مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۲۱، شماره ۱، بهار ۹۰، صفحات ۳۲ تا ۳۷

Original Article

ارزیابی روش PCR جهت تشخیص آلودگی به باکتری سالمونلا انتریتیدیس در محصولات ماکیان در شهرستان کرج

نگار نایبی[۱]، سید علی قرشی[۲]، ناصر هرزندی[۳]، مهدی شمس آرا[۴]، بهمن تبرایی[۵]، امیر بختیاری[۶]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب شناسی، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج
[۲] دانشیار، دکترای ویروس شناسی، گروه زیست فناوری دام و آبزیان، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری
[۳] استادیار، دکترای میکروبیولوژی، گروه میکروب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج
[۴] استادیار، دکترای ژنتیک مولکولی، گروه زیست فناوری دام و آبزیان، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری
[۵] استادیار، دکترای میکروب شناسی بالینی، موسسه تحقیقاتی انستیتو پاستور ایران، بخش واکسن
[۶] دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک مولکولی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات

چکیده

سابقه و هدف: *باکتری سالمونلا انتریکا سرووار انتریتیدیس یکی از سویه‌های شایع درگیر کننده ماکیان است که از طریق مواد غذایی آلوده قابل انتقال به انسان می‌باشد. در این مطالعه از روش PCR برای تشخیص باکتری سالمونلا انتریتیدیس در محصولات ماکیان استفاده شد.*

روش بررسی: *در این پژوهش بنیادی، ۸۰ نمونه از محصولات ماکیان از مراکز عرضه در شهرستان کرج و توابع آن تهیه گردید. DNA نمونه‌ها به روش salting out استخراج شد و PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی مربوط به ژن سنتز تاژک به عنوان توالی هدف و سویه استاندارد سالمونلا انتریتیدیس (RTCC ۱۶۲۱) به عنوان کنترل مثبت بهینه‌سازی و انجام گردید.*

یافته‌ها: *بررسی محصولات PCR به روش الکتروفورز نشان از تشکیل قطعه ۲۵۰ جفت بازی و آلودگی به سالمونلا انتریتیدیس در ۱۶ مورد از نمونه‌های گوشت مرغ (۴۰ درصد) و ۹ مورد از نمونه‌های تخم مرغ (۲۳ درصد) داشت. در آزمون تعیین ویژگی، نتیجه تست در مورد ۶ باکتری روده‌ای دیگر از سایر سویه‌ها و جنس‌ها منفی گردید و حساسیت روش PCR در این بررسی در سطح DNA ژنومی ۱۰۰ fg تعیین شد.*

نتیجه‌گیری: *این مطالعه نشان داد که با توجه به محدودیت‌ها و مشکلات روش‌های جداسازی آزمایشگاهی می‌توان از روش PCR به عنوان روشی حساس و سریع در تشخیص آلودگی نمونه‌های غذایی به باکتری سالمونل انتریتیدیس استفاده کرد.*

واژگان کلیدی: *سالمونلا انتریتیدیس، PCR، محصولات ماکیان.*

مقدمه

باکتری سالمونلا (Salmonella) یکی از اعضاء خانواده انتروباکتریاسه است. سالمونلا انتریتیدیس که نام کامل آن سالمونلا انتریکا زیرگونه انتریکا سرووارانتریتیدیس است یک باکتری گرم منفی فاقد اسپور و میله‌ای شکل است که توسط فلاژل‌های اطرافی حرکت می‌کند (۱، ۲). این باکتری از عوامل بیماری سالمونلوزیس در پرندگان می‌باشد که قابل انتقال به انسان بوده و در زمره مهم‌ترین بیماری‌های زئونوز (zoonoses) محسوب می‌گردد (۳).

سالمونلا انتریتیدیس دارای چند عامل حدت می‌باشد که باعث افزایش قدرت بیماری‌زایی این باکتری می‌شوند. از جمله این عوامل می‌توان به وجود تاژک اشاره کرد. این باکتری دارای دو

آدرس نویسنده مسئول: کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، گروه میکروبیولوژی، نگارنایبی
(**email**: negarnyb@yahoo.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۱/۲۳
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۹/۶/۱

نوع تاژک (نوع I و III) است که در اتصال سالمونلا انتریتیدیس به سلول‌های اپی‌تلیال روده کوچک و دهان دخالت دارند (۱، ۳، ۴). تحقیقات نشان داده است که وجود و حضور تاژک جهت بروز و ظهور علائم بیماری در سالمونلا انتریتیدیس ضروری است. چرخش و جهت‌یابی فیزیکی تاژک‌های اطرافی سالمونلا در عبور آنها از گلیکوکالیکس و اتصال به پذیرنده‌های اختصاصی و در نهایت ورود به داخل سلول میزبان اهمیت دارد (۵). آنتی‌ژن‌های تاژه‌ای در این باکتری معمولاً به صورت دو فاز قابل برگشت دیده می‌شوند. همه سالمونلاها دارای آنتی‌ژن‌های هر دو فاز نیستند. در تعداد محدودی از سروارها مانند سالمونلا انتریتیدیس و سالمونلا تیفی تاژک از نظر آنتی‌ژنیک کاملاً اختصاصی است که به این سروارها تک فازی می‌گویند. ولی در بقیه سالمونلاها هر دو فاز آنتی‌ژنی ۱ و ۲ تولید می‌شود که به آنها دو فازی می‌گویند (۵، ۶).

تشخیص سریع عامل بیماری‌زا در مواد غذایی و کنترل انتقال بیماری از این طریق از جمله موارد حائز اهمیت در بهداشت مواد غذایی می‌باشد (۵، ۷). در سال ۱۹۸۶ در آمریکا عفونت‌های سالمونلایی و مسمومیت ناشی از آن به ۸۴/۹ درصد کل موارد مسمومیت‌های غذایی رسید و در سال ۱۹۹۱ این میزان به ۹۵ درصد بالغ گردید (۲). همچنین نتایج تحقیقی که در کشور اسپانیا انجام شد، حاکی از آن بود که بعد از سالمونلا تیفی موریوم شایع‌ترین عامل سالمونلوزیس، سالمونلا انتریتیدیس می‌باشد (۸). بر پایه مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۵ در ایران روی نمونه‌های حاصل از کشت مدفوع مرغ انجام شد، از ۸۰ نمونه مورد بررسی ۱۱ درصد آلوده به باکتری سالمونلا انتریتیدیس تشخیص داده شدند (۹، ۱۰). همچنین این باکتری می‌تواند در محصولات ماکیان از جمله گوشت مرغ و تخم مرغ که دارای ظاهری سالم هستند وجود داشته باشد و به دنبال عمل‌آوری نادرست و مصرف آنها به صورت خام و نیمه پخته باعث ایجاد بیماری شوند. این بیماری به سهولت بین گله‌های مرغ قابل انتقال است و از این طریق می‌تواند ضررهای اقتصادی جبران‌ناپذیری را به دنبال داشته باشد (۷، ۱۱). از سوی دیگر با توجه به جایگاه محصولات طیور به عنوان منبع غذایی سرشار از پروتئین و در عین حال ارزان در سبد غذایی اقشار مختلف جامعه، آلودگی‌های میکروبی و انتقال بیماری‌های مربوطه از این طریق تهدید عمده‌ای در رابطه با بهداشت عمومی جامعه محسوب می‌گردند.

در طول سالیان اخیر، استفاده از روش‌های مولکولی به ویژه PCR و روش‌های مبتنی بر آن در شناسایی حضور عوامل میکروبی در نمونه‌های مختلف، جایگاه ویژه‌ای یافته‌اند. این روش‌ها در مقایسه با راهکارهای معمول تشخیص عوامل عفونی مانند کشت و روش‌های سرولوژی از دقت، حساسیت، ویژگی و سرعت بالایی برخوردار هستند. در این راستا هدف از انجام این تحقیق بهینه سازی و ارزیابی روش PCR در تشخیص مولکولی سالمونلا انتریتیدیس و نیز بررسی میزان آلودگی به این باکتری در محصولات ماکیان در شهرستان کرج و توابع آن بود.

مواد و روشها

در مطالعه بنیادی حاضر، باکتری استاندارد سالمونلا انتریتیدیس از بخش باکتری شناسی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی به شماره RTCC1621 به صورت کپسول لیوفیلیزه تهیه شد. کپسول لیوفیلیزه در شرایط کاملاً استریل با ۲ میلی‌لیتر سرم گوساله مخلوط شد. از سوسپانسیون به دست آمده به میزان ۱ میلی‌لیتر در محیط کشت BHI براث تقلیح شده و پس از اضافه کردن ۱ میلی‌لیتر گلیسرول در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. از سوش استاندارد جهت بهینه سازی روش PCR و نیز به عنوان کنترل مثبت در تمامی مراحل بررسی نمونه‌ها استفاده گردید.

کشت سویه استاندارد روی محیط‌های مک‌کانگی آگار و سالمونلا- شیگلا آگار انجام شد. پس از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، از کلونی‌های ظاهر شده سوسپانسیون ۱ میلی‌لیتری در آب مقطر استریل تهیه و با سانتریفیوژ در دور ۱۲۰۰۰ rpm رسوب داده شد (۷). سپس DNA ژنومی با استفاده از کیت شرکت سیناژن و طبق دستورالعمل مربوطه استخراج شد.

تعداد ۸۰ نمونه از محصولات ماکیان شامل ۴۰ نمونه گوشت مرغ و ۴۰ نمونه تخم‌مرغ از مرداد ماه الی مهر ماه سال ۱۳۸۷ از مراکز مختلف عرضه در شهر کرج و توابع بصورت تصادفی جمع‌آوری و روی یخ در ظروف استریل به آزمایشگاه منتقل شدند. طبق رفرانس‌های معتبر در ۲۵ گرم از ماده غذایی مصرفی انسان نباید هیچ گونه سالمونلایی موجود باشد (۱۲). از این رو ۲۵ گرم از نمونه‌های گوشت در شرایط استریل صلایه شدند و پس از انتقال به درون لوله آزمایش، ۱ میلی‌لیتر آب مقطر استریل به آنها اضافه و به طور کامل ورتکس گردیدند. برای حذف بافت‌ها در هر نمونه، مایع

هموژن حاصل از ورتکس به یک میکروتیوب استریل منتقل و با دور rpm ۶۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. پس از انتقال مایع رویی به یک میکروتیوب استریل مجدداً سانتریفیوژ در دور rpm ۱۰۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه انجام گردید و رسوب به دست آمده جهت استخراج DNA با کیت شرکت سیناژن مطابق دستورالعمل سازنده مورد استفاده قرار گرفت.

در مورد نمونه‌های تخم‌مرغ سعی شد تا تخم‌مرغ‌های با ظاهر سالم انتخاب شوند. با توجه به انتقال عمودی و افقی سالمونلا انتریتیدیس، ابتدا پوسته تخم‌مرغ با بتادین و سپس الکل ضدعفونی شد تا از انتقال آلودگی هنگام بازکردن پوسته تخم‌مرغ جلوگیری شود. محتویات تخم‌مرغ در پلیت استریل ریخته شد و با سرنگ استریل ۱ میلی‌لیتر از زرده نمونه‌گیری شده و ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل به آن اضافه گردید (۱۳). پس از مخلوط کردن، سانتریفیوژ در دور rpm ۶۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه انجام شد و مایع رویی به یک میکروتیوب استریل انتقال یافت و مجدداً سانتریفیوژ با دور rpm ۱۰۰۰۰ به مدت ۷ دقیقه انجام شد. در پایان استخراج DNA از رسوب با استفاده از کیت انجام گرفت.

واکنش PCR بر روی تمامی نمونه‌های DNA استخراج شده انجام شد. بدین منظور از پرایمرهای اختصاصی ژن کد کننده سنتز تاژک باکتری سالمونلا انتریتیدیس استفاده گردید. توالی پرایمرهای مورد استفاده عبارتند بودند از پرایمر S_1 -'5) GCCGTACACGACCTTATAGA-3') و پرایمر S_4 -'5) ACCGTACACGACCTTATAGA-3') (۱۴). این پرایمرها یک قطعه ۲۵۰ جفت بازی از ژن مذکور را که در اتصال باکتری و بیماری‌زایی آن نقش مهمی دارد، تکثیر می‌کنند.

به منظور بهینه‌سازی روش PCR، مقادیر و غلظت‌های مختلف از $MgCl_2$ ، dNTPs، DNA ژنومی و همچنین دماهای مختلف برای مرحله اتصال پرایمر مورد بررسی قرار گرفتند. در نهایت واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل بافر PCR (10X) ۲/۵ میکرولیتر، dNTPs ۰/۵ میکرولیتر، پرایمرهای S_1 و S_4 هر کدام ۰/۳ میکرولیتر، ۰/۲ واحد آنزیم Taq پلیمراز، $MgCl_2$ ۰/۷۵ میکرولیتر، DNA الگو ۱ میکرولیتر و آب مقطر استریل ۱۹/۵ میکرولیتر راه‌اندازی گردید.

واکنش در ۳۲ سیکل شامل مراحل واسرشت (Denaturation) در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال (Annealing) در دمای ۵۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله تکثیر (Extension) در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه انجام شد. همچنین مرحله واسرشت اولیه به مدت ۵ دقیقه و نیز تکثیر پایانی به مدت ۵ دقیقه لحاظ گردید.

۵ میکرولیتر از محصولات PCR با ۱ میکرولیتر بافر نمونه گذاری الکتروفورز (6X) مخلوط شده و روی ژل آگارز ۱/۲٪ حاوی ۰/۵ μg/ml اتیدیوم برماید به مدت ۴۰ دقیقه با ولتاژ ۸۵ ولت در بافر TBE الکتروفورز گردیدند. سپس تکثیر قطعه ۲۵۰ جفت بازی زیر نور ماورای بنفش مورد بررسی قرار گرفت.

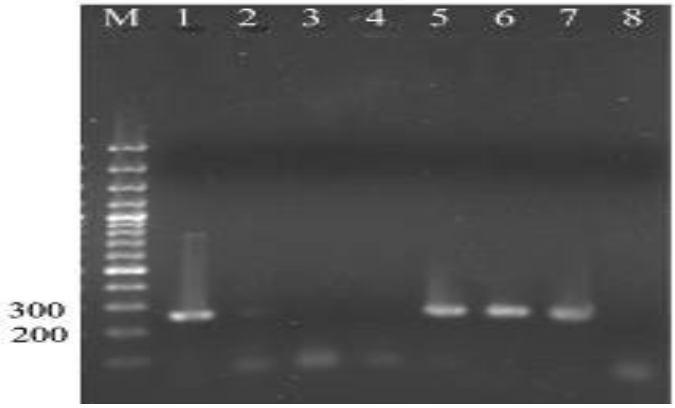
برای تعیین ویژگی واکنش PCR از باکتری‌های سالمونلا انتریتیدیس، سالمونلا تیفی، سالمونلا پارا تیفی A، شیگلا دیسانتری تیپ I، اشرشیا کلی، کلبسیلا پنومونیه و پروتئوس میرابیلیس استفاده شد (۱۵). DNA های ژنومی این باکتری‌ها استخراج و آزمایش PCR با استفاده از پرایمرهای S_1 و S_4 انجام شد و تکثیر احتمالی قطعه ۲۵۰ جفت بازی مورد بررسی قرار گرفت.

جهت انجام تست حساسیت، غلظت DNA استخراج شده از سوش استاندارد توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در محدوده نور ماورای بنفش با طول ۲۶۰ نانومتر تعیین گردید. سپس ۱۰۰ نانوگرم از DNA ژنومی برداشته شده و رقت‌های سریالی ۱:۱۰ از آن تهیه و PCR با استفاده از پرایمرهای S_1 و S_4 انجام گردید. در کلیه موارد PCR انجام شده از کنترل مثبت (سوش استاندارد) و کنترل منفی جهت تایید آزمایشات استفاده شد.

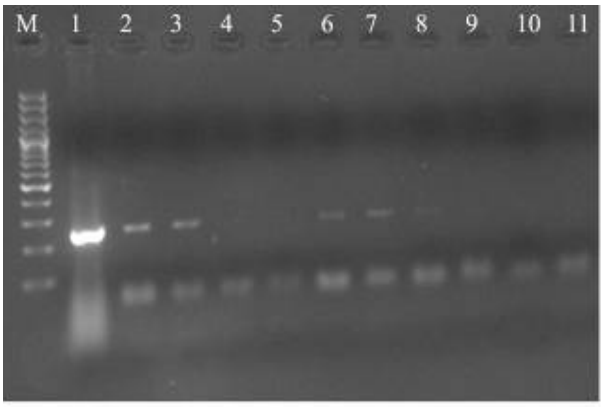
یافته‌ها

بهینه‌سازی PCR با استفاده از سویه استاندارد سالمونلا انتریتیدیس منجر به تکثیر یک قطعه ۲۵۰ جفت بازی از ژنوم باکتری شد. بررسی نتایج PCR روی نمونه‌های جمع‌آوری شده حکایت از تشکیل قطعه مذکور در ۱۶ مورد از ۴۰ نمونه گوشت مرغ (آلودگی ۴۰ درصد نمونه‌های گوشت مرغ) و ۹ مورد از ۴۰ نمونه تخم مرغ (آلودگی ۲۳ درصد نمونه‌های تخم‌مرغ) داشت (شکل‌های ۱ و ۲).

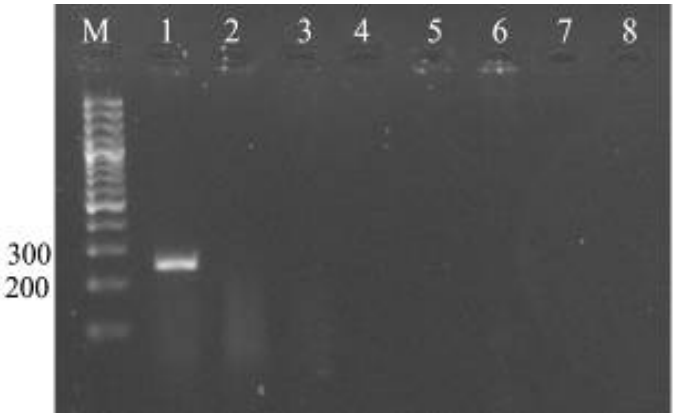
نتایج آزمایش ویژگی مبین آن بود که تست PCR و پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه بصورت اختصاصی سالمونلا انتریتیدیس را شناسایی می‌کنند و در مورد باکتری‌های گرم منفی نزدیک از جمله سالمونلا تیفی، سالمونلا پارا تیفی A، شیگلا دیسانتری تیپ I، اشرشیا کلی، کلبسیلا پنومونیه و پروتئوس میرابیلیس تکثیر قطعه ۲۵۰ جفت بازی صورت نگرفت (شکل ۳). همچنین آزمون تعیین حساسیت نشان داد که روش استفاده شده از حساسیت بالایی برخوردار است، به گونه‌ای که می‌تواند تا fg ۱۰۰ از DNA کروموزومی باکتری را شناسایی کند (شکل ۴).



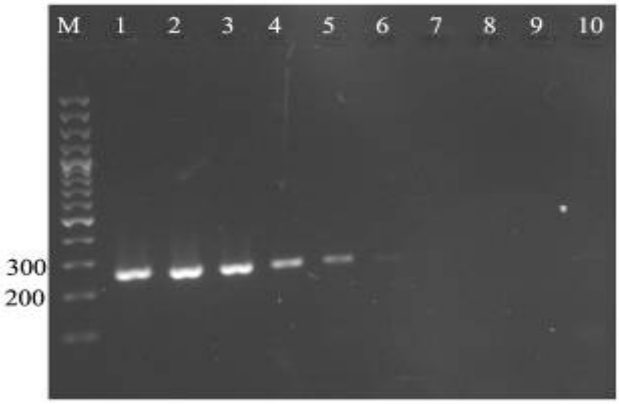
شکل ۱- شناسایی سالمونلا انتریتدیس در نمونه‌های گوشت مرغ.
ردیف M نشانگر وزن مولکولی DNA؛ ردیف ۱: کنترل مثبت (سویه استاندارد سالمونلا انتریتدیس)؛ ردیف های ۲ و۳ و۴: نمونه های گوشت مرغ عاری از سالمونلا انتریتدیس؛ ردیف های ۵ و۶ و۷: نمونه های گوشت مرغ آلوده به سالمونلا انتریتدیس؛ ردیف ۸: کنترل منفی



شکل ۲- شناسایی سالمونلا انتریتدیس در نمونه‌های تخم‌مرغ.
ردیف M: نشانگر وزن مولکولی DNA؛ ردیف ۱: کنترل مثبت (سویه استاندارد سالمونلا انتریتدیس)؛ ردیف های ۲ و۳ و۶ و۷ و۸: نمونه های تخم مرغ آلوده به سالمونلا انتریتدیس؛ ردیف های ۴ و۵ و۹ و۱۰: نمونه های تخم مرغ عاری از سالمونلا انتریتدیس؛ ردیف ۱۱: کنترل منفی



شکل ۳- آزمون تعیین ویژگی.
ردیف M: نشانگر وزن مولکولی DNA؛ ردیف ۱: سالمونلا انتریتیدیس (سویه استاندارد سالمونلا انتریتدیس)؛ ردیف های ۲ تا ۷ به ترتیب: سالمونلا تیفی، سالمونلا پارا تیفی A، شیگلا، اشرشیا کلی، کلبسیلا و پروتئوس؛ ردیف ۸: کنترل منفی



شکل ۴- آزمون حساسیت PCR با ساتفاده از رقت های سریالی.
۱:۱۰ از DNA ژنومی باکتری. بدین منظور غلظت ۱۰۰ نانوگرم از DNA ژنومی تهیه و سپس رقت های سریالی از آن تا رقت ۹-۱۰ تهیه گردید. ردیف M: نشانگر وزن مولکولی DNA؛ ردیف های ۱ تا ۱۰: PCR از رقت های سریالی تهیه شده (چنانچه مشاهده می شود تا تست حاضر قادر به شناسایی رقت ۵-۱۰ از DNA ژنومی بوده است).

بحث

مطالعات در مورد سالمونلا انترتیدیس نشان دهنده نقش مهم تاژک در این باکتری برای بیماری‌زایی می‌باشد. این باکتری قابل انتقال و بقا در سلول‌های میزبان بوده و برای مدت طولانی در داخل سلول‌ها زنده مانده و تکثیر می‌شود، بنابراین می‌تواند به آسانی بین گله‌های طیور منتقل شود (۱۶).
نکته مهم دیگر اینکه در سال‌های اخیر الگوی آلودگی به سالمونلا از سالمونلا تیفی موریوم به سالمونلا انتریتیدیس تغییر یافته و در بسیاری از کشورهای دنیا بررسی آلودگی به باکتری سالمونلا انتریتیدیس و تشخیص به موقع آن جزء آزمایشات مهم صنایع غذایی و مراکز کنترل بیماری‌ها محسوب می‌گردد (۲، ۷). در سال ۱۹۸۹ تحقیق مشترکی در آمریکا، کانادا و انگلستان انجام شد و میزان آلودگی نمونه‌های غذایی به سالمونلا انتریتیدیس در انگلستان ۵۳ درصد، در آمریکا ۲۰ درصد و در کانادا ۹ درصد گزارش شد (۱۶). در سال ۱۹۹۲، در تحقیقی که در انگلستان روی نمونه‌های غذایی انجام شد، ۱۱۲ سویه سالمونلا مورد بررسی قرارگرفت که سالمونلا انتریتیدیس با ۷۷ درصد در رتبه اول قرار گرفت (۷). در سال ۱۹۹۶، در مطالعه‌ای که درکشور ایتالیا روی کشت ۵۱۹ نمونه غذایی انجام شد، نتایج حاکی از آلودگی به سالمونلا انتریتیدیس در ۳۸ مورد از نمونه‌ها بود (۱۷). در سال ۲۰۰۲ در تایوان تشخیص سالمونلا انتریتیدیس به وسیله

PCR روی ژن *sef*A انجام شد که در این تحقیق ۲۷ سروتیپ سالمونلا مورد بررسی قرار گرفتند که سالمونلا انتریتیدیس جزء ۳ سویه شایع در ایجاد بیماری بود (۱۱). در سال ۲۰۰۴ در کشور اسپانیا تحقیقی روی نمونه‌های بالینی برای تعیین سویه‌های شایع سالمونلا انجام شد که میزان آلودگی به سالمونلا انتریتیدیس ۸ درصد گزارش شد (۸). همچنین در تحقیقی که در سال ۲۰۰۱ توسط مهرابیان و همکاران در سطح شهر تهران انجام شد، ۲۰۰ نمونه تخم مرغ، پوسته تخم مرغ، گوشت مرغ و گوشت قرمز از نظر آلودگی به سالمونلا به وسیله کشت و روش‌های بیوشیمیایی مورد بررسی قرار گرفتند که میزان آلودگی به سالمونلا انتریتیدیس ۴۰ درصد و سالمونلا تیفی موریوم ۱۰ درصد گزارش شد (۱۸). در سال ۲۰۰۵ در ایران طی تحقیقی که توسط جعفری و همکاران انجام شد، نتایج کشت نمونه‌های مدفوع مرغ‌های خانگی حاکی از وجود سالمونلا انتریتیدیس به میزان ۱۱ درصد، پس از سالمونلا تیفی موریوم به میزان ۱۸ درصد، در نمونه‌ها بود (۹). نتایج تحقیق حاضر مؤید آلودگی ۴۰ درصدی نمونه‌های گوشت و ۲۳ درصدی نمونه‌های تخم مرغ به سالمونلا انتریتیدیس بود. مواردی که در توجیه اختلاف نتایج سایر تحقیقات با نتایج بررسی حاضر می‌توان بر شمرد، عبارتند از: حساسیت روش‌های تشخیصی، واکسیناسیون گله‌های مادر، رعایت نکات بهداشتی در مزارع، کشتارگاه‌ها و مراکز عرضه محصولات. با توجه به نقش محصولات طیور به عنوان منبع غذایی سرشار از پروتئین در سبد غذایی اقشار مختلف جامعه، آلودگی‌های میکروبی و انتقال بیماری‌های مربوطه از این طریق تهدید عمده‌ای در رابطه با سلامت عمومی جامعه به حساب می‌آید و در این میان تشخیص سریع آلودگی نقش مهمی در کنترل انتقال و گسترش بیماری دارد. بالا بودن میزان آلودگی در منطقه کرج تاکیدی بر نقش و دخالت سالمونلا انتریتیدیس در ایجاد مسمومیت‌های غذایی و درگیری‌های گوارشی به صورت تک گیر و یا اپیدمیک است.

تحقیق حاضر نشان می‌دهد که اتخاذ تصمیم و سیاست‌گذاری‌های کلان در راستای کنترل و پیشگیری از وقوع بیماری‌های منتقله از طریق غذا ضروری به نظر می‌رسد. در این راستا لحاظ کردن نکاتی چون بررسی امکان واکسیناسیون گله‌های مادر در مقابل این باکتری، رعایت هر چه بیشتر موازین بهداشتی در هچری‌ها و روزهای اولیه ورود جوجه‌ها به مزارع مرغداری و نیز بازنگری و رعایت استانداردهای موجود در کشتارگاه‌ها و مراکز عرضه محصولات طیور حایز اهمیت بسیار می‌باشد. این بررسی نشان داد که PCR می‌تواند به عنوان روشی با حساسیت، ویژگی و سرعت بالا و بدون نیاز به کشت باکتری درکنترل کیفی محصولات غذایی و نیز جلوگیری از شیوع مسمومیت‌های غذایی ناشی از سالمونلا انتریتیدس به کار گرفته شود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از تمامی دوستان عزیز در آزمایشگاه میکروب شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج به دلیل همکاری بی‌شائبه‌شان و همچنین از حوزه معاونت پژوهشی این دانشگاه به دلیل حمایت مالی، ارائه امکانات و تجهیزات آزمایشگاهی جهت انجام این پژوهش سپاسگزاری می‌گردد.

REFERENCES

1. Harvey RA, Champe PC, Fisher BD, eds. Microbiology. 2nd edition. Philadelphia: Mosby; 2007. p.115-18.
2. John FT, Alicia LR, eds. Food microbiology protocols. New York: Humana Press; 2001. p.113-18.
3. Moat AG, Foster JW, Spector MP, eds. Microbial physiology. 4th edition. New York: John Wiley & Sons; 2002. p.669.
4. Fadl AA, Nguyen AV, Khan M.I. Analysis of *Salmonella enteritidis* isolates by arbitrarily primed PCR. J Clin Microbiol 1995; 33: 987-89.
5. Guard-Peter J. The chicken, the egg and Salmonella enteritidis. Environ Microbiol 2001; 3: 421-30.
6. Cohen ND, Wallis DE, Neibergs HL, Mihargis B. Detection of Salmonella enteritidis in equine feces using the polymerase chain reaction and specific oligonucleotide primers. J Vet Diagn Invest 1995; 7: 219-22.
7. Jay JM, Loessner MJ, Golden DA. Modern food microbiology. 7th edition. New York: Springer; 2005. p.619-36.
8. Alvarez J, Sota M, Vivanco AB, Perales I, Cisterna R, Rementeria A, et al. Development of a multiplex PCR technique for detection and epidemiological typing of salmonella in human clinical samples. J Clin Microbiol 2004; 42: 1734-38.
9. Jafari RA, Ghorbanpour M, Jaideri A. An investigation into salmonella infection status in backyard chickens in Iran. Int J Poult Sci 2007; 6: 227-29.

10. Keller LH, Benson CE, Krotec K, Eckroade R. *Salmonella enteritidis* colonization of the reproductive tract and forming and freshly laid eggs of chickens. Infect Immun 1995; 63: 2443-49.

11. Tzu-ming P, Yi-Ju L. Identification of *Salmonella entritidis* isolates by polymerase chain reaction and multiplex polymerase chain reaction. J Microbiol Immuol Infect 2002; 35: 147-51.

12. Nazari Nia A, Ebrahimi GH, Absalan AA, Pour Falah F, Javad Zade F, Raoofi A, et al. Microbiology of food and animal feeding stuffs horizontal method for the detection of salmonella. Institute of Standard and Industrial Research of Iran 2002; 1810: 9 [In Persian].

13. Yoshimasu MA, Zawistowski J. Application of rapid dot blot immunoassay for detection of *Salmonella enteritidis* in serovar enteritidis in eggs poultry and other foods. Appl Eviron Microbiol 2001; 67: 459-61.

14. Somet C, Ermel G, Rose N, Rose V, Drouin P, Salvat G, et al. Evaluation of a multiplex PCR assay for simultaneous identification of Salmonella sp., *Salmonella enteritidis* and *Salmonella Typhimurium* from environmental swabs of poultry houses. Lett Appl Microbiol 1999; 28: 113-17.

15. Cohen ND, Neibergs HL, McGruder ED, Whitford HW, Behle RW, Ray PM, et al. Genus specific detection of salmonellae using the polymerase chain reaction. J Vet Diagn Invest 1993; 5: 368-71.

16. Poppe C,Mc Fadeen KA, Brouwer AM, Demczut W. Characterization of *Salmonella enteritidis* strains. Can J Vet Res 1993; 57: 176-84.

17. Pignato S, Marino AM, Emanuele MC, Iannotta V, Caracappa S, Giammanco G. Evaluation of new culture media for rapid detection and isolation of salmonella in food. Appl Environ Microbiol 1996; 61: 1996-99.

18. Mehrabyan S, Rafiee Tabatabaei R, Hajiyan A. Study of type and drug resistance in salmonella isolated from foods. Journal of Science (University Teacher) 2001; 1: 193-99. [In Persian].