مجله دنیای میکروب‌ها
سال ششم شماره اول (پیاپی ۱۴) بهار ۱۳۹۲
صفحات ۷۲-۶۲

Original Article

ردیابی مقایسه‌ای *سالمونلا* در نمونه‌های جوجه‌کباب جمع‌آوری شده از سطح تهران با سه روش مولکولی، کشت و الایزا

محسن حسین پور[۱]، آذر سبکبار*[۲]، امیر بختیاری[۱]، شهناز پارسا[۳]

[۱] کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، گروه میکروب شناسی، [۲] دانشیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، گروه میکروب شناسی،
[۳] استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، گروه میکروب شناسی

چکیده

سابقه و هدف: *سالمونلا* یکی از مهم ترین عوامل ایجاد کننده مسمومیت های غذایی در انسان است. استفاده از روش های استاندارد کشت برای تشخیص و جداسازی *سالمونلا* و نیز ارزیابی خصوصیات باکتری از طریق آزمون های بیوشیمیایی و سرولوژی به صرف ۴ تا ۷ روز زمان، دقت و مهارت کاربر و کیفیت محیط‌های کشت نیازمند است. این مطالعه با هدف ارزیابی روش مولکولی PCR برای ردیابی سریع *سالمونلا* در نمونه‌های گوشت جوجه کباب و مقایسه کیفیت آن با دو روش الایزا و کشت استاندارد انجام شد.

مواد و روش ها: این پژوهش به صورت مقطعی – توصیفی بر روی ۶۰ نمونه جوجه کباب جمع آوری شده از فروشگاه‌های سطح شهر تهران انجام شد. فراوانی *سالمونلا* در این نمونه ها با استفاده از سه روش میکروبیولوژی (کشت و آزمون های بیوشیمیایی)، الایزا (کیت SAL-VIA96, TECRA) و PCR (تکثیر ژن *invA*) مورد بررسی قرار گرفت. همچنین دقت، حساسیت و ویژگی سه روش با یکدیگر مقایسه گردید.

یافته ها: از مجموع نمونه های مورد بررسی فراوانی *سالمونلا* بر اساس سه روش کشت، الایزا و PCR به ترتیب ۵۵٪، ۴۷٪ و ۶۵٪ بود. نتایج نشان داد که با استفاده از روش PCR و پرایمرهای *invA* تنها با یک مرحله غنی‌سازی اولیه ۲۰ساعته در محیط BPW می توان در مدت ۲۴ تا ۳۰ ساعت با حساسیت و ویژگی ۱۰۰٪ وجود *سالمونلا* را در نمونه غذایی مشخص نمود.

نتیجه گیری: نتایج این پژوهش نشان داد که تکنیک PCR کفایت و حساسیت لازم به منظور پایش سریع *سالمونلا* را دارد. از این رو استفاده از این روش برای ارزیابی وجود *سالمونلا* در مواد غذایی پیشنهاد می گردد.

واژگان کلیدی: *سالمونلا*، الایزا، واکنش‌زنجیره‌ای پلی مراز، *invA*

دریافت مقاله: آبان ماه ۹۱ پذیرش برای چاپ: بهمن ماه ۹۱

مقدمه

حدود ۴۰ درصد از کل مسمومیت‌های غذایی را جنس *سالمونلا* (*Salmonella*) ایجاد می نماید. عمده‌ترین مواد غذایی مسئول در انتقال *سالمونلا* در کشور ایران تخم‌مرغ و گوشت مرغ می‌باشد. گزارش سازمان بهداشت جهانی نشان می‌دهد که در کشورهای در حال توسعه هر ساله از هر ۱۰۰۰ نفر، ۵ مورد ابتلا به *سالمونلا* دیده می شود. همچنین از میان ۱۶ میلیون بیمار مبتلا به تب تیفوئید، ۶۰۰ هزار نفر در اثر این بیماری جان خود را از دست می دهند (۱).

سالمونلا به خانواده انتروباکتریاسه (Enterobacteriacea) تعلق دارد، اما جزو فلور طبیعی روده انسان یا حیوان محسوب

*) آدرس برای مکاتبه: کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، گروه میکروبیولوژی
تلفن: ۰۹۱۲۵۱۷۹۴۱۷ پست الکترونیک: sabokbar@kiau.ac.ir

نمی‌شود. این باکتری در انسان بیماری‌های مختلف و گاهاً خطرناکی از جمله تب روده (حصبه و شبه حصبه)، عفونت خون و مسمومیت‌های غذایی را ایجاد می نماید (۵-۲). *سالمونلا تیفی* (*Salmonella typhi*) و *سالمونلا پاراتیفی* (*Salmonella paratyphi*) عامل ایجاد تب‌روده محسوب می‌شوند در حالی که *سالمونلا کلراسوئیس* (*Salmonella choleraesuis*) توانایی زیادی در انتشار به درون سیستم گردش خون دارد و عفونت خونی خطرناکی را ایجاد می‌کنند (۶). از عوامل بیماریزایی *سالمونلا* می‌توان به زنده ماندن و تکثیر آنها در درون ماکروفاژها اشاره نمود. از طرفی سیستم ترشحی نوع III که در غشای باکتری قرار دارد، مواد سمی باکتری را به درون سیتوزول سلول میزبان منتقل می نماید (۷). همچنین این باکتری در روده انتروتوکسین و سیتوتوکسین هایی را تولید می‌کند که برای سلول‌های میزبان آسیب‌زا هستند. از نظر واکنش‌های سرولوژی، امروزه نزدیک به ۲۵۰۰ سروتایپ از *سالمونلا* شناسایی شده است. اما آخرین طبقه‌بندی جنس *سالمونلا*، آنها را به دو گونه *انتریکا* (*Enterica*) و *بونگوری* (*Bungori*) تقسیم می‌کند. از این میان گونه *بونگوری* تنها از یک زیرگونه بونگوری تشکیل شده است اما گونه *انتریکا* به ۶ زیرگونه شامل *انتریکا* (*Enterica*)، *سلامه* (*Salamae*)، *آریزونا* (*Arizonae*)، *دی‌آریزونا* (*Diarizonae*)، *هوتنا* (*Houtenae*) و *ایندیکا* (*Indica*) تقسیم شده است. تقریباً ۹۹/۵٪ از *سالمونلاهای* جداسازی شده از انسان‌ها جزو سروتایپ *سالمونلا انتریکا* هستند (۸).

ویژگی های میکروسکوپی، ماکروسکوپی و خواص بیوشیمیایی در کنار آزمون‌های سرولوژی، برای شناسایی و تشخیص *سالمونلاها* از دیگر باکتری‌ها استفاده می گردد. اما امروزه روش میکروبیولوژی مبتنی بر کشت مطمئن‌ترین طریق برای ردیابی و نشان‌دادن حضور *سالمونلا* در مواد غذایی محسوب می‌شود. زیرا از این طریق اول این که باکتری‌های زنده دارای توانایی رشد ردیابی می‌شوند و دوم این که امکان ارزیابی‌های بیشتر با روش‌های بیوشیمیایی و سرولوژی برای رسیدن به نتیجه مثبت قطعی فراهم می‌گردد. با این وجود این روش وقت گیرمی باشد و برای رسیدن به جواب نهایی به ۴ تا ۷ روز زمان نیاز است.

استفاده از روش الایزا برای ردیابی *سالمونلا* در مواد غذایی کارایی گسترده‌ای یافته است و حساسیت و ویژگی مناسبی را ارائه می نماید. بر این اساس انواع کیت‌های معتبر الایزای مورد تأیید سازمان‌های استاندارد جهانی به منظور کاربردهای قانونی تولید و عرضه شده اند. اما خریداری کیت های تجاری معتبر نیازمند صرف هزینه‌های بالایی است.

کشف و ابداع روش‌های مولکولی راه‌های سریع‌تری را برای ردیابی باکتری‌های بیماری زا ایجاد نموده است. روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)، که براساس پدیده طبیعی تکثیر DNA در سلول‌ها استوار شده است، از نظر تئوری امکان ردیابی حتی یک سلول باکتری را در نمونه فراهم می نماید. زیرا با استفاده از این روش یک نسخه از ژن در عرض چند ساعت به بیش از یک میلیارد کپی تبدیل می‌شود که ردیابی بعدی آنها را آسان‌تر می‌کند. انواع روش‌های PCR برای ردیابی DNA ژنومی باکتری‌ها به‌کار برده شده‌است و نتایج خوبی نیز به همراه داشته است (۱۲-۹).

اگرچه تاکنون انواع روش‌های PCR برای ردیابی *سالمونلاها* به کار برده شده است، اما در بیشتر آنها نمونه های مورد بررسی از محیط‌های غنی‌سازی انتخابی گرفته شده اند. از آنجایی که انجام مراحل غنی‌سازی غیرانتخابی و انتخابی، نیازمند صرف چندین روز وقت است، در مطالعه حاضر برای رسیدن به کوتاه‌ترین زمان ممکن در دستیابی به نتایج قطعی از محیط پیش‌غنی‌سازی BPW (Buffered Peptone Water) استفاده گردید. هدف از این پژوهش، ارزیابی روش مولکولی PCR برای ردیابی سریع (۲۴ ساعته) *سالمونلا* در نمونه‌های گوشت جوجه کباب جمع‌آوری شده از سطح شهر تهران و نیز مقایسه کیفیت آن با دو روش الایزا و کشت استاندارد بود.

مواد و روش‌ها

این پژوهش به صورت مقطعی- توصیفی بر روی ۶۰ نمونه جوجه کباب جمع آوری شده از فروشگاه‌های سطح شهر

تهران درشرایط استاندارد انجام شد. فراوانی *سالمونلا* در این نمونه ها با استفاده از سه روش کشت، الایزا و PCR مورد بررسی قرار گرفت. همچنین دقت، صحت و اعتبار سه روش با یکدیگر مقایسه گردیدند.

الف) روش میکروبیولوژی: ردیابی *سالمونلاها* در مواد غذایی با روش میکروبیولوژی براساس روش پیشنهادی استاندارد ملی ایران در ۵ مرحله به شرح زیرانجام گرفت (۱۳):

۱- پیش‌غنی‌سازی غیرانتخابی با استفاده از محیط پپتون واتر بافری شده (BPW).

۲- غنی‌سازی انتخابی با استفاده از دو محیط آبگوشت تتراتیونات نووبیوسین (T.T.n) و آبگوشت راپاپورت واسیلیادیس منیزیوم کلراید/ سبز مالاشیت سویاپپتون (RVS).

۳- جداسازی با استفاده از محیط آگار انتخابی شامل سالمونلا- شیگلا آگار (SSA) و آگار سبز درخشان/ قرمز فنل (PR/BGA).

۴- تعیین هویت بیوشیمیایی با استفاده از آزمون‌های، محیط سه‌قندی آهن‌دار (TSI)، محیط لیزین دکربوکسیلاز آهن‌دار (LIA)، محیط اوره آگار، محیط تعیین سولفیدهیدروژن- اندول و حرکت (SIM)، محیط متیل‌رد- وژپروسکوئر (MR-VP).

۵- ارزیابی سرولوژیک با استفاده از آنتی‌سرم‌های معتبر A تا D بر علیه سالمونلا .

ب) روش الایزا: به منظور شناسایی *سالمونلاها* با روش الایزا از کیت SAL-VIA96, Tecra استفاده گردید. این کیت از روش ساندویچ الایزا تبعیت می‌کند که در آن آنتی‌بادی اول (اختصاصی *سالمونلا*) به سطح چاهک پلیت الایزا تثبیت‌شده است و از آن برای جذب و نگهداری آنتی‌ژن‌های *سالمونلایی* استفاده می‌شود. مراحل تست مطابق با دستورالعمل کیت انجام شد. سپس جذب نوری محلول رنگی ایجاد شده با دستگاه الایزا خوان در طول موج ۴۱۰ نانومتر در مقابل طول موج رفرانس ۴۹۰ نانومتر قرائت و ثبت گردید. براساس توصیه شرکت عرضه‌کننده کیت، جذب نوری مساوی یا بالاتر از ۰/۳ از نظر حضور *سالمونلا* مثبت و مقادیر پایین‌تر از ۰/۳ به عنوان منفی تلقی شدند.

ج) روش PCR: در ابتدا به منظور استخراج DNA، سوسپانسیون باکتریایی تهیه شده در آب مقطر به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه در داخل آب جوش (۹۵ °C) قرار گرفت. پس از یک مرحله سانتریفیوژ به مدت ۳ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰، محلول رویی به عنوان منبع DNA برای PCR مورد استفاده قرار گرفت. در مواقعی که نمونه باکتری از محیط کشت حاوی مواد پروتئینی (مثلاً محیط BPW) برداشته می‌شد یک مرحله سانتریفیوژ ۳۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه برای حذف مواد محیط استفاده گردید. به منظور تکثیر توالی ژن *invA* از پرایمرهای اختصاصی: F :5- GTGAAATTATCGCCACGTTCGGGCAA-3 و R:5-TCATCGCACCGTCAAAGGAACC-3 استفاده گردید (۱۴ و ۱۵). واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۵ میکرولیتر DNA ی الگو، ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر، ۰/۵ میکرولیتر dNTP Mix (100µM)، ۰/۸ میکرولیتر ($MgCl_2$ (50mM، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase و ۱۵ میکرولیتر D.D.W انجام گردید. در ادامه واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (Vereti, applied biosystems، کشور آمریکا) با شرایط دمایی ۳ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۵۹ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه و در نهایت طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. محصولات PCR به ژل آگاروز ۱/۵ درصد واجد اتیدیوم برماید منتقل و الکتروفورز گردیدند گرفت. از باکتری های *سالمونلا تیفی‌موریوم* (ATCC:14028) به عنوان کنترل مثبت و *اشریشیا کلی* (ATCC:25922) به عنوان کنترل منفی استفاده گردید.

د) تعیین حد ردیابی روش PCR: هدف از تعیین حد ردیابی (Detection limit of assay) تعیین کمترین تعداد از باکتری (*سالمونلا*) است که با روش ردیابی به نتیجه مثبت منجر می‌گردد و نتیجه آن به صورت تعداد باکتری در حجم یا وزن مشخص از نمونه گزارش می‌گردد (cfu/ml sample). برای این منظور از روش تهیه رقت‌های تدریجی استفاده گردید. بدین ترتیب که از کشت خالص *سالمونلا* با استفاده از آب استریل

دیونیزه، سوسپانسیونی با غلظت 10^7 سلول در میلی‌لیتر تهیه گردید. سپس با استفاده از آن رقت‌های حاوی 10^1 تا 10^6 سلول باکتری در میلی‌لیتر آماده گردید. در ادامه باکتری‌های موجود در ۱ میلی‌لیتر از هر کدام از سوسپانسیون‌ها به ۵۰ میکرولیتر رسانده شده و برای به‌دست آوردن نمونه DNA به روش جوشاندن استفاده گردید. ۵ میکرولیتر از محلول نهایی (حاوی DNA) به لوله واکنش PCR اضافه گردید. نسبت ۱:۱۰ در محاسبه نهایی در نظر گرفته شد.

ه) تعیین دقت، حساسیت و ویژگی سه روش (مقایسه‌ای یا نسبی): برای تعیین پارامترهای دقت، حساسیت و ویژگی با سه روش ردیابی، مطابق با جدول ۱ اقدام گردید. بدین صورت که نمونه‌هایی از گوشت جوجه‌کباب که با هر سه روش کشت، الایزا و PCR نتایج منفی داشتند انتخاب گردیدند. پس از هموژن کردن به ۱۰ قسمت مساوی به وزن ۲۵ گرم تقسیم شدند. ۵ قسمت برای تعیین ویژگی در نظر گرفته شدند و با ۱۰ میلیون باکتری از گونه های *اشریشیا کلی* (ATCC:25922)، *پروتئوس ولگاریس* (ATCC:49990)، جنس های *پروویدنشیا* (ATCC:33672)، *شیگلا* (ATCC:12022) و *سیتروباکتر* (ATCC:8090) آلوده شدند. ۵ قسمت دوم برای ارزیابی حساسیت در نظر گرفته شدند و با ۱۰ میلیون باکتری از ۵ سویه استاندارد *سالمونلا* (ATCCs:9068,14028,13314,23564,51741) تهیه شده از شرکت سیناژن مخلوط گردیدند. سپس ۵ رقت متوالی ۱:۱۰ تا ۱:۱۰۰۰۰۰ از هر ۱۰ نمونه با استفاده از آب پپتونه بافردار تهیه شد. بدین ترتیب ۲۵ نمونه مثبت قطعی و ۲۵ نمونه منفی قطعی حاصل شد که پس از ۱ ساعت گرم خانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، مانند نمونه‌های مورد پژوهش با آنها رفتار شد.

و) آنالیز آماری: در این مطالعه برای محاسبه دقت، حساسیت و ویژگی سه روش ردیابی و تعیین هویت *سالمونلا* از فرمول‌های توصیه شده توسط کمیسیون اروپایی برای تعیین کیفیت روش‌های تشخیصی استفاده گردید (۱۶). به منظور مقایسه نتایج حاصل از سه روش ردیابی از نسخه شانزدهم نرم افزار SPSS و آزمون آماری مربع کای استفاده گردید.

یافته ها

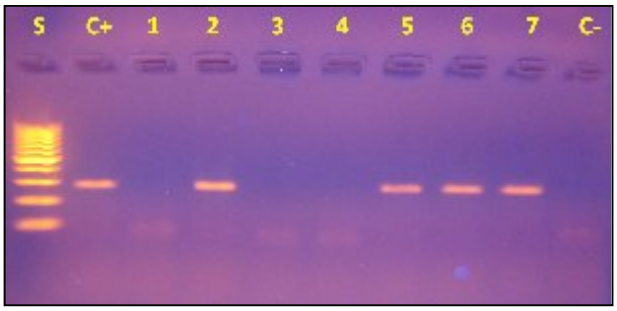
در مجموع از میان ۶۰ نمونه جوجه‌کباب، با روش میکروبیولوژی ۳۳ نمونه (۵۵٪) آلوده به *سالمونلا* گزارش گردید. در مرحله بعدی بر اساس نتایج مثبت به دست آمده از روش PCR، ۶ نمونه منفی مرحله اول مجدداً با شرایط زمانی و دمایی جدید ارزیابی شدند. بدین معنی که با نمونه‌گیری مجدد از آب پپتون ذخیره شده، مراحل کشت تکرار گردید که از ۶ مورد نتیجه منفی اولیه هر ۶ مورد به نتیجه مثبت منتهی شدند. در مجموع ۲۸ مورد (۴۶٪) از ۶۰ نمونه جوجه‌کباب با روش ردیابی الایزا مثبت شناخته شدند. یکی از نتایج مثبت کاذب بود و در روش میکروبیولوژی و PCR این نمونه به عنوان منفی شناخته بود. بر اساس نتایج نهایی، ۱۱ مورد از نمونه‌ها، با وجود داشتن *سالمونلا*، با روش الایزا نتیجه منفی داده بودند (منفی کاذب).

از مجموع نمونه های مورد بررسی تعداد ۳۹ مورد (۶۵٪) با روش PCR آلوده به *سالمونلا* شناخته شدند. تمامی نتایج مثبت PCR با روش میکروبیولوژی تأیید شدند. بدین معنی که نهایتاً سالمونلای جدا شده با روش میکروبیولوژی با استفاده از ویژگی های بیوشیمیایی و سرولوژی آنها تایید گردید.

جدول ۱: فرمول‌های مورد استفاده برای محاسبه دقت، حساسیت و ویژگی سه روش مورد ارزیابی

ویژگی	حساسیت	دقت
$Specificity\ (SP) = \frac{TN}{TN + FP}$	$Sensitivity\ (SE) = \frac{TP}{TP + FN}$	$Accuracy\ (AC) = \frac{TP + TN}{TP + TN + FP + FN}$

** AC: دقت، SE: حساسیت، SP: ویژگی، TP: مثبت واقعی، TN: منفی واقعی، FP: مثبت کاذب، FN: منفی کاذب



شکل ۱: الکتروفورز محصولات PCR حاصل از نمونه‌های جوجه کباب. S) مارکر DNA (۱۰۰ جفت باز)، C+) کنترل مثبت (*سالمونلا تیفی‌موریوم*)، ستون‌های ۱، ۳، ۴) نمونه های منفی، ستون های ۲، ۵، ۶ ، ۷) نمونه های مثبت *سالمونلا*، C-) کنترل منفی (*اشریشیا کلی*).

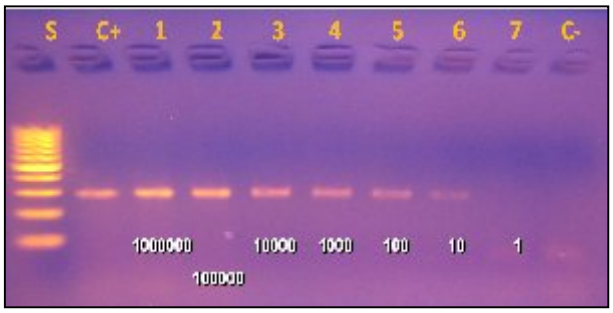
در شکل ۱ شمای الکتروفورز مربوط به ارزیابی ۷ مورد از نمونه‌های جوجه‌کباب نشان داده شده است.

شکل ۲ محصولات حاصل از PCR انجام شده بر روی رقت‌های مختلف حاوی ۱۰ میلیون تا ۱ نسخه از DNA *سالمونلا* را به منظور ارزیابی آخرین حد ردیابی روش PCR نشان می دهد. نتایج نشان داد که روش PCR می تواند وجود ۱۰ باکتری را به وضوح ردیابی کرده و تشخیص دهد. از آنجایی که در این روش تنها ۵ میکرولیتر از ۵۰ میکرولیتر نمونه DNA استخراج شده مورد استفاده قرار گرفت، بنابراین آخرین حد ردیابی را بر اساس شرایط یاد شده می‌توان ۱۰۰ سلول باکتری در میلی‌لیتر از نمونه تعیین نمود.

با روش PCR در ۶۵٪ از نمونه‌ها *سالمونلا* شناسایی شد. اما میزان شناسایی باکتری با روش های کشت و الایزا به ترتیب ۵۵٪ و ۴۷ ٪ بود (جدول ۲). مقایسه آماری نتایج حاصل از سه روش کشت، الایزا و PCR با آزمون مربع کای نشان

جدول ۲: مقایسه سه روش ردیابی *سالمونلا* در نمونه های جوجه‌کباب

نتایج آزمون	PCR	الایزا	کشت
	(درصد) تعداد	(درصد) تعداد	(درصد) تعداد
مثبت	۳۹ (٪۶۵)	۲۸ (٪۴۷)	۳۳ (٪۵۵)
منفی	۲۱ (٪۳۵)	۳۲ (٪۵۳)	۲۷ (٪۴۵)
جمع	۶۰ (٪۱۰۰)	۶۰ (٪۱۰۰)	۶۰ (٪۱۰۰)
مثبت کاذب	۰	۱ (٪۶/۱)	۰
منفی کاذب	۰	۱۱ (٪۱۸)	۶ (٪۱۰)



شکل ۲: الکتروفورز محصولات PCR. نمونه های حاوی ۱ تا ۱ میلیون باکتری *سالمونلا تیفی‌موریوم*.

دهنده اختلاف معنی‌دار بین سه روش مورد بررسی در تعیین نتایج مثبت از نمونه‌های جوجه‌کباب می‌باشد ($p<0/001$). در جدول ۳ نتایج ارزیابی پارامترهای صحت، حساسیت و ویژگی سه روش مورد بررسی، به منظور ردیابی *سالمونلا* در مورد ۲۵ نمونه منفی قطعی و ۲۵ نمونه مثبت قطعی نشان داده شده است.

بحث

سالمونلا یکی از باکتری‌های بیماری زای آلوده‌کننده مواد غذایی است و نتایج این تحقیق نشان دهنده شیوع بالای (٪۶۵) *سالمونلا* در گوشت جوجه‌کباب جمع‌آوری شده از فروشگاه‌های سطح تهران می‌باشد. در جامعه ایران گوشت مرغ مصرف فراوانی دارد و آلودگی این ماده غذایی به باکتری‌های بیماری زایی همچون *سالمونلا* به معنی شیوع مسمومیت‌های غذایی آشکار و پنهان در میان افراد جامعه می باشد. که این امر منجر به یک خطر بهداشتی و ضررهای جبران ناپذیر دیگری می گردد (۱۳).

اولین قدم در راه حل مشکل، شناخت دقیق ابعاد و جزئیات آن است. بدون ارزیابی دقیق میزان شیوع *سالمونلا* در گوشت ماکیان و تخم‌مرغ نمی‌توان به ابعاد مساله پی برد و برای شناسایی منابع آلودگی روشی سریع، حساس و دقیق لازم است تا بتواند با دقت و سرعت بالا وجود *سالمونلا* را در مواد غذایی نشان دهد. سرعت تشخیص یا به‌عبارتی عامل زمان برای پیشگیری از فاجعه درحال وقوع ناشی از همه‌گیری سالمونلوز فاکتور بسیار مهمی است و می‌تواند منجر به قطع به موقع چرخه عفونت در جامعه گردد. روش سنتی تشخیص بر

جدول ۳: دقت، حساسیت و ویژگی سه روش کشت، الایزا و PCR

نتایج آزمون	PCR	الایزا	کشت
مثبت واقعی	۲۵	۱۸	۲۴
منفی واقعی	۲۵	۲۵	۲۵
مثبت کاذب	۰	۰	۰
منفی کاذب	۰	۷	۱
جمع	۵۰	۵۰	۵۰
دقت	٪۱۰۰	٪۸۶	٪۹۸
حساسیت	٪۱۰۰	٪۷۲	٪۹۶
ویژگی	٪۱۰۰	٪۱۰۰	٪۱۰۰

غنی‌سازی اولیه نمونه و بر استفاده از محیط های کشت اختصاصی برای حذف باکتری‌های همراه استوار است و برای تشخیص قطعی کلنی‌های خالص باکتریایی از خصوصیات بیوشیمیایی و تست‌های سرولوژی استفاده می‌شود (۱۳).

با توجه به پیشرفت‌هایی که در عرصه ارتباطات و تجارت رخ نموده است زمین به یک دهکده جهانی تبدیل شده است و شیوع چندین همه‌گیری از عفونت‌ها و مسمومیت های سالمونلایی در دهه‌های اخیر، دانشمندان را نسبت به احتمال وقوع همه‌گیری‌های جهانی آن بیمناک کرده است. محققین به دنبال ابداع روش‌هایی برای شناسایی سریع و به موقع *سالمونلا* در مواد غذایی هستند و معرفی روش‌های جدید مولکولی امیدهایی را در جهت نیل به این هدف به‌وجود آورده است. از جمله روش‌های جدید برای ردیابی *سالمونلا* می‌توان به روش الایزا، که بر جستجوی آنتی‌ژن‌های باکتری استوار است و روش ردیابی قطعات ژنومی باکتری با PCR اشاره نمود. محققین در طی ارزیابی‌های خود به سرعت و دقت بالای روش‌های جدید نسبت به روش قدیمی میکروبیولوژی اشاره کرده‌اند که تاریخچه‌ای از این نوع ارزیابی‌ها در ادامه بحث مطرح می‌شوند.

روش الایزا حساسیت و ویژگی قابل قبولی را برای ردیابی *سالمونلا* در مواد غذایی ارائه می‌دهد و کیت‌های تجارتی عرضه شده در این عرصه تشخیصی امروزه به عنوان یک روش غربالگری معتبر در اقدامات کنترلی سازمان های بهداشتی برای خط تولید کارخانه‌های تولید محصولات غذایی گنجانده شده‌است. در سال ۱۹۸۹ محققان از روش الایزا برای شناسایی *سالمونلا* در نمونه مواد غذایی استفاده نمودند (۱۸). کمترین حد ردیابی این روش 10^{5}–10^{4} ۵ سلول در میلی‌لیتر بوده است و مدت لازم برای غنی سازی در این روش ۲۴ ساعت در نظر گرفته شد. در سال ۲۰۰۷ کومار (Kumar) از روش الایزا برای ردیابی *سالمونلا* در غذاهای دریایی استفاده کرد و نتایج آن را با روش کشت و PCR مقایسه نمود (۱۹). در این مطالعه درصد موارد مثبت *سالمونلا* با سه روش کشت، الایزا و PCR به ترتیب ۲۱/۳٪ ، ۲۳/۷٪ و ۳۱/۶٪ بوده است که تقریباً با یافته‌های مطالعه حاضر هم خوانی دارد. به طوری که بیشترین موارد شناسایی *سالمونلا* به کمک روش PCR مشخص گردید (جدول ۲). در سال ۲۰۰۸ از روش الایزا برای ردیابی *سالمونلا تیفی* در نمونه‌های غذایی و آب استفاده شد. کمترین حد ردیابی این روش برابر cfu 10^{5}–10^{4} و مدت زمان لازم برای اخذ نتایج ۱۰ ساعت بوده است (۲۰). استفاده از روش PCR برای ردیابی قطعات ژنوم باکتری‌ها حساسیت و ویژگی فوق‌العاده‌ای را برای تشخیص باکتری‌ها فراهم نموده‌است. با این روش می‌توان بیش از یک میلیارد کپی از یک قطعه DNA باکتری مورد نظر را در عرض ۲ تا ۳ ساعت تولید کرد. روش‌های PCR متنوعی برای ردیابی ژنوم باکتری *سالمونلا* در نمونه‌های مواد غذایی ابداع شده‌است. در سال ۱۹۹۳ آبو (Aabo) با استفاده از روش PCR باکتری *سالمونلا* را در نمونه‌های غذایی ردیابی کرد و حساسیت ۱۰۰٪ را برای آن گزارش نمود. ویژگی روش نیز ۱۰۰٪ بوده به طوری‌که آزمایش با ۸۶ سویه انتروباکتریاسه غیرسالمونلایی نتیجه مثبتی به همراه نداشته‌است (۲۱).

در سال ۱۹۹۸ بایلی (Bailey) روش BAX-PCR را برای ردیابی *سالمونلا* در مواد غذایی مورد استفاده قرار داد و نتایج آن را با روش استاندارد کشت مقایسه نمود. یافته های او نشان داد که صحت و حساسیت این روش در مقایسه با روش روتین کشت بالاتر بوده‌است (۲۲). این محقق در مطالعه‌ای دیگر در سال ۲۰۰۳ از روش BAX-PCR برای

ردیابی *سالمونلا* در نمونه گوشت ماکیان نیز استفاده نمود. در این مطالعه از میان ۱۲۲ نمونه گوشت مرغی که به طور عمدی با گونه‌های *سالمونلا* آلوده شده بودند ۱۱۱ مورد با روش PCR و ۱۱۳ مورد با روش کشت مثبت شدند. اما در مورد ردیابی *سالمونلا* از نمونه‌های هات داگ با روش PCR تعداد ۱۹ مورد از ۳۰ مورد و با روش کشت فقط ۱۰ مورد از ۳۰ مورد مثبت شدند. این یافته برتری و حساسیت بیشتر روش PCRرا نسبت به روش کشت معمولی نشان می‌دهد (۹).

در سال ۲۰۰۳ توسط هونگ (Hong) از روش ترکیبی PCR-ELISA برای ردیابی *سالمونلا* در نمونه‌های گوشت ماکیان استفاده شد. آخرین حد ردیابی گزارش شده ۲۰۰ سلول باکتری و فراوانی *سالمونلا* در لاشه ماکیان ۱۷٪ بوده است (۱۰).

در سال ۲۰۰۷ اریکسون (Eriksson) و همکاران سه روش کشت، الایزا و PCR را از نظر قدرت ردیابی *سالمونلا* در نمونه‌های مدفوعی از ماکیان، خوک و احشام مورد ارزیابی قرار دادند. یافته‌های این محققان نشان می‌دهد که دقت، حساسیت و ویژگی روش‌های به‌کارگرفته شده شدیداً تحت تاثیر نوع *سالمونلای* موجود و ترکیب بستری است که *سالمونلا* در آن قرار دارد. در این مطالعه هماهنگ با یافته‌های تحقیق حاضر میزان حساسیت و ویژگی روش PCR برابر ۱۰۰٪ گزارش گردید (۲۳).

در سال ۲۰۰۷ فرزان (Farzan) و همکاران دو روش کشت و الایزا را برای ردیابی *سالمونلا* در گله های خوک مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج آنها نشان داد که حساسیت و ویژگی تست الایزا به ترتیب ۶۵٪ و ۸۴٪ می باشد. این یافته با نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر هم خوانی دارد (۲۴).

در سال ۲۰۱۰ ایگور (Eyigor) و همکاران دو روش کشت توصیه شده توسط سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA) و ISO-6579 و یک روش PCR را برای ردیابی *سالمونلا* در گوشت مرغ و بوقلمون و گوشت قرمز مقایسه نمودند. موارد مثبت *سالمونلا* با روش FDA به ترتیب ۵۰٪ ، ۳۳٪ و ۰٪ و با روش ISO به ترتیب ۵۲/۲٪ ، ۳۳٪ و ۳/۳٪ و با روش PCR با دو روش غنی‌سازی مختلف ۵۰/۱٪ و ۶۷/۴٪ بوده‌است. هماهنگ با یافته‌های این تحقیق، در مطالعه ما نیز درصد موارد مثبت *سالمونلا* در گوشت ماکیان با روش کشت و PCR به ترتیب ۵۵٪ و ۶۶٪ محاسبه گردید (۲۵). این یافته ها حساسیت بالاتر روش PCR را نسبت به روش کشت استاندارد نشان می‌دهند. لازم به ذکر است که اگرچه روش PCR حساسیت بیشتری را نشان می دهد، اما به دلیل اینکه برای انجام این روش نیاز به شرایط ویژه آزمایشگاهی و خاص می باشد ولی روش کشت به طور همگانی مورد استفاده قرار می گیرد، روش اصلی (gold (standard روش کشت می باشد.

یافته‌های مطالعه حاضر نشان می‌دهد که روش PCR طراحی شده توانایی تشخیص حدود ۱۰ عدد باکتری *سالمونلا* را در نمونه مواد غذایی تشخیص را دارد. این امر را می توان به دلیل مناسب‌سازی روش استخراج وعوامل موثر دیگر دانست. یکی از دلایل رسیدن به حساسیت و دقت فوق العاده استفاده از پرایمرهای *invA* می باشد. این جفت پرایمر ویژگی فوق‌العاده‌ای برای سویه‌های مختلف *سالمونلا* دارد. درحقیقت این ژن فقط در *سالمونلاها* وجود دارد و از طرفی با بیماری‌زایی این باکتری نیز در ارتباط می‌باشد. در بیشتر مقالات منتشر شده حساسیت پرایمرهای یاد شده بین ۱ تا ۱۰۰ باکتری گزارش شده‌است (۱۰). نتایج ما نیز در این پژوهش حساسیتی در حدود ۱۰ سلول *سالمونلا* و ویژگی ۱۰۰٪ را برای این جفت پرایمر نشان می‌دهد. بنابراین می توان چنین نتیجه گرفت که روش PCR با استفاده از پرایمرهای *invA* کارایی فوق‌العاده‌ای در تشخیص نمونه‌های مواد غذایی آلوده به *سالمونلا* می‌تواند داشته باشد. اگر بدانیم که نتیجه روش PCR حداکثر ۲۴ ساعت پس از دریافت نمونه قابل استحصال است مزیت این روش از نظر سرعت و دقت بر دو روش دیگر بیشتر آشکار می‌گردد.

مشکل آلودگی گوشت مرغ و تخم مرغ با *سالمونلا* زمانی در دیگر کشورهای توسعه یافته نیز رخ داده است. اما آنان با

به‌کارگیری تمهیدات لازم این آلودگی را به حد ناچیز رساندند. یکی از این اقدامات پیشگیرانه نظارت بر آلودگی خوراک عرضه شده در بازار می‌باشد. روش دوم استفاده از افشانه‌های حاوی باکتری‌های بی‌ضرر روده‌ای است که بر روی غذای جوجه‌ها پاشیده می‌شود. این امر موجب جایگزینی به موقع این باکتری‌ها در روده جوجه‌ها و مهار قرارگیری باکتری *سالمونلا* در روده آنها می‌گردد (۲۶ و ۲۷) .

نتیجه گیری

در مجموع، اگرچه روش کشت به عنوان روش استاندارد برای ردیابی *سالمونلا* در مواد غذایی مطرح است، اما این روش به ۷-۴ روز زمان نیاز داشته و عوامل انسانی و مواد و تجهیزات سبب خطای قابل توجهی در نتایج حاصل از آن می‌گردد. روش الایزا دستیابی سریع تر به جواب را میسر می کند اما اغلب برای بالابردن حساسیت روش باید از یک مرحله غنی‌سازی استفاده نمود. روش مولکولی PCR سریع، حساس و اختصاصی است و به عنوان یک تست غربالگری می تواند در مواقع وقوع همه‌گیری اطلاعات تقریباً آنی از آلودگی مواد غذایی ارائه دهد. اما شرایط آزمایش در روش PCR پیچیدگی‌های خاص خود را دارد و بهینه سازی آن ضروری است. به نظر می‌رسد برای کاهش بار میکربی گوشت ماکیان و تخم مرغ لازم است تحقیقات گسترده‌ای در ایران برای شناسایی منابع آلودگی و چرخه عفونت انجام گیرد و روش حساس و دقیق PCR می‌تواند در این راستا کمک‌کننده باشد

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از تمامی همکاران آزمایشگاه گروه میکروب شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

References

1. Ranjbar R, Torabi R, Mirzaie A. Molecular typing of *Salmonella enteritidis* strains isolated in several laboratory centers in Tehran by ERIC-PCR. Sci J Kurdistan Univ Med Sci. 2013; 18(2): 77-85. [In Persian]
2. Crump JA, Luby SP, Mintz ED. The global burden of typhoid fever. Bull World Health Organ. 2004; 82(5): 346-353.
3. Esmailpour N, Rasoolinejad M, Abdolbaghi MH. Cardiopulmonary manifestations of typhoid fever: a prospective analysis of 65 cases in Iran. Trop Doct. 2006; 36(2): 118-119.
4. Mitra R, Houshang MAA, Hamid HS, Maryam D, Reza MA, Shima H, Nojomi M. Clinical features of patients with typhoid fever and drug resistance of the causative isolates in western Iran. Trop Doct. 2009; 39(4): 223-224.
5. Wain J, Bay PVB, Vinh H, Duong NM, Diep TS, Walsh AL, Parry CM, Hasserjian RP, Ho VA, Hien TT. Quantitation of bacteria in bone marrow from patients with typhoid fever: relationship between counts and clinical features. J Clin Microbiol. 2001; 39(4): 1571-1576.
6. Nietfeld J, Tyler D, Harrison L, Cole J, Latimer K, Crowell W. Invasion of enterocytes in cultured porcine small intestinal mucosal explants by *Salmonella choleraesuis*. Am J Vet Res. 1992; 53(9): 1493-1499.

7. Brumell JH, Marcus SL, Finlay BB. N terminal conservation of putative type III secreted effectors of *Salmonella typhimurium*. Mol Microbiol. 2000; 36(3): 773-774.

8. Ranjbar R, Giammanco GM, Aleo A, Plano MRA, Naghoni A, Owlia P, Mammina C. Characterization of the first extended spectrum lactamase- producing nontyphoidal *Salmonella* strains isolated in Tehran, Iran. Foodborn Pathog Dis. 2010; 7(1): 91-95.

9. Bailey J, Cosby D. Detection of *Salmonella* from chicken rinses and chicken hot dogs with the automated BAX PCR system. J Food Prot. 2003; 66(11): 2138-2140.

10. Hong Y, Berrang ME, Liu T, Hofacre CL, Sanchez S, Wang L, Maurer JJ. Rapid detection of *Campylobacter coli*, *C. jejuni* and *Salmonella enterica* on poultry carcasses by using PCR-enzyme-linked immunosorbent assay. Appl Environ Microbiol. 2003; 69(6): 3492-3499.

11. Hopkins KL, Lawson AJ, Connell S, Peters TM, de Pinna E. A novel real-time polymerase chain reaction for identification of *Salmonella enterica* subspecies *enterica*. Diagn Micr Infec Dis. 2011; 70(2): 278-280.

12. Sharifzadeh A, Doosti A, Gaafarian M. The comparison between molecular and bacteriological detection for identification of abortion agents caused by *Brucella* and *Salmonella* in sheep in Shahrekord town. J Microbial world. 2009; 2(2): 101-104. [In Persian]

13. Web address, Available at: http://www.isiri.org/portal/files/std/1810.PDF

14. Chen S, Wang F, Beaulieu JC, Stein RE, Ge B. Rapid detection of viable *salmonellae* in produce by coupling propidium monoazide with loop-mediated isothermal amplification. Appl Environ Microbiol. 2011; 77(12): 4008-4016.

15. Lim H, Lee KH, Hong CH, Bahk GJ, Choi WS. Comparison of four molecular typing methods for the differentiation of *Salmonella* spp. Int J Food Microbiol. 2005; 105(3): 411-418.

16. Malorny B, Tassios PT, Rådström P, Cook N, Wagner M, Hoorfar J. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens.Int J Food Microbiol. 2003; 83(1): 39-48.

17. Mihaiu L, Lapusan A, Tanasuica R, Sobolu R, Mihaiu R, Oniga O, Mihaiu, M. First study of Salmonella in meat in Romania. J Infect Dev Ctries 2014, 8(1), p:50-58.

18. Prusak Sochaczewski E, Luong J. An improved ELISA method for the detection of *Salmonella typhimurium*. J Appl Microbiol. 1989; 66(2): 127-135.

19. Kumar R, Surendran P, Thampuran N. Evaluation of culture, ELISA and PCR assays for the detection of *Salmonella* in seafood. Lett Appl Microbial. 2008; 46(2): 221-226.

20. Kumar S, Balakrishna K, Batra H. Enrichment-ELISA for detection of *Salmonella typhi* from food and water samples. Biomed Environ Sci. 2008; 21(2): 137-143.

21. Aabo S, Rasmussen O, Roseen L, Sørensen P, Olsen J. *Salmonella* identification by the polymerase chain reaction. Mol Cell Probs. 1993; 7(3): 171-178.

22. Bailey J. Detection of *Salmonella* cells within 24 to 26 hours in poultry samples with the

polymerase chain reaction BAX system. J Food Prot. 1998; 61(7): 792-795.

23. Eriksson E, Aspan A. Comparison of culture, ELISA and PCR techniques for *salmonella* detection in faecal samples for cattle, pig and poultry. BMC Vet Res. 2007; 3(1): 21.

24. Farzan A, Friendship R, Dewey C. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) tests and culture for determining *Salmonella* status of a pig herd. Epidemiol Infect. 2007; 135(2): 238-244.

25. Eyigor A, Temelli S, Carli KT. Evaluation of ISO 6579 and FDA-BAM methods to complement real-time polymerase chain reaction for the detection of *Salmonella* in naturally contaminated poultry meat and red meat. Foodborn Pathog Dis. 2010; 7(8): 921-927.

26. Goren E, de Jong WA, Doornenbal P, Koopman JP, Kennis HM. Protection of chicks against *Salmonella* infantis infection induced by strict anaerobically cultured intestinal microflora. Vet Q. 1984; 6(1):22-26.

27. Goren E, de Jong WA, Doornenbal P, Koopman JP, Kennis HM. Protection of chicks against *salmonella* infection induced by spray application of intestinal microflora in the hatchery. Vet Q. 1984; 6(2): 73-79.

Journal of Microbial World
Volume 6, No. 1, April 2013

Original Article

Comparison of bacterial culture, ELISA and PCR techniques for detection of *salmonella* in poultry meat samples collected from Tehran

Mohsen Hosseinpour[1], Azar Sabokbar[2] , Amir Bakhtiari[1], Shahnaz Parsa[3]

[1] M.Sc., Department of Microbiology, Faculty of Science, Islamic Azad University, Karaj branch, Karaj, Iran.
[2] Associated professor, Department of Microbiology, Faculty of Sscience, Islamic Azad University, Karaj branch, Karaj, Iran.
[3] Assistant professor, Department of Microbiology, Faculty of science, Islamic Azad University, Karaj Branch, Karaj, Iran.

Abstract

Background and Objectives: *Salmonella* is one of the most important causative agents of food poisoning and gastroenteritis in humans. Using the standard culture methods for detection and isolation of *Salmonella* and also, the evaluation of bacterial characteristics by biochemical and serological tests, need to take 4 to 7 days, accuracy and skill of the lab staffs and quality of cultured media. Current study was carried out to assess PCR method for rapid detection of *Salmonella* in poultry meat samples and to compare its quality with two currently available standard culture and ELISA methods.

Materials and Methods: This cross-sectional study was carried out on 60 samples of poultry meat collected from food stores of Tehran. The frequency of *Salmonella* was evaluated by using three microbiological methods culturing, ELISA (Kit SAL-VIA96; TECRA) and PCR (amplification of *invA* gene). Also accuracy, sensitivity and specificity of the methods were compared with each other.

Results: In total of samples, the incidence of *salmonella* were 55%, 47% and 65%, by using culture, ELISA and PCR methods, respectively. Our findings showed that PCR based detection of *salmonella* using *invA* primers and only with a twenty hour pre-enrichment of samples in BPW is capable identifying *Salmonella* with high sensitivity and specificity (both 100%) in food samples in 24 to 30 hours.

Conclusion: This study showed that PCR method has appropriate efficiency and sensitivity for rapid screening of *Salmonella*. Therefore, this technique is recommended to evaluate of *Salmonella* in food samples.

Keywords: *Salmonella*, ELISA, Polymerase Chain Reaction, *invA*.

Correspondance to: Azar Sabokbar

Tel: +989125179417

E-mail: sabokbar@kiau.ac.ir

Journal of Microbial World 2013, 6(1): 62-72.