مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی
دوره نهم ، شماره سی و سوم-زمستان ۱۳۹۷

Research Article
مقاله تحقیقی

تشخیص مولکولی باکتری سالمونلا در نمونه‌های شترمرغ-شهرستان سیرجان به‌روش PCR

مریم حفیظی[۱]، بابک خیرخواه[۲]، جواد نصر،[۳] کیومرث امینی[۴*]

۱- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد سیرجان، دانشگاه آزاد اسلامی، سیرجان، ایران
۲- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران
۳- گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران
۴- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران

چکیده

سابقه و هدف: سالمونلوز یکی از بیماری‌های مهم مشترک بین انسان و حیوان است که پراکندگی جغرافیایی بسیار وسیعی دارد. از مهم‌ترین منابع آلودگی سالمونلا در انسان سبزی‌ها، فرآورده‌های لبنی، محصول‌های دریایی، مواد گوشتی به‌ویژه گوشت ماکیان، تخم-مرغ و فرآورده‌های جانبی آن‌ها است. روش‌های استاندارد مبتنی بر کشت باکتری برای تشخیص گونه‌های سالمونلا حساس ولی زمان‌بر است. PCR از حساسیت و دقت بالایی برای شناسایی عوامل عفونی برخوردار است. ژن *hilA* از ژن‌های رمز کننده پروتئین‌های تنظیم کننده نسخه‌برداری و از ژن‌های با حفاظت ژنتیکی بالا است که می‌توان از آن در جهت شناسایی سالمونلا بهره برد. هدف از این تحقیق، شناسایی باکتری سالمونلا در مدفوع شترمرغ بر پایه وجود ژن *hilA* به کمک روش PCR و بررسی اختصاصیت این روش در مقایسه با روش‌های متداول است.

مواد و روش‌ها: ۵۰۰ نمونه از مدفوع شترمرغ‌های منطقه سیرجان که پیش‌تر برای تشخیص سویه‌های سالمونلایی مورد بررسی کشت‌های افتراقی و تست‌های بیوشیمیایی قرار گرفته بود برای آزمون حضور ژن *hilA* استفاده شد. DNA باکتری‌ها از نمونه‌های مدفوع شترمرغ‌ها بعد از حل کردن مدفوع در محیط کشت و ۲۴ ساعت نگهداری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، استخراج گردید و به کمک PCR و استفاده از پرایمرهای اختصاصی جهت بررسی حضور ژن *hilA* مورد ارزیابی قرار گرفتند.

یافته‌ها: بررسی وجود ژن *hilA* از میان ۵۰۰ نمونه مدفوع نشان داد که در ۳۸ نمونه مدفوع، باکتری سالمونلا حضور دارد که با نتایج آزمون استاندارد برای شناسایی *سالمونلا* مطابقت داشت. قابل ذکر است که نتایج حاصل از بررسی ژن *hilA* در همان نمونه‌هایی مثبت بود که حضور باکتری سالمونلا قبلا توسط آزمون‌های استاندارد تأیید گردیده بود.

نتیجه‌گیری: نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهد که بررسی ژن *hilA* با استفاده از PCR و پرایمرهای اختصاصی می‌تواند روشی جایگزین با سرعت و دقت بالا و هزینه به‌نسبت پایین برای تشخیص باکتری سالمونلا در میان نمونه‌های مدفوع پرندگان باشد. با توجه به این‌که شیوع عفونت‌های سالمونلایی در میان پردنگان و ماکیان به‌نسبت بالا است شناسایی این عفونت‌ها با سرعت و دقت بالا اهمیتی ویژه‌ای دارد. این مطالعه نشان داد که بررسی ژن *hilA* با استفاده از روش PCR می‌تواند در این زمینه مؤثر باشد.

واژه‌های کلیدی: سالمونلا، شترمرغ، ژن *hilA*، *PCR*

مقدمه

یکی از بیماری‌های مهم عفونی مشترک بین انسان و حیوان سالمونلوز (Salmonellosis) است که گونه‌های مختلف *سالمونلا* از خانواده آنتروباکتریاسه (Enterobacteriaceae) می‌تواند باعث آن شود. *سالمونلا* باکتری میله‌ای، گرم منفی، غیرهاگزا است که به دو دسته بدون تاژک و تاژک‌دار تقسیم

نویسنده مسئول:
گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی ساوه، ساوه، ایران
پست الکترونیکی: dr_kumarss_amini@yahoo.com
تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱/۲۴
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۵/۱۷

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-27]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1397.9.33.3.7]

می‌شود. جنس *سالمونلا* دارای دو گونه بنگوری[1] و انتریکا[2] است. تاکنون بالغ بر ۲۷۰۰ سروتیپ مختلف از *سالمونلا* در نقاط مختلف دنیا شناسایی شده است (۱۱). پراکندگی جغرافیایی *سالمونلا* بسیار وسیع بوده و می‌تواند در طیف وسیعی از موجودهای زنده از جمله انسان باعث عفونت شود. از مهم‌ترین منابع آلودگی *سالمونلا* در انسان می‌توان به سبزی‌ها، فرآورده‌های لبنی، محصول‌های دریایی، مواد گوشتی به‌ویژه گوشت ماکیان، تخم مرغ و فرآورده‌های جانبی آن‌ها اشاره کرد (۲۱). پرندگان هم به عفونت‌های *سالمونلایی* حساس بوده و توسط گونه‌های مختلفی از این باکتری‌ها آلوده می‌شوند. سالمونلوز در شترمرغ‌ها باعث تلفات قابل توجه‌ای در گله‌های شترمرغ به‌مخصوص جوجه‌های کوچک‌تر از ۳ ماه می‌شود و از این طریق خسارهای چشم‌گیری را به اقتصاد کشور وارد می‌نماید (۲۲). شترمرغ از منابع مهم آلودگی به سروتیپ‌های *سالمونلا* به شمار می‌رود، به‌طوری‌که می‌تواند به‌صورت مستقیم و غیرمستقیم در آلودگی گله و به دنبال آن آلودگی انسان از طریق مصرف گوشت و تخم شترمرغ آلوده نقش داشته باشد. با توجه به نقش صنعت پرورش شترمرغ در تأمین احتیاج پروتئینی انسان و اینکه آلودگی *سالمونلایی* در شترمرغ به‌عنوان عامل بالقوه برای انتشار باکتری بین سایر گونه‌های حیوانی و انسان عمل می‌کند لذا شناسایی موارد الوده از اهمیت بسزایی برخوردار است (۴،۵،۲۲).

ژن *hilA* یکی از ژن‌های بیماری‌زای[3] *سالمونلا*ها است که با رمز نمودن پروتئین‌های تنظیم کننده نسخه‌برداری باعث بیان ژن‌های مهاجم در *سالمونلا* می‌شود (۱۱،۲۶). با بیان شدن و فعالیت ژن‌های مهاجم، زمینه نفوذ باکتری و استقرار آن در سلول‌های پوششی روده مهیا می‌گردد (۱۲،۱۵). *سالمونلا* به‌عنوان خطرناک‌ترین پاتوژن روده‌ای علاوه‌بر این‌که باعث تلفات قابل توجهی در مرغداری‌ها شده و از این طریق خسارت‌های چشم‌گیری را به اقتصاد کشور وارد می‌نماید در صورت انتقال به جوامع بشری هم می‌تواند سبب بروز ضررهای اقتصادی و بهداشتی فراوان گردد (۴).

گزارش‌های متعددی از اپیدمی‌های مربوط به سروارهای *انتریتیدیس* و *تیفی موریوم* در ایران انتشار یافته است (۲۵،۹). برای جلوگیری از انتشار *سالمونلا*، آلودگی باید خیلی سریع تشخیص داده شود. بنابراین دسترسی به سیستم‌های سریع، حساس و قابل اعتماد، که از لحاظ بین‌المللی قابل قبول باشد، برای تشخیص حضور یا عدم حضور بیماری‌زاها در صنعت غذایی و نیز نظارت‌های قانونی بسیار مهم است (۱۴).

روش‌های تشخیص *سالمونلا*ها بر اساس مدت زمان صرف شده برای تشخیص این میکروارگانیزم‌ها به دو گروه روش‌های متداول و روش‌های سریع طبقه‌بندی می‌شود. روش‌های کشت متداول به‌معمول به‌دلیل استفاده از مراحل پیش غنی‌سازی، غنی‌سازی و متعاقب آن استفاده از محیط‌های انتخابی و تفریقی و تأیید پرگنه‌های مشکوک با آزمایش‌های بیوشیمیایی و در نهایت سروتایپینگ، زمان بر بوده به‌طوری‌که به ۵ الی ۱۳ روز وقت نیاز است (۲۴،۲۳،۱۲). امروزه سعی بر این است که از روش‌های سریع اما حساس و با ویژگی بالا استفاده گردد. در حال حاضر توسعهٔ روش‌های زیست‌شناسی مولکولی این امکان را فراهم ساخته است که بتوان با این روش‌ها با دقت و سرعت زیاد به شناسایی عوامل بیولوژیک در نمونه‌های بالینی پرداخت. در این بین واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است. آزمایش‌های PCR متنوعی جهت تشخیص سریع *سالمونلا*ها در نمونه‌های بالینی و مواد غذایی استفاده شده است (۲۶،۱۷). در اغلب این روش‌ها قبل از انجام PCR یک مرحلهٔ غنی‌سازی به‌منظور بالا بردن حساسیت آزمایش پیشنهاد گردیده است. روش‌های گوناگونی از PCR جهت تأئید عامل بیماری‌زا عنوان و مطرح گردیده است (۱۷).

ژن *hilA* مورد ارزیابی در مطالعه حاضر از ژن‌های رمز کننده پروتئین‌های تنظیم کننده نسخه‌برداری و یکی از ژن‌های بسیار حراست شده است که می‌توان از آن در جهت تأیید باکتری *سالمونلا* بهره برد. در مطالعه‌های مختلفی که به بررسی ژن *hilA* در گونه‌های *سالمونلا* پرداخته شده نشان داده شده است که ژن *hilA* در همه آن‌ها حضور دارد (۱۸،۱۹،۱۷). از این‌رو در این تحقیق تشخیص مولکولی دقیق و سریع این باکتری با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *hilA* و روش PCR مورد ارزیابی قرار می‌گیرد.

روش کار

۵۰۰ نمونه از مدفوع شترمرغ‌های شهرستان سیرجان در استان کرمان توسط شرکت تحقیقاتی-پژوهشی پاسارگاد (ایران، تهران) مورد بررسی‌های کشت‌های افتراقی و تست‌های بیوشیمیایی جهت تشخیص سویه‌های *سالمونلایی* قرار گرفت. برای این منظور از نمونه‌های انتقال داده شده به آزمایشگاه در زیر هود و کنار شعله با رعایت اصول استریل بودن، در محیط

[1] *Salmonella bongori*
[2] *Salmonella enterica*
[3] Virulence gene

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-27]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1397.9.33.3.7]

غنی کنندهٔ راپاپورت واسیلیادیس (Rappaport Vassiliadis) (مرک، آلمان) کشت انجام شد و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴۱ درجه سلسیوس انکوبه گردید. پس از گذشت زمان موردنظر با استفاده از لوپ در محیط‌های انتخابی- افتراقی، *سالمونلا*- شیگلا آگار، کروم آگار *سالمونلا*، رامباخ و XLD[4] نمونه‌ها به‌صورت خطی کشت داده شدند. *سالمونلا*ها در محیط XLD ایجاد کلنی‌هایی با مرکز سیاه رنگ می‌کنند. بعد از گذشت ۲۴ ساعت تعدادی از پرگنه‌های سیاه رنگ به محیط‌های بیوشیمیایی نظیر TSI، اوره، سیمون سیترات، آبگوشت MR-VP و محیط SIM انتقال داده شدند و ارزیابی-های افتراقی صورت گرفت (۲۰،۲۱). همه محیط‌ها محصول شرکت مرک (آلمان) بودند.

- **استخراج DNA**

برای استخراج DNA از باکتری‌های موجود در مدفوع شترمرغ، ابتدا مدفوع با محیط کشت مایع BHI[5] با نسبت ۹:۱ رقیق شد و ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمادهی شد. سپس، باکتری‌ها با کمک سانتریفیوژ (۱۰ دقیقه، ۷۰۰۰g) رسوب داده شدند. استخراج DNA از رسوب باکتری به‌روش استخراج با کیت تجارتی وابسته به ستون تولید شده توسط شرکت پیشگامان انتقال ژن به شماره Cat No: 04050 طبق دستور کیت انجام گردید.

- **PCR** ژن ***hilA*** و نمایش قطعه ۸۴۵ بازی متعلق به آن

برای شناسایی ژن *hilA* از یک جفت پرایمر اختصاصی این ژن استفاده شد (۱۸). توالی پرایمر پیشرو عبارت بود از 5'- CGG AAG CTT ATT TGC GCC ATG CTG AGG TAG -3' و توالی پرایمر پیرو 5' - GCA TGG ATC CCC GCC GGC GAG ATT GTG -3' است. PCR انجام شده در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل پرایمر (از هر یک) ۵ پیکومول، آنزیم DNA Taq پلی‌مراز ۰/۵ واحد، ۰/۴ میکرولیتر dNTP ۰/۲ میلی‌مولار، ۲ میکرولیتر بافر ۱۰X، ۰/۵ میکرولیتر $MgCl_2$ ۲۵ میلی‌مولار، و مقدار ۱۰۰ میکروگرم DNA ژنومی باکتری اضافه شد. هم‌چنین شرح مراحل مختلف PCR طبق مطالعه اکبرمهر (۱) با کمی تغییر به این صورت است که ابتدا مرحله اولیه به مدت ۴ دقیقه در ۹۴ درجه سلسیوس برای واسرشت اولیه DNA انجام شد. سپس در ۳۰ چرخه متوالی مراحل PCR به این صورت انجام گرفت: مرحله واسرشت در دمای ۹۴ درجه سلسیوس برای ۱ دقیقه، مرحله اتصال پرایمر (Annealing) به توالی DNA هدف در دمای ۶۵ درجه سلسیوس به‌مدت ۱ دقیقه، مرحله ساخت (Extension) در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به‌مدت یک دقیقه. در انتها نیز یک مرحله به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به-منظور کامل شدن قطعه‌های نیمه ساخته انجام شد. سپس برای بررسی و تفکیک قطعه‌های ایجاد شده مقدار ۵ میکرولیتر از محصول PCR بر روی ژل ۱٪ آگارز برده شد و بعد از الکتروفورز توسط رنگ فلورسانس اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و آشکار سازی صورت گرفت. لازم به‌ذکر است که از DNA باکتری *سالمونلا* (*S. typhimurium* ATCC14025) به-عنوان کنترل مثبت استفاده شد و از DNA باکتری اشرشیا کولی استاندارد (*E. coli* ATCC25922) به‌عنوان کنترل منفی استفاده گردید.

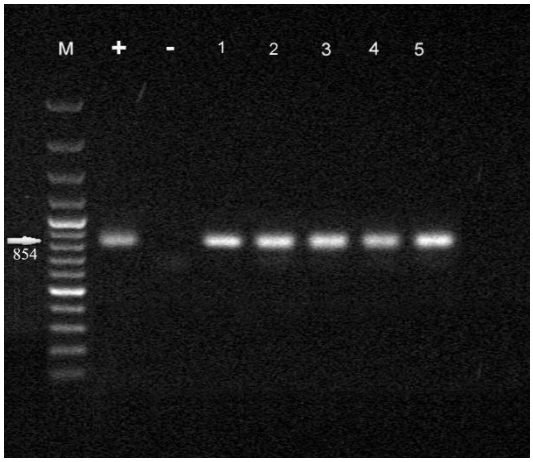
یافته‌ها

از بررسی ۵۰۰ نمونه مدفوع با استفاده از روش‌های کشت میکروبی و آزمون‌های بیوشیمیایی ۳۸ نمونه آلوده به باکتری *سالمونلا* به‌دست آمد که نشان از آلوده بودن ۷/۷ ٪ شترمرغ‌های این منطقه به *سالمونلا* دارد. هم‌چنین از بررسی ژن بیماری‌زای *hilA* توسط PCR در میان نمونه‌های مدفوع مشخص شد که ۳۸ نمونه از نظر وجود ژن مورد نظر مثبت هستندکه نشان دهنده حضور باکتری *سالمونلا* است. باند ۸۵۴ جفت بازی محصول PCR به‌دست آمده از پرایمرهای اختصاصی بیان‌گر وجود این باکتری در نمونه‌های بررسی شده بود. شکل ۱ تصویری از ژل الکتروفورز و محصول فرآیند PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای این ژن است که باند مورد نظر ۸۵۴ جفت بازی را نشان می‌دهد. جدول ۱ نیز فراوانی حضور *سالمونلا* در نمونه‌های مدفوع شترمرغ با دو روش کشت افتراقی و بررسی ژن *hilA* را نشان می‌دهد.

این نکته قابل ذکر است که برای نمونه‌هایی که حضور باکتری سالمونلا توسط آزمون‌های استاندارد در آن‌ها تأیید شده بود در بررسی ژن *hilA* توسط *PCR* نیز مثبت بودند که نشان از دقت و اختصاصیت این روش دارد.

[4] Xylose Lysine Deoxycholate
[5] Brain-heart infusion

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-27]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1397.9.33.3.7]



شکل ۱: ژل الکتروفورز PCR ژن *hilA* که حضور قطعه ۸۵۴ جفت بازی نشان از حضور این ژن و تأیید وجود باکتری *سالمونلا* دارد. چاهک های ۱ تا ۵ مربوط به نمونه‌های مدفوع دارای باکتری *سالمونلا* است. ستون M: مارکر (۱۰۰ جفت بازی)، چاهک +: کنترل مثبت (*S. typhimurium* ATCC 14025)، و چاهک کنترل منفی (*E. coli* ATCC25922) را نشان می‌دهد.

جدول ۱: تعداد و فراوانی *سالمونلا* در نمونه‌های مدفوع شترمرغ‌های سیرجان

تعداد نمونه‌های مدفوع بررسی شده	*تعداد (فراوانی٪) شناسایی سویه سالمونلا با کشت افتراقی*	*تعداد (فراوانی٪) شناسایی سویه سالمونلا با PCRژن hilA*
۵۰۰	۳۸ (٪ ۷/۷)	۳۸ (٪۱۰۰)

بحث

ژن *hilA* یکی از ژن‌های بیماریزای *سالمونلا*ها است که با رمز نمودن پروتئین‌های تنظیم کننده نسخه‌برداری باعث بیان ژن های مهاجم در *سالمونلا* می‌شود (۲۶،۷). با بیان شدن و فعالیت ژن‌های مهاجم، زمینه نفوذ باکتری و استقرار آن در سلول‌های پوششی روده مهیا می‌گردد (۸). با این حال اگرچه تکثیر این ژن به‌وسیله PCR به معنای فعالیت داشتن ژن نیست ولی حضور آن می‌تواند به‌عنوان نشانی از سویه‌های باکتری *سالمونلا* باشد.

توسعه روش‌های مولکولی برای بررسی و شناسایی سریع سویه‌های *سالمونلایی* با استفاده از آزمون ساده PCR براساس حضور ژن *hilA* بسیار ارزشمند است. در این پژوهش سعی شد تا با بررسی حضور این ژن در نمونه‌های حاوی *سالمونلا* تأیید شده توسط محیط کشت افتراقی و آزمون‌های بیوشیمیایی، علاوه‌بر تأیید درستی تشخیص آزمون‌های قبلی، تأیید و تأکید گردد که شناسایی اختصاصی ژن *hilA* به‌روش PCR می‌تواند در مقایسه با روش‌های کشت افتراقی و آزمون‌های بیوشیمیایی به‌عنوان روشی سریع، دقیق و کم هزینه‌تر جهت شناسایی آلودگی‌های سالمونلایی مورد استفاده قرار گیرد.

در مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۰ با استفاده از PCR، ژن *hilA* را در گوجه‌های آلوده به *سالمونلا* انتریکا سروار مونته‌ویدو (Montevideo) مورد شناسایی قرار دادند که نشان می‌داد ژن *hilA* ممکن است در دیگر سروارها جز تیفی‌موریوم حضور داشته باشد (۶). اگرچه تا سال ۲۰۰۲ بیماری‌زایی *سالمونلا* را به گونه انتریکا سروار تیفی‌موریوم مرتبط می‌دانستند اما در سال ۲۰۰۲ محققین با بررسی ژن *hilA* در سروارهای مختلف از باکتری *سالمونلا* و هم‌چنین چند باکتری غیر *سالمونلایی* نشان دادند که ژن مذکور اگرچه در باکتری‌های غیر *سالمونلایی* وجود ندارد ولی در همه سروارهای *سالمونلا* هست و می‌تواند به عنوان مارکری برای تشخیص جنس سالمونلا مورد استفاده قرار گیرد (۲۲). باند ۸۵۴ جفت‌بازی تکثیر یافته توسط PCR با توجه به اندازه قطعه، اختصاصی ژن *hilA* *سالمونلا* در نظر گرفته می‌شود (۱۸). در سال ۲۰۰۳ محققین نشان دادند که ژن *hilA* اختصاصی باکتری‌های *سالمونلا* است. آن‌ها حضور ژن *hilA* در میان ۳۳ نمونه *سالمونلا* از ۲۷ سروار مختلف و ۱۵ نمونه غیر *سالمونلا* از جنس‌های مختلف را بررسی کردند و نشان دادند که این ژن به‌طور اختصاصی در میان نمونه‌های *سالمونلا* وجود دارد. شناسایی این ژن به‌وسیله جفت پرایمر ذکر شده در این پژوهش نیز انجام گرفته است. این محققین نشان دادند که همه ۳۳ نمونه *سالمونلا* این ژن را دارند در حالی‌که هیچ‌یک از ۱۵ نمونه غیر *سالمونلایی* این ژن را نداشتند (۱۷). هم‌چنین اختصاصیت ژن *hilA* در بیماران مبتلا به تیفوئید و سالمنولوز در نمونه‌های خون و مدفوع به‌وسیله PCR مورد بررسی قرار گرفته است و نشان داده شده که این ژن با اختصاصیت کامل در نمونه‌های *سالمونلا* وجود دارد (۱۹). تحقیق حاضر نیز تأییدی بر یافته‌های این مطالعه‌ها است و تأیید می‌کند که ژن *hilA* در همه سویه‌های *سالمونلا* جضور دارد و می‌توان از این ژن به‌عنوان نشان‌گری برای تشخیص باکتری سالمونلا استفاده نمود.

عفونت‌های *سالمونلایی* در میان پرندگان شیوع فراوانی دارد. علاوه بر شترمرغ *سالمونلا* در کبوترها نیز وجود دارد و می‌تواند به‌طور مستقیم و غیر مستقیم باعث آلودگی‌های گله‌های طیور و به دنبال آن آلوده کردن انسان گردد (۵). محققین در سال

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-27]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1397.9.33.3.7]

۱۳۹۲ گزارش کردند که مدفوع ۰/۵ درصد از کبوترهای گرفته شده از شهرستان شهرکرد به *سالمونلا* آلوده هستند (۲). در مطالعه‌ای که توسط محققین در سال ۱۳۹۵ در رابطه با حضور باکتری *سالمونلا* در گوشت‌های عرضه شده در شهرکرد انجام گرفت نشان داد که از ۳۶۰ نمونه در ۵۴ مورد (۱۵٪) حضور باکتری *سالمونلا* در آن‌ها مثبت بوده است و در این میان گوشت مرغ با آلودگی ۳۱/۶۴ ٪ بیش‌ترین آلودگی در میان دیگر گوشت‌ها داشته است (۲۴). هم‌چنین، مطالعه دیگری در سال ۱۳۹۳ نشان داد که از میان نمونه گوشت‌های مرغ استان چهارمحال بختیاری ۴/۵ درصد آن‌ها به باکتری *سالمونلا* آلوده هستند. این مطالعه‌ها نشان می‌دهد که بررسی و شناسایی آلودگی *سالمونلایی* در میان پرندگان اهمیت به‌سزایی نشان می‌دهد (۱۷).

با توجه به این‌که مطالعه و بررسی سالمونلوز در میان شترمرغ‌ها بسیار محدود صورت گرفته است و هم‌چنین اهمیتی که پرورش شترمرغ در صنعت غذایی کشور دارد لذا بررسی فراوانی آلوده بودن گله‌های شترمرغ به *سالمونلا* حائز اهمیت است. با مقایسه فراوانی الودگی با باکتری *سالمونلا* در این مطالعه (۷/۷ ٪) و مطالعه‌های مشابه دیگر در ایران که نشان از آلودگی شترمرغ‌ها (۶/۶ ٪) (۱) و یا دیگر پرندگان با فراوانی‌های ۸/۶ ٪ (۲۲) و یا آلودگی منطقه‌ای ۱۵/۶ ٪ در استان فارس (۲۶) و یا در گوشت خام طیور (۱۷/۹ ٪) (۱۰) دارد بازگوکننده آلودگی نسبت زیاد پرندگان به *سالمونلا* است که به‌دلیل تهدید سلامت باید دام و ماکیان مورد ارزیابی مداوم قرار بگیرند.

با توجه به فراوانی بالای آلودگی پرندگان به باکتری *سالمونلا* بررسی حامل‌های منتقل کننده سالمونلا به پرندگان از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. این حامل‌ها می‌توانند شامل خزندگان به‌خصوص موش و رت که در مزارع پرورشی صنعتی بسیار دیده می‌شوند، باشند. هم‌چنین، بررسی حضور *سالمونلا* در علوفه‌های مصرفی پرندگان در مزارعی مثل ذرت، سویا، پودر گوشت و ماهی نیز درخور توجه است. به‌علاوه، با توجه به این‌که مراکز جوجه کشی تخم‌های نطفه‌دار را از مزارع مختلف تهیه می‌کنند، لذا این فرآیند می‌تواند به‌عنوان عاملی برای تبادل عوامل بیماری‌زا از جمه *سالمونلا* در مزارع آلوده باشد. بررسی این موارد می‌تواند به شناسایی و چرایی افزایش *سالمونلا* در میان پرندگان بپردازد.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه سعی شد تا با کمک روش PCR و پرایمرهای اختصاصی برای ژن *hilA* به بررسی حضور این ژن در میان نمونه‌های مدفوع شترمرغ‌های شهرستان سیرجان-کرمان پرداخته شود. به‌طورکلی نتایج این تحقیق هم‌راستا با مطالعه-های پیشین تأییدکننده حضور ژن *hilA* در تمامی سویه‌های *سالمونلایی* است و لذا پیشنهاد می‌دهد که آزمون مولکولی سنجش حضور ژن *hilA* برای تشخیص آلودگی به باکتری *سالمونلا* با دقت بالایی قابل اطمینان است. بنابراین، می‌توان با بررسی این ژن در تشخیص سریع سویه‌های باکتری *سالمونلا* در میان پرندگان ایران گام برداشت. با توجه به این که باکتری *سالمونلا* در میان پرندگان پرورش یافته به‌منظور تهیه گوشت و فرآورده‌های غذایی شیوع بالایی دارد، ارائه روشی برای بررسی سریع این باکتری اهمیت دارد. بنابراین، روش PCR برای شناسایی باکتری *سالمونلا* از نمونه‌های مستقیم مدفوع که در این مطالعه بررسی شد، پیشنهاد می‌شود.

سپاسگزاری

این مقاله بر اساس پایان نامه خانم مریم حفیظی نوشته شده است. هم‌چنین از توجه و همکاری معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی- واحد سیرجان کمال تشکر را اعلام می‌داریم. نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافعی ندارند.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-27]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1397.9.33.3.7]

منابع

1-Akbarmehr J. Isolation of Salmonella spp. from poultry (ostrich, pigeon, and chicken) and detection of their hilA gene by PCR method. African J Microbiol Res. 2010;4(24):2678–81.
2-Bahadaran Sh, Madreseh Sh, Salehi A. A survey of salmonella contamination in pigeons of Shahrekord district. JZR. 1392 1 (1)
3-Cardona-Castro N, Restrepo-Pineda E, Correa-Ochoa M. Detection of hilA gene sequences in serovars of Salmonella enterica sufigbspecies enterica. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002;97(8):1153–6.
4-Dobrogosz WJ, Peacock TJ, Hassan HM. Evolution of the probiotic concept: from conception to validation and acceptance in medical science. Adv Appl Microbiol. 2010;72:1–41.
5-Doyle MP, Buchanan RL. Food microbiology: fundamentals and frontiers. American Society for Microbiology Press; 2012. 187-219 p.
6-Gua X, Chen J, Beuchat LR, Brackett RE. PCR Detection of Salmonella entericaSerotype Montevideo in and on Raw Tomatoes Using Primers Derived from hilA. Appl Environ Microbiol. 2000;66(12):5248–52.
7-Hendriksen RS, Vieira AR, Karlsmose S, Lo Fo Wong DMA, Jensen AB, Wegener HC, et al. Global monitoring of Salmonella serovar distribution from the World Health Organization Global Foodborne Infections Network Country Data Bank: results of quality assured laboratories from 2001 to 2007. Foodborne Pathog Dis. 2011;8(8):887–900.
8-ISO 6579. 6579: 2002. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection of Salmonella spp. London: British Standard Institute; 2002.
9-Jafari F, Shokrzadeh L, Hamidian M, Salmanzadeh-Ahrabi S, Zali MR. Acute diarrhea due to enteropathogenic bacteria in patients at hospitals in Tehran. Jpn J Infect Dis. 2008;61(4):269–73.
10-Jalali M, Abedi D, Pourbakhsh SA, Ghoukasin K. Prevalence of salmonella spp. In raw and cooked foods in Isfahan-Iran. J food Saf. 2008;28(3):442–52.
11-Lostroh CP, Lee CA. The HilA box and sequences outside it determine the magnitude of HilA-dependent activation of P prgH from Salmonella pathogenicity island 1. J Bacteriol. 2001;183(16):4876–85.
12-Lucas RL, Lostroh CP, DiRusso CC, Spector MP, Wanner BL, Lee CA. Multiple Factors Independently RegulatehilA and Invasion Gene Expression in Salmonella enterica Serovar Typhimurium. J Bacteriol. 2000;182(7):1872–82.
13-Madadgar O, Salehi TZ, Tadjbakhsh H, Mahzounieh M, Feizabadi MM. Genomic and phenotypic evaluation of Salmonella typhimurium and Salmonella enteritidis in Iran. Comp Clin Path. 2008;17(4):229–35.
14-Malorny B, Bunge C, Guerra B, Prietz S, Helmuth R. Molecular characterisation of Salmonella strains by an oligonucleotide multiprobe microarray. Mol Cell Probes. 2007;21(1):56–65.
15-Malorny B, Hoorfar J, Bunge C, Helmuth R. Multicenter validation of the analytical accuracy of Salmonella PCR: towards an international standard. Appl Environ Microbiol. 2003;69(1):290–6.
16-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. JFM. 1393 1 (1):17-22
17-Pathmanathan SG, Cardona-Castro N, Sanchez-Jimenez MM, Correa-Ochoa MM, Puthucheary SD, Thong KL. Simple and rapid detection of Salmonella strains by direct PCR amplification of the hilA gene. J Med Microbiol. 2003;52(9):773–6.
18-Quinn PJ, Carter ME, Markey B, Carter GR. clinical Veterinary microbiology. Wolfe Publ London, UK. 1994;209–36.
19-Salehi TZ, Mahzounieh M, Saeedzadeh A. The isolation of antibiotic-resistant Salmonella from intestine and liver of poultry in Shiraz province of Iran. Int J Poult Sci. 2005 (4):320–2.
20-Sanchez-Jimenez MM, Cardona-Castro N. Validation of a PCR for diagnosis of typhoid fever and salmonellosis by amplification of the hilA gene in clinical samples from Colombian patients. J Med Microbiol. 2004;53(9):875–8.
21-Tirado C, Schmidt K. WHO surveillance programme for control of foodborne infections and intoxications: preliminary results and trends across greater Europe. J Infect. 2001;43(1):80–4.
22-Verwoerd DJ. Ostrich diseases. Rev Sci Tech. 2000;19(2):638–61.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-27]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1397.9.33.3.7]

23-Wray C, Wray A. Salmonella in domestic animals. Cabi; 2000.
24-Zahedi M, Rahimi E, Zahedi M, Momtaz H, Shojaii H. Prevalence of Salmonella enteritidis and S. typhimurium in marketed meat in Shahrekord in 2014. J Shahrekord Univ Med Sci. 2017; 19(2): 88-97.
25-Zahraei Salehi T. Salmonella. Tehran: Tehran University Press; 1999. 30-185 p.
26-Ziemer CJ, Steadham SR. Evaluation of the specificity of Salmonella PCR primers using various intestinal bacterial species. Lett Appl Microbiol. 2003;37(6):463–9.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-27]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1397.9.33.3.7]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1397.9.33.3.7]
[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-27]