باکتری *E.coli*).

بحث

بیماری های با منشاء غذایی به عنوان عوامل اصلی گاستروانتریت در انسان شناخته شده است و چهره اپیدمیولوژیک این بیماری ها به سرعت در حال تغییر بوده و عوامل بیماری زا و ارتباط آن با بیماری های منتقل از طریق غذا در حال گسترش می باشد. در بین پروتئین های حیوانی، گوشت طیور در بین مصرف کنندگان از جایگاه خاصی برخوردار است (12). یکی از چالش های عمده بهداشتی محصولات طیور، آلودگی گوشت و فرآورده های آن با انواع میکروارگانیسم های بیماری زا و ایجاد کننده مسمومیت است. اگر شرایط کشتار، فرآوری، حمل و نگهداری گوشت مناسب نباشد باکتری های مولد فساد و بیماری زا به سرعت رشد کرده و باعث افت کیفیت گوشت می شوند و سلامت و بهداشت عمومی نیز در معرض خطر قرار می گیرد. بنابراین ره یافت هایی که بتواند بار میکروبی گوشت و فرآورده های جانبی آن را در فرآیند کشتار، بسته بندی و عرضه کاهش دهد می تواند باعث افزایش کیفیت بهداشتی گوشت و در نتیجه باعث افزایش مدت نگهداری گوشت گردد. *سالمونلا* و *E.coli* از جمله خطرناک ترین پاتوژن های باکتری یایی منتقل شونده از طریق غذا هستند که سالانه موجب بیماری و حتی مرگ می شوند، علاوه بر این ضررهای اقتصادی زیادی به صنایع غذایی وارد می کنند. روش های مرسوم که جهت شناسایی پاتوژن های غذایی استفاده می شوند زمان بر بوده و عموماً از حساسیت پایینی برخوردار است. بنابراین به کارگیری روشی سریع و قابل اطمینان جهت شناسایی پاتوژن های مواد غذایی ضروری به نظر می رسد (13).

بنابراین در این پژوهش به طور همزمان از دو ژن *invA* و*lamB* جهت شناسایی *سالمونلا* و *E.coli* در نمونه های گوشت مرغ تازه با روش Multiplex PCR استفاده شد. در یک Multiplex PCR ، بیش از یک توالی هدف با استفاده از چندین جفت پرایمر در یک واکنش می تواند تکثیر پیدا کند. انتخاب جفت پرایمرها در واکنش Multiplex PCR برای تشخیص هم زمان پاتوژن های منتقله از مواد غذایی با حساسیت بالا و هم چنین جلوگیری از واکنش متقاطع، از اهمیت ویژه ای برخوردار است. جفت پرایمرهای طراحی شده در این مطالعه شامل پرایمر *invA* برای ردیابی توالی 309 bp از ژن *invA* *سالمونلا* بود. ژن *invA* یکی از ژن های کروموزومی ویرولانس *سالمونلا* و کدکننده پروتئینی در غشا داخلی باکتری است که مسئول تهاجم به سلولهای اپی تلیال میزبان است. این ژن دارای توالی های منحصر به

فردی در این جنس بوده و به عنوان یک هدف مناسب برای PCR با پتانسیل تشخیص بالا اثبات شده است (14). همچنین استفاده از این ژن برای شناسایی *سالمونلا* در نمونه های غذایی در این جنس اختصاصی بوده و از حساسیت بالایی برخوردار می باشد. دومین جفت پرایمر طراحی شده در این مطالعه، پرایمر *lamB* برای ردیابی توالی bp 538 از ژن *lamb* در باکتری *E.coli* بود. ژن *lamB* یکی از مهم ترین ژن های ویرولانس این باکتری است. از آنجایی که این ژن در تمامی مراحل رشد باکتری، از اوایل فاز لگاریتمی تا انتهای فاز سکون نسخه برداری می شود، به عنوان یک مارکر مناسب برای شناسایی این باکتری به حساب می آید. به منظور مقایسه حساسیت واکنش PCR چندگانه و روش های سنتی، برای شناسایی دو پاتوژن در نمونه های گوشت مرغ تازه، روش های بیو شیمیایی نیز انجام گرفت. این مطالعه نشان داد که از 100 نمونه گوشت مرغ تعداد 9 نمونه باکتری سالمونلا و 26 نمونه باکتری *E.coli*، با واکنش های بیوشیمیایی رایج جداسازی شد. همچنین انجام روش مولکولی با واکنش Multiplex PCR، فراوانی ژن های *invA* و *lamB* را به ترتیب در 9 ٪ و 26٪ و فراوانی هم زمان هر دو ژن را در 1٪ ، نمونه ها نشان داد.

در مطالعه ای که در مشهد انجام شده بود میزان آلودگی لاشه های طیور گوشتی به باکتری *سالمونلا* مورد ارزیابی قرار گرفته بود. در ان مطالعه از 12 گله گوشتی تعداد 60 نمونه سواب از ناحیه گردن طیور در یکی از کشتارگاه های صنعتی اطراف مشهد اخذ گردید. در این بررسی، باکتری *سالمونلا* از 66/11٪ نمونه ها جداسازی گردید (15). در مطالعه دیگری در آذربایجان شرقی، از مجموع 520 نمونه گوشتی که شامل 400 نمونه گوشت مرغ بود، میزان شیوع *سالمونلا* 7/25 ٪ تعیین گردید (16). در کشورهای مختلف میزان آلودگی گوشت مرغ به *سالمونلا* به ترتیب برابر با 5 تا 25 ٪ است و این میزان شیوع در کشورهای در حال توسعه حتی بیشتر است. مطالعات مختلف که در ده سال گذشته انجام شده اند شیوع آلودگی به *سالمونلا* در مزارع پرورش جوجه گوشتی در ایران از 22/5 تا 64/2 درصد گزارش شده است (17) و شیوع آلودگی به سالمونلا در گوشت مرغ کشتارگاه های کشور در مطالعات انجام شده 11/6 درصد تا 47 درصد بوده است (18). نتایج مطالعه ای در شهرکرد در سال 1393 که با کشت میکروبی، آزمون های بیوشیمیایی و تأیید تشخیص به روش واکنش زنجیره ای پلیمراز همراه بود نشان داد که از 360 نمونه گوشت های مختلف 54 نمونه (15 ٪) آلوده به *سالمونلا* بودند و از این تعداد 89 نمونه (31/46 ٪) گوشت مرغ بوده اند (19). در مطالعه ای که در سال 1396 توسط دکتر محمد مهدی سلطان دلال در استان تهران انجام شد 630 نمونه گوشت مرغ بسته بندی شده و غیر بسته بندی قصابی ها و مرغ فروشی های جنوب استان تهران جمع آوری شد و نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که 49/2 ٪ نمونه گوشت مرغ و 8/9 ٪ نمونه گوشت قرمز آلوده به باکتری *سالمونلا* بودند (20). محققان دیگر نظیر بلی و همکاران، در سال 2001 *سالمونلا* را به عنوان یک میکروارگانیسم شاخص در طیور زنده شناسایی نموده، و این باکتری را در صورت پخت نامناسب و یا از طریق آلودگی متقاطع، از اغذیه آماده مصرف جدا نموده اند (21). سو و همکاران در سال 2010 ضمن آنکه پتانسیل سطوح آلوده به گونه های مختلف *سالمونلا* را در انتقال آلودگی متقاطع، قابل توجه تفسیر نموده اند، رشد *سالمونلا* را در درجه حرارت یخچالی امکان پذیر دانسته اند. در مطالعه آنان گونه های *سالمونلا* در 9 مورد (36 ٪) از نمونه های مرغ منجمد شده و 13 مورد (52 درصد) از نمونه های فیله منجمد جدا گردید (22). همچنین در مطالعه مولکولی منگیستو در سال 2011 از 121 نمونه بافت مرغ 7 مورد *سالمونلا* جدا شد (23). سوریا و همکاران در سال 2012 با مقایسه روش تشخیص کشت و PCR به منظور شناسایی *سالمونلا* نشان دادند که دقت روش PCR دقیق تر از روش های کشت می باشد (24). در سال 2014 در برزیل روولند و همکاران، تعداد 237 گونه سالمونلای مرتبط و یا غیرمرتبط با سالمونلوزیس منتقله از طریق مواد غذایی را مورد مطالعه قرار دادند. در مطالعه انان تمامی سویه ها از نظر حضور ژن *invA* مثبت بودند (25). نتایج تحقیقات فوق همگی بیانگر آلودگی گوشت مرغ به *سالمونلا* با بیش از 7٪ و همراه با حضور ژن *invA* می باشد که در تحقیق حاضر نیز حضور این باکتری و ژن *invA* با فراوانی 9٪ مشاهده شد و با نتایج تحقیقات گذشته در این زمینه همخوانی داشت.

به طور معمول آلودگی با *E. coli* در گوشت مرغ وجود ندارد به عبارتی آلودگی گوشت مرغ با *E.coli* در فرایند کشتار به دلیل آلودگی های متقاطع و گاهی در اثر تماس با محتویات گوارشی، امری اجتناب ناپذیر است و به مصرف یا عدم مصرف آنتی بیوتیک در طول پرورش ارتباط ندارد. به عبارتی آلودگی با *E. coli* حتی در سیستم های پرورش بدون آنتی بیوتیک نیز به عنوان یک دغدغه و نگرانی بهداشتی گوشت طیور مطرح است. علاوه بر آن بررسی ارتباط رخداد بیماری کلی باسیلوز و آلودگی گوشت مرغ نیز نشان می دهد در بین این دو پارامتر ارتباطی وجود ندارد. به عبارتی صرف نظر از اینکه در طول دوره پرورش آلودگی کلی باسیلوز رخ داده یا نداده باشد امکان آلودگی لاشه با *E.coli* وجود دارد. اما با توجه به درصد بالاتر آلودگی لاشه در گله های با سابقه بیماری کلی باسیلوز، می توان بیان کرد که احتمال آلودگی لاشه در گله هایی که سابقه بیماری کلی باسیلوز دارند بیشتر است (26). *E.coli* می تواند تولیدات دامی از جمله تخم مرغ و گوشت را آلوده کرده و باعث ایجاد یک مسیر انتقال بیماری از دام به انسان شود و بدین وسیله دارای پتانسیل ایجادکننده بیماری مشترک انسان و دام باشد (26). در مطالعه ای که در سال 1396 توسط مرسلی و همکاران انجام شد، از مجموع 96 نمونه غذای مورد آزمایش، 10 نمونه 10/4 ٪ به *E.coli* آلوده بوده که از این 10 نمونه 6 مورد آن مربوط به *E.coli* سروتایپ O157 بود. با توجه به اینکه *E. coli* شاخص کنترل بهداشتی آب و مواد غذایی است و طبق استاندارد نباید مواد غذایی فوق به این باکتری آلوده باشند، آلودگی 10/4٪ از نمونه های غذایی مورد آزمایش به این باکتری برای مسئولین بهداشتی سازمان هشدار دهنده است و می تواند موجب بروز عفونت و مسمومیت غذایی در بین مصرف کنندگان گردد (9). نتایج پژوهشی که توسط خانم دکتر نوروزی در سال 1390 انجام شد نشان داد که پایش ژن *lamb* یک روش مناسب برای جداسازی *E.coli* و شیگلا از سایر اعضا انتروباکتریاسه می باشد (10). در سال 1390 در یک دوره نمونه برداری در ارومیه، تعداد 134 نمونه گوشت طیور که از نقاط مختلف بدن ماکیان تهیه شده بود مطالعه شد و از 37 درصد نمونه ها *E. coli* جدا گردید (2). در سال 1393 در اصفهان مطالعه ای به سرپرستی دکتر فرهاد صفرپور دهکردی انجام شد که گزارش مربوط به این پژوهش نشان داد از کل نمونه های جمع آوری شده 20/45 ٪ از نمونه ها آلوده به باکتری *E. coli* بودند (27). همچنین در بررسی ممتاز و جمشیدی در سال 2012 از کل 422 نمونه گوشت جوجه بررسی شده، 146 نمونه (34/59 ٪) آلوده به باکتری *E. coli* بودند (26). آسنسی و همکاران در سال 1981 باکتری های سالمونلا و *E.coli* را از نمونه های مرغ جداسازی کردند، آن ها برای شناسایی سریع تر این باکتری های از روش Multiplex PCR استفاده نمودند. همچنین آنها برای تشخیص *E.coli* از حضور ژن *lamb* استفاده کردند (28).

تحقیقات فوق بیانگر این است که آلودگی گوشت مرغ با باکتری *E.coli* با درصد بالاتری نسبت به باکتری *سالمونلا* می باشد و با نتایج تحقیق حاضر نیز که الودگی با *E.coli* ٪26 در مقایسه با 9٪ الودگی با *سالمونلا* مشاهده شده است، همخوانی داشت. همچنین در ان تحقیقات مشابه با تحقیق حاضر، از ژن *lamb* به عنوان ژن اختصاصی برای تشخیص باکتری *E.coli* استفاده شده بود. به علاوه با توجه به اینکه بیش ترین حضور *E.coli* در مدفوع بوده و از این طریق می تواند باعث آلودگی سطح لاشه طی مراحل کشتار شود، به همین دلیل رعایت اصول بهداشت به همراه پایش دوره ای و منظم باکتری در کلیه مراحل نگهداری، پرورش و کشتار، خطر ابتلا به عفونت های ناشی از *E.coli* را در سطح جامعه کاهش می دهد.

بطور کلی از بررسی نتایج مطالعه های ذکر شده و نتایج مطالعه حاضر می توان نتیجه گرفت که روش های مولکولی به مراتب از روش های کشت و تست های بیوشیمیایی دقیق تر، سریع تر و حساس تر هستند و می توان در زمان کوتاهی پاتوژن های مهاجم را به وسیله این روش ها شناسایی کرد. همچنین روش Multiplex PCR می تواند جهت تشخیص سریع و هم زمان دو باکتری *سالمونلا* و *E.coli* از سایر باکتری های هم خانواده آنها مورد استفاده قرار گیرد. اختصاصیت این روش بسیار بالاست، به طوری که قادر است یک نوع باکتری را در بین هزاران نوع باکتری متفاوت تشخیص دهد. همچنین انجام این روش بسیار ساده است و با توجه به اینکه به طور همزمان صورت می گیرد نیاز به انجام PCR های متعدد جهت تشخیص هر عامل به طور جداگانه

نمی باشد. از این روش می توان در آزمایشگاه های تشخیص مولکولی عوامل عفونی و یا آزمایشگاه های سیار تهیه شده جهت بحران ها و شرایط خاص استفاده نمود.

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که روش مولکولی PCR Multiplex برای تکثیر ژن های *inv A* و *lam B* روشی مناسب جهت تشخیص سریع و همزمان باکتری های بیماری زای *سالمونلا* و *E.coli* در نمونه های غذایی آلوده است و می توان آن را جایگزین روش های تشخیص سنتی در آزمایشگاه های مواد غذایی نمود و با توجه به اهمیت گوشت در رژیم غذایی و احتمال بروز عفونت از طریق گوشت های آلوده به این دو باکتری تشخیص سریع آلودگی آنها اهمیت بیشتری پیدا می کند که روش واکنش Multiplex PCR دارای حساسیت بالایی در این زمینه می باشد. همچنین با توجه به تغییرات گوناگونی که امروزه در فنوتیپ باکتری های پاتوژن به صورت طبیعی و یا دست کاری های ژنتیکی و عمدی صورت می گیرد و باعث اختلال در تشخیص این باکتری ها به روش های سنتی می شود، از روش های مولکولی PCR که سریع تر و دقیق تر نیز می باشد به عنوان جایگزین مناسب برای روش های رایج و مرسوم فعلی برای شناسایی باکتری ها در مواد غذایی آلوده می توان استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

از گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال و مدیریت و پرسنل آزمایشگاه پیام نور که ما را در انجام مراحل این پروژه یاری رساندند کمال تشکر و قدردانی می گردد.

REFERENCES

1. Hussain MA. Antimicrobial-resistance bacteria in food products. Adv Food Technol Nutr Sci Open J. 2016; 2(2): e1-e2.
2. Sadeghi zali MH, Hashem por A, Kalb khani M, Delshad R. Compaire study of Salmonella contamination in different organ from chicken carcass in Urmia slaughterhouse. Journal of Veterinary Clinical Research. 2011; 5(1): 57-60.
3. Eucharia A A, Chukwu U, Ahudie B. Microbiological Contamination Of Food: The Mechanisms, Impacts And Prevention. Int J OF Sce Tech Res. 2016; 15(3): 65-78.
4.Yeleliere E, Cobbina SJ, Abubakari ZI. Review of microbial food contamination and food hygiene in selected capital cities of Ghana. Cogent Food and Agriculture. 2017; 3: 1395102.
5. Amirmozaffari N, Rahmani Z. Iesazadeh Kh. Evaluation of the level of contamination with salmonella spp. in red meat, chicken and domestic and industrial eggs produced in Talesh city and assessment of their antibiotic resistance pattern, Iran. Qom univ med sci J. 2013; 7(5): 60-65.
6. Kawasaki S, Fratamico PM, Horikoshi N, Okada Y, Takeshita K, Sameshima T, et al. Evaluation of a multiplex PCR system for simultaneous detection of Salmonella spp., Listeria monocytogenes, and Escherichia coli O157: H7 in foods and in food subjected to freezing. Foodborne pathogens and disease. 2009; 6(1): 81-89.
7. Rhoades J R, Duffy G, Koutsoumanis K. Prevalence and concentration of verocytotoxigenic Escherichia coli, Salmonella enterica and Listeria monocytogenes in the beef production chain: a review. Food microbiology. 2009; 26(4): 357-376.
8. Upadhyay B P, Utrarachkij F, Thongshoob J, Mahakunkijcharoen Y, Wongchinda N, Suthienkul O, et al. Detection of Salmonella invA gene in shrimp enrichment culture by polymerase chain reaction. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health. 2010; 41(2): 426.
9.Hossein Morsali H, Asaadi Tehrani G, Asaadi H, Yazdansetad S, Najafpour R. Optimization of a Multiplex PCRfor Simultaneous Detection of Foodborne Pathogens Salmonella spp. And Escherichia coli O157:H7 and Contamination Prevalence Assay in Meat PRoducts. Arak Medical University Journal (AMUJ).2017; 20(123): 83-93.

10. Nowroozi J, Rajabnia R, Chenari SM. Identification and differentiation of *E. coli* and *Shigella* from other *Enterobacteriaceae* sp. by *lamB* gene amplification. Journal of Microbial World. 2011; 4(1-2): 23-27.
11. Kapley A, Lampel K, Purohit H J. Thermocycling steps and optimization of multiplex PCR. Biotechnol Lett. 2000; 22: 1913.
12. Zhao C, Ge B, De Villena J, Sudler R, Yeh E, Zhao S, et al. Prevalence of Campylobacter spp., Escherichia coli, and Salmonella serovars in retail chicken, turkey, pork, and beef from the Greater Washington, DC, area. Applied and environmental microbiology. 2001; 67(12): 5431-5436.
13. Dombek PE, Johnson LK, Zimmerley ST, Sadowsky M J. Use of repetitive DNA sequences and the PCR to differentiateescherichia coli isolates from human and animal sources. Applied and Environmental Microbiology. 2000; 66(6): 2572-2577.
14. Zhao S, Qaiyumi S, Friedman S, Singh R, Foley SL, White DG, et al. Characterization of Salmonella enterica serotype Newport isolated from humans and food animals. Journal of Clinical Microbiology. 2003; 41(12): 5366-5371.
15. Jamshidi A, Basami MR. Application of Multiplex PCR for detection of Salmonella spp and Salmonella Typhimurium in flock carcass in Mashhad Slaughterhouse. International Journal of Veterinary Research. 2009; 3(1): 43-48.
16. Taheri H, Peighambari SM, Morshed R, Barin A. The rate of Salmonella and Escherichia coli isolations from broiler breeder flocks in various provinces of Iran. Iranian Journal of Vetrinary Clinical Sciences. 2016; 9(2): 3-10.
17. Morshed R, Peighambari SM. Drug resistance, plasmid profile and random amplified polymorphic DNA analysis of Iranian isolates of Salmonella Enteritidis. The new microbiologica. 2010; 33(1): 47.
18. Jamshidi A, Kalidari G A, Hedayati M. Isolation and identification of Salmonella Enteritidis and Salmonella Typhimurium from the eggs of retail stores in Mashhad, Iran using conventional culture method and multiplex PCR assay. Journal of food safety. 2010; 30(3): 558-568.
19. Momtaz H, Ghaedamini R, Momeni M. Detection of virulence factors in Salmonella typhimurium and Salmonella enteritidis serotypes isolated from chicken meat in Chaharmahal va Bakhtiari Province of Iran. Journal of food microbiology. 2014; 1(1): 17-22.
20. Soltan dalal MM, Ahadi S, Zeraati H, Bakhtiari R, Ezadpor F, Khalifeh gholi M, Kamkar A. Compariation of red and chiken meats microbial contamination frequency in small and big shopping of south Tehran. Journal of Shaeed Sdoughi University of Medical Sciences Yazd. 2015; 15(1): 35-43.
21. Beli E, Duraku E, Telo A. Salmonella serotypes isolated from chicken meat in Albania. International Journal of Food Microbiology. 2001; 71(2-3): 263-266.
22. Suo B, He Y, Paoli G, Gehring A, Tu S I, Shi X. Development of an oligonucleotide-based microarray to detect multiple foodborne pathogens. Molecular and cellular probes. 2010; 24(2): 77-86.
23. Menghistu HT, Rathore R, Dhama K, Agarwal RK. Isolation, Identification and Polymerase Chain Reaction (PCR) Detection of Salmonella species from field materials of poultry origin. Int J Microbiol Res. 2011; 2(2): 135-142.
24. Soria MC, Soria MA, Bueno DJ. Comparison of 2 culture methods and PCR assays for Salmonella detection in poultry feces. Poultry science. 2012; 91(3): 616-626.
25. Gravato Rowlands RE, Ristori CA, Ikuno AA, Barbosa ML, Jakabi M, de Melo Franco BDG. Prevalence of drug resistance and virulence features in Salmonella spp. isolated from foods associated or not with salmonellosis in Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo.. 2014; 56(6): 461-467.
26. Jamshidi S, Tabrizi AS, Bahrami M, Momtaz H. Microsporidia in household dogs and cats in Iran; a zoonotic concern. Veterinary parasitology. 2012; 185(2-4): 121-123.

27. Sadeghabadi AF, Ajami A, Fadaei R, Zandieh M, Heidari E, Sadeghi M, et al. Widespread antibiotic resistance of diarrheagenic Escherichia coli and Shigella species. Journal of research in medical sciences. 2014; 19(l): s51-s55
28. Asensi GF, Rodriguez DP, Silva JT, Paschoalin VM F. Isolation and identification of E. coli and Salmonella in chicken rinse through microbiological and molecular methods. Appl Environ Microbiol. 2014; 41(2): 647-653.