

ارزیابی، جداسازی و تشخیص سالمونلا تیفی موریوم در شیر با روش‌های متداول کشت و PCR

حسین رستگار^۱، محمد حسین قهرمانی^۲، شیما حلاج نیشابوری^۳، مریم جلالی^۴، صغیر 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 پذیرش: ۱۶/۱۱/۸۷

تاریخ دریافت: ۱۶/۱۱/۸۶

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 می‌شود. اما این روش، زمان بر است و دقت کافی ندارد. به همین دلیل در این مطالعه، استفاده از روش PCR بجای روش معمول کشت میکروبی به عنوان یک روش سریع و دقیق برای جستجوی سالمونلا تیفی موریوم 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 تیفی موریوم (۱۰^{-۱} تا ۱۰^{-۱۰}) 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.

یافته‌ها: روش PCR در نمونه‌هایی که به صورت دستی با سالمونلا تیفی موریوم، آلوده شد. در محیط BPW غنی‌سازی شده بودند، توانست در ۸، ۱۲ و ۱۶ ساعت غنی‌سازی به ترتیب ۱۰^{-۱}، ۱۰^{-۵} و ۱۰^{-۱۰} 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 تیفی موریوم آلوده نبودند.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد روش PCR می‌توان در کمتر از ۲۴ ساعت، نسبت به جداسازی و شناسایی سالمونلا تیفی موریوم در شیر با شناسایی حداقل ۱ باکتری در نمونه اقدام کرد. در حالی که 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 تیفی موریوم، PCR، کشت میکروبی، شیر

• مقدمه

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 (۴-۷) علیه آنتی‌ژن‌های فلازلر و سوماتیک، سنجش با هیبریداسیون

جنس سالمونلا بر اساس ویژگی‌های بیوشیمیایی و همولوژی DNA دارای گونه سالمونلانتریکا با هفت زیر‌گونه است (۱). جنس سالمونلا بر اساس آنتی‌ژن‌های فلازلر و سوماتیک به بیش از ۲۶۰۰ سرووار تقسیم می‌شود که بیشتر آنها برای انسان و حیوان بیماری‌زا هستند. عموماً انتقال بیماری از طریق آب و غذا صورت

مرحله کشت میکروبی، رقيق سازی و غنی سازی: ابتدا سوش سالمونلا تیفی موریوم به صورت پودر لیوفیلیزه استریل از "مرکز تحقیقات آزمایشگاه رفانس" تهیه شد. سپس با لوب استریل، مقدار بسیار کمی از آن در ۱۰ ml محیط کشت TSB کشت داده شد و به مدت ۱ شب در دمای ۳۷°C روی دستگاه شیکر انکوباتور با چرخش rpm UV ۱۵۰ قرار گرفت. در مرحله بعد با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (طول موج ۶۸۰ nm) و محیط کشت TSB رقتی از شیر با تعداد 10^8 باکتری در میلی لیتر که معادل TSB OD=۰/۲ بود، تهیه شد (۲۰). سپس با محیط کشت TSB رقت های دیگری از سالمونلا (از رقت 10^7 تا 10^1) تهیه شد (۱۹). در ادامه کار در ۵ لوله آزمایش، هر کدام ۴ ml (Buffer Peptone Water) BPW محیط کشت غنی شده ریخته و به آن $1ml$ ۹۰۰ از شیر مورد مصرف در بازار اضافه شد. در مرحله بعدی به لوله های اول $1ml$ ۱۰۰ از (معادل 10^1 باکتری سالمونلا)، به لوله دوم $1ml$ ۱۰۰ از رقت 10^2 (معادل 10^1 باکتری سالمونلا) و به لوله سوم $1ml$ ۱۰۰ از رقت 10^1 (معادل 10^0 یا 1 باکتری سالمونلا) و به لوله چهارم $1ml$ ۱۰۰ از رقت 10^0 (معادل 10^{-1} باکتری سالمونلا) اضافه شد. برای به دست آوردن غلظت 5 باکتری در شیر غنی شده با BPW به لوله پنجم مقدار $1ml$ ۵۰ از غلظت 10^2 و $1ml$ ۵۰ از BPW اضافه شد. همچنین دو لوله دیگر، یکی حاوی 4 میلی لیتر BPW و $1ml$ ۱۰۰۰ شیر مورد مصرف در بازار به عنوان نمونه مورد آزمون و دیگری فقط حاوی 5 میلی لیتر BPW به عنوان نمونه کنترل منفی تهیه شد. سپس نمونه های تهیه شده در مرحله قبلی به مدت 8 ساعت در شیکر انکوباتور دار با دمای $37°C$ قرار داده شدند. پس از 8 ساعت، آنها از انکوباتور، خارج و به مدت 30 دقیقه با دور 6000 rpm سانتریفوژ شدند و محلول رویی دور ریخته شد و از سلول های رسوب داده شده در ته لوله آزمایش به صورت پلت جهت مرحله بعدی استخراج DNA استفاده شد (۱۹، ۲۵). کلیه مراحل ذکر شده با شرایط یکسان و تنها تفاوت در مدت زمان غنی سازی 12 و 16 ساعت دوبله انجام گفت.

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

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

در حال حاضر، در آزمایشگاه‌های تشخیصی برای جستجوی بسیاری از میکرووارگانیسم‌ها (سامونلا، بروسلاء، لیستریا، اشريشیا کلی) از روش‌های کشت میکروبی استفاده می‌شود. این روش در تشخیص آلودگی مواد غذایی به سالمونلا علاوه بر مشکلات انجام آزمایش و عدم دقق 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 تیفی موربوم ۴ الی ۶ روز وقت لازم است (۱۷-۱۵). به علاوه حساسیت و دقق پاسخ‌های حاصله نیز یابن 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 ۶۵۷۹ در مواد غذایی (۱۷-۱۵) استفاده خواهد شد.

با توجه به افزایش روز افرون 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 تهییه شده از بازار مصرف به سالمونلا تیفی موریوم، مزیت روش PCR نسبت به روش میکروبی مورد مطالعه و مقایسه قرار گیرد.

• موارد و روش‌ها

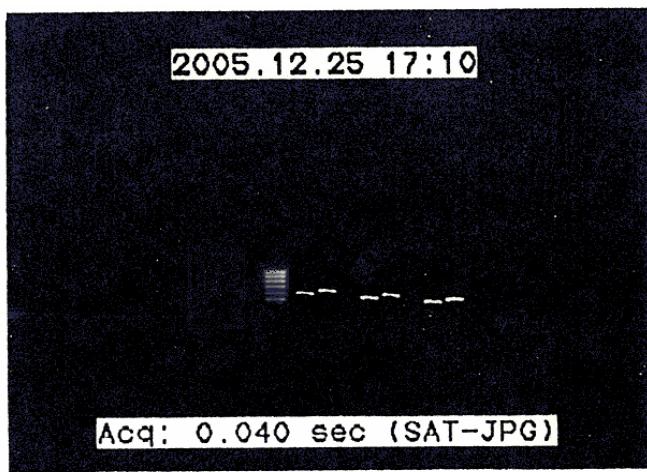
برای انجام آزمون PCR قسمتی از شیرهای پاستوریزه که به شکل دستی با سالمونلا آلوده شده بودند یا هیچ گونه آلودگی تجربی نداشتند، پس از مراحل کشت، غنی‌سازی و استخراج DNA تحت آزمون PCR و الکتروفوروز قرار گرفتند. (۲۷، ۲۳، ۲۲، ۱۹، ۱۸) قسمت دیگر شیرهای مورد آزمایش، نیز تحت آزمون کشت معمول میکرده‌اند، قرار گرفتند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

ST 11: GCCAACCATTGCTAAATTGGCGCA
 ST 15: GGTAGAAATTCCCAGCGGGTACTGG
 و اندازه قطعه تکثیر شده (۲۷) ۴۲۹ bp در مجموع، حجم کل نمونه ۱۱۰ μl 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 تیوب را در یک تیوب 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 Fli₁₅, Tym [سکانس مربوط به ژن flic با سکانس‌های

Fli 15: CGGTGTTGCCAGGTTGGTAAT
 Tym: ACTCTTGCTGGCGGTGCGACTT
 و اندازه قطعه تکثیر شده (۲۷) ۵۵۹ bp به جای پرایمرهای ST₁₅, ST₁₁ بود. واکنش PCR با ۳۵ سیکل با مراحل باز شده DNA در درجه حرارت ۹۴ °C و ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمر در درجه حرارت ۵۶ °C و ۴۵ ثانیه و مرحله پلیمریزه شدن با درجه حرارت ۷۲ °C و ۳۰ ثانیه انجام شد. واکنش PCR در مرحله انتهاي با درجه حرارت ۷۲ °C و ۱۰ دقیقه صورت گرفت (۲۷). کلیه مراحل فوق برای نمونه‌های غنی شده در BPW در مدت زمان‌های ۸، ۱۲ و ۱۶ ساعت طی سه مرحله به طور جداگانه تکرار شد.

الکتروفورز نمونه‌های به دست آمده مرحله PCR: برای آماده کردن ژل آگاروز ۱/۵ گرم آگاروز به کمک حرارت در ۱۰۰ ml بافر 1x TAE حل شد. در حین سرد شدن ژل در دمای حدود ۶۰ °C - ۵۰ - مقدار ۲۵ μl ۲۵ اتیدیوم برماید به آن افزوده و در قالب ریخته شد. پس از بستن ژل در قالب، داخل تانک حاوی بافر 1x TAE قرار داده شد و به ۲۰ μl از هر کدام از نمونه‌های PCR شده در مرحله قبل، مقدار ۱۱۰ μl رنگ افزوده شد. سپس ۱۱۰ μl 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).

- ۱- یک میلی‌لیتر Lysis buffer به هر یک از لوله‌های حاوی غلظت‌های ۱۰^{-۱}, ۱۰^{-۲}, ۱۰^{-۳}, ۱۰^{-۴}, ۱۰^{-۵} عدد باکتری و نمونه شیرپاستوریزه تهیه شده از بازار مصرف و نمونه کنترل منفی افزوده شد.
 - ۲- ۱۰ دقیقه در ۶۵ °C انکوبه شد.
 - ۳- محلول به مدت ۳ دقیقه در ۱۳۰۰ rpm سانتریفوژ شد.
 - ۴- محلول رویی به یک تیوب تمیز انتقال داده شد.
 - ۵- ۱۰ میکرولیتر glass milk اضافه کرده، ۳۰ ثانیه ورتكس شد. (glass milk قبل از افزودن کاملاً مخلوط و یکنواخت شده بود).
 - ۶- ۱ ساعت در ۳۷ °C انکوبه شد.
 - ۷- ۱۰ دقیقه در ۶۵ °C انکوبه شد.
 - ۸- به مدت ۳ دقیقه در ۱۳۰۰ rpm سانتریفوژ شد.
 - ۹- محلول رویی دور ریخته شد. به رسوب باقیمانده ۲۰۰ میکرولیتر Lysis buffer ۲ افزوده شد. رسوب کاملاً شسته شد.
 - ۱۰- به مدت ۱ دقیقه در ۱۳۰۰ rpm سانتریفوژ شد. محلول رویی دور ریخته شد، رسوب باقیمانده، دوباره با ۲ Lysis buffer 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 ۱۱۰ μl آب دیونیزه افزوده شد تا رسوب حل شود.
 - ۱۴- سوسپانسیون ۲۰ دقیقه در ۵۶ °C قرار داده شد تا DNA glass milk جدا شده و در آب حل شود.
 - ۱۵- به مدت ۲ دقیقه در ۱۳۰۰ rpm سانتریفوژ شد.
 - ۱۶- محلول رویی، بدون مخلوط شدن با رسوب glass milk به یک تیوب تمیز انتقال داده شد.
 - ۱۷- ژنوم به دست آمده در ۴ °C نگهداری شد.
- روش PCR:** در ۷ لوله مخصوص PCR، مقدار ۴ μl از نمونه‌های استخراجی فوق ریخته شد و بقیه اجزای واکنش PCR افزوده شد. شامل: آب دیونیزه دو بار تقطیر ۳۴/۱ dNTP، ۱ میکرولیتر، بافر ۵ PCR(10X)، ۱/۵ میکرولیتر، میکرولیتر، ۱/۵ MgCl₂، آنزیم Taq polymerase و ۲ میکرولیتر از پرایمر ST₁₁ و ۰/۴ میکرولیتر از پرایمر ST₁₅ [سکانس عمومی مربوط به گونه‌های مختلف از پرایمر ST₁₅] سالمونلا با سکانس‌های



شکل ۱- الگوی الکتروفورز DNA استخراج شده از غلظت‌های متفاوت سالمونلاتیفی موریوم در مواد غذایی پس از ۸ ساعت غنی‌سازی در محیط BPW روی ژل آگاروز

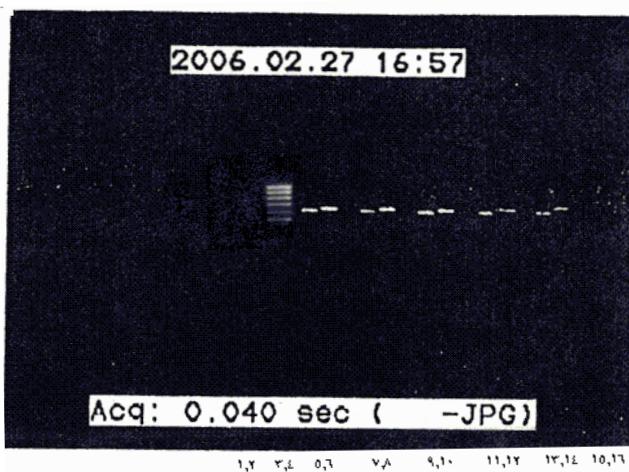
در شکل، به ترتیب از چپ به راست باندهای مربوط به جفت پرایمر ST_{11} و ST_{15} (اندازه قطعه تکثیر شده 429 bp) و جفت پرایمر Tym , Fli (اندازه قطعه تکثیر شده 559 bp) در نواحی ۵ و ۶ مربوط به غلظت 10^{-3} , در نواحی ۷ و ۸ مربوط به غلظت 10^{-2} , در نواحی ۹ و ۱۰ مربوط به غلظت 10^{-1} و سایز مارکر بین نواحی ۴ و ۵ مشاهده می‌شود. در نواحی ۱ و ۲ باندهای مربوط به نمونه شیر پاستوریزه تهیه شده از بازار مصرف و در نواحی ۴ و ۶ مربوط به نمونه BPW (کنترل منفی) و همچنین نواحی ۱۱ و ۱۲ مربوط به غلظت ۵، نواحی ۱۳ و ۱۴ مربوط به غلظت 10^{-1} و نواحی ۱۵ و ۱۶ مربوط به غلظت 10^{-1} که هیچ باندی مربوط به جفت پرایمر فوق مشاهده نمی‌شود.

الکتروفورز DNA های استخراج شده از نمونه های سالمونلاتیفی موریوم در شیر پس از ۱۲ ساعت غنی سازی: پس از قرار دادن ژل الکتروفورز شده زیر نور UV مربوط به نمونه های DNA استخراج شده از غلظت های 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} , ۵, 10^0 , 10^1 , 10^2 , 10^3 سالمونلا در شیر و نمونه شیر پاستوریزه تهیه شده از بازار مصرف و نمونه BPW (کنترل منفی) مشاهده شد. پس از ۱۲ ساعت غنی سازی می توان تا ۵ باکتری سالمونلاتیفی موریوم را که به صورت دستی به شیر اضافه شده بود با روش PCR تشخیص داد، اما هیچ گونه باندی در آلوودگی با غلظت های 10^{-1} , 10^0 , 10^1 , 10^2 , 10^3 باکتری سالمونلا و نمونه شیر پاستوریزه تهیه شده از بازار مصرف و نمونه BPW (کنترل منفی) مشاهده نشد (شکل ۲).

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

• یافته ها

الکتروفورز DNA های استخراج شده از نمونه های سالمونلاتیفی موریوم در شیر پس از ۸ ساعت غنی سازی: پس از قرار دادن ژل الکتروفورز شده زیر نور UV مربوط به نمونه های DNA استخراجی از غلظت های 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} , ۵, 10^0 , 10^1 , 10^2 , 10^3 عدد سالمونلا در شیر و نمونه شیر پاستوریزه تهیه شده از بازار مصرف و نمونه BPW (کنترل منفی) مشاهده شد پس از ۸ ساعت غنی سازی می توان تا 10^1 باکتری سالمونلاتیفی موریوم را PCR که به صورت دستی به شیر اضافه شده بود با روش تشخیص داد، اما هیچ گونه باندی در آلوودگی با غلظت های 10^{-1} , 10^0 , 10^1 , 10^2 , 10^3 باکتری سالمونلا و نمونه شیر پاستوریزه و نمونه شیر پاستوریزه (کنترل منفی) مشاهده نشد (شکل ۱).

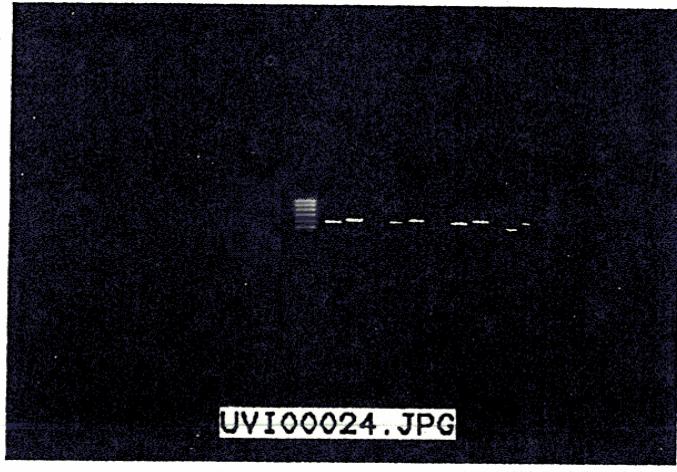


شکل ۳- الگوی الکتروفورز DNA استخراج شده از غلظت‌های متفاوت سالمونلا تیفی موریوم در مواد غذایی پس از ۱۶ ساعت غنی‌سازی در محیط BPW روی ژل آگاروز

در شکل به ترتیب، از چپ به راست، باندهای مربوط به جفت پرایمر ST₁₁ و ST₁₅ (اندازه قطعه تکثیر شده ۴۲۹bp) و جفت پرایمر Tym, Fli (اندازه قطعه تکثیر شده ۵۵۹bp) در نواحی ۵ و ۶ مربوط به غلظت ^{-۱}۱۰ ناحیه ۷ و ۸ مربوط به غلظت ^{-۱}۱۰، در نواحی ۹ و ۱۰ مربوط به غلظت ^{-۱}۱۰ نواحی ۱۱ و ۱۲ مربوط به غلظت ^{-۱}۱۰ و در نواحی ۱۳ و ۱۴ مربوط به غلظت ^{-۱}۱۰ نواحی ۱۵ و ۱۶ مربوط به غلظت ^{-۱}۱۰ 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 ^{-۱}۱۰ که هیچ باندی مربوط به جفت پرایمر فوق مشاهده نمی‌شود.

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 افتراکی بیوشیمیایی و سرولوژی: با استفاده از روش کشت معمول میکروبی و سپس روش‌های افتراکی 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 سالمونلاتیفی موریوم که به مدت ۸، ۱۲ و ۱۶ ساعت در محیط BPW غنی‌سازی شده قرار داشتند، مشخص شد که هیچ گونه آلودگی در



شکل ۲- الگوی الکتروفورز DNA استخراج شده از غلظت‌های متفاوت سالمونلا تیفی موریوم 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 ST₁₁ و ST₁₅ (اندازه قطعه تکثیر شده ۴۲۹bp) و جفت پرایمر Tym, Fli (اندازه قطعه تکثیر شده ۵۵۹bp) در نواحی ۵ و ۶ مربوط به غلظت ^{-۱}۱۰ ناحیه ۷ و ۸ مربوط به غلظت ^{-۱}۱۰، در نواحی ۹ و ۱۰ مربوط به غلظت ^{-۱}۱۰ نواحی ۱۱ و ۱۲ مربوط به غلظت ^{-۱}۱۰ 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 ۱۳ و ۱۴ مربوط به غلظت ^{-۱}۱۰ و ۱۶ مربوط به غلظت ^{-۱}۱۰ که هیچ باندی مربوط به جفت پرایمر فوق مشاهده نمی‌شود.

الکتروفورز DNA های استخراج شده از نمونه های سالمونلا تیفی موریوم در شیر پس از ۱۶ ساعت غنی‌سازی: پس از قرار دادن ژل الکتروفورز شده زیر نور UV مربوط به نمونه های DNA استخراج شده از غلظت های ^{-۱}۱۰^۳، ^{-۱}۱۰^۲، ^{-۱}۱۰^۱، ^{-۱}۱۰^۰ عدد سالمونلا در شیر و نمونه شیر پاستوریزه تهیه شده از بازار مصرف و نمونه BPW (کنترل منفی) مشاهده شد. پس از ۱۶ ساعت غنی‌سازی می‌توان تا یک باکتری سالمونلاتیفی موریوم را که به صورت دستی به شیر اضافه شده بود با روش PCR تشخیص داد، اما هیچ گونه باندی در آلودگی با غلظت ^{-۱}۱۰ باکتری سالمونلا و نمونه شیر پاستوریزه تهیه شده از بازار مصرف و نمونه BPW (کنترل منفی) مشاهده نشد (شکل ۳).

اختصاصی سالمونلا تیفی موریوم با ایجاد باند با اندازه bp (۵۵۹) قادر به ایجاد باند در شیرهای آلوده شده دستی به سالمونلا تیفی موریوم با حد شناسایی 10^{-1} باکتری با مدت زمان ۸ ساعت غنی‌سازی در BPW بودند. هیچ گونه باندی مربوط به هردو جفت پرایمر در نمونه شیر پاستوریزه 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 پاستوریزه 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 سالمونلاتیفی موریوم و نمونه‌های شیر پاستوریزه تهیه شده از بازار مصرف و نمونه کنترل منفی BPW 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 5×10^{-1} باکتری سالمونلاتیفی موریوم 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. حداقل مدت زمان مورد نیاز برای انجام PCR این آزمایش از شروع غنی‌سازی ۱۶ ساعته تا انجام 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 ۴۲۹ bp در ۱۴۴ گونه سالمونلا از تعداد کل ۱۴۶ گونه (۱۱۶ سرووار از ۱۱۸ سرووار) با اختصاصیت و ویژگی بالا برای تشخیص بیماری ناشی از سالمونلا در غذا بودند. (۲۲).

نمونه‌های شیر مورد مصرف در بازار مصرف مشاهده نمی‌شود. در حالی که وجود سالمونلاتیفی موریوم در نمونه‌های شیر آلوده شده با غلظت‌های مختلف سالمونلا طی مدت زمان ۴ الی ۵ 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 سالمونلاتیفی موریوم 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 (۱۷، ۱۸).

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 (۱۸-۳۶) در مقایسه با روش معمول کشت میکروبی (۱۵-۱۷) در تشخیص یک سرووار از سالمونلاهای آلوده کننده مواد غذایی به نام سالمونلا تیفی موریوم از نظر مدت زمان پاسخ‌دهی، دقت و حساسیت دو روش بررسی شدند. همچنین، نمونه‌های شیر پاستوریزه تهیه شده از بازار مصرف از نظر آلودگی به باکتری سالمونلاتیفی موریوم با دو روش فوق، مورد آزمایش قرار گرفتند.

در شکل ۱، الکتروفورز DNA‌های استخراج شده از نمونه‌های PCR شده مربوط به شیرهای آلوده شده دستی با غلظت‌های 10^{-1} تا 10^{-3} باکتری سالمونلاتیفی موریوم که ۸ ساعت در محیط کشت ST₁₁ غنی‌سازی شدند، نشان داده شده است. پرایمرهای ST₁₁ و ST₁₅ (پرایمرهای عمومی کلیه سالمونلاها با ایجاد باند با اندازه ۴۲۹ bp) و پرایمرهای Tym Fli₁₅ (پرایمرهای

۱۸). ضمناً این مطالعه مانشان داد که شیرهای پاستوریزه تهیه شده از بازار مصرف به سالمونلاتیفی موریوم آلوه نبودند.

بنابراین، نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که با روش PCR می‌توان طی مدت زمان حدود ۲۴ ساعت نسبت به شناسایی آلوهگی مواد غذایی مانند شیر به سالمونلاتیفی موریوم 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 بакتری سالمونلا در نمونه افزایش داد. در مقابل، انجام آزمایش با روش کشت معمول میکروبی برای شناسایی افتراقی سالمونلاتیفی موریوم 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 پژوهشی کشور انجام شد که به این وسیله از ریاست محترم مرکز و همکاران گرامی خانم‌ها چینه‌کش، درخشانی و افلاکی تقدیر و تشکر می‌شود.

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

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

• References

1. Le Minor L, Popoff MY, Laurent B, Hermant D. Individualization d'une septième sous-espèce de *Salmonella* *S. Choleraesuis* subsp. *Indica* subsp. nov. Annales de l'Institut 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. Pathogenicity of foodborne *Salmonella*. Int J Food Microbiol 1991; 12: 17- 40.
4. Krysinski EP, Heimisch RC. Use of enzyme labeled antibodies to detect *Salmonella* in foods. Appl Environ Microbiol 1977; 33: 947- 54.
5. Minnich S A, Hartman PA, Heimisch 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 biotinylated DNA probe for rapid routine identification of *Salmonella*. Mol Cell Probes 1988; 2: 271- 9.
10. Tsien 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.

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 selective 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. Probelia trade 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.