Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 8, Number 1 (06-2014)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Isolation and Evaluation Virulence Factors of *Salmonella typhimurium* and *Salmonella enteritidis* in Milk and Dairy Products

Shima Shaigan Nia[1], Fateme Rostami[1], Farhad Safarpour Dehkordi[2], Ebrahim Rahimi[3], Emad Yahaghi[4], Ebrahim Khodaverdi Darian[5], Mahrokh Bagheri Moghadam[6]

1. Department of Food Science and Technology, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran.
2. Young Researchers and Elite Club, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
3. Department of Food Hygiene and Public Health, College of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University Shahrekord, Iran.
4. Baqiytallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
5. Young Researchers and Elite Club, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran
6. Young Researchers and Elite Club, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Downloaded from ijmm.ir at 5:30 +0330 on Wednesday November 21st 2018

Article Information

Article history:
Received:2014/03/12
Accepted:2014/05/20
Available online:2014/05/05

Article Subject:
Molecular Microbiology

IJMM 1393; 8(1): P 54-61

Corresponding author at:

Ms. Shima Shaigan Nia

Department of Food Science and Technology, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran.

Email:
shima.shaigan@yahoo.com

Abstract

Background and Aim: Nutritional and economic importance of milk and dairy products is undeniable. In a day, Millions of people use from these products in their daily deals but unfortunately the hygienic quality of milk and dairy products can be changed due to presence of microbial pathogens. *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* are two important milk-borne pathogens. Their pathogenicity is occurred by several putative virulence genes. This study was carried out for investigate the prevalence of *Salmonella* spp., *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* in milk and dairy products and study the presence of their virulence factors.

Materials and Methods: Totally, 360 milk and dairy products were collected from Isfahan province and were immediately transferred to the Food Microbiology Research Center of Islamic Azad University of Shahrekord. All samples were cultured and their positive results were subjected to PCR method in order to determine the exact incidence rates of *Salmonella* spp., *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* and their virulence genes.

Results: Totally, 1.66% of samples were *Salmonella* positive. The incidence of *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* were 0.27% and 0.83%, respectively. Raw sheep milk had the highest prevalence of *Salmonella* spp. (7.5%). All of the *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* isolates harbored their certain virulence factors.

Conclusions: To our best knowledge the present study is the first prevalence report of *Salmonella* spp., *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* in raw sheep and goat samples in Iran. Consumption of pasteurized milk and dairy products can reduce the risk of salmonellosis.

Key Words: *Salmonella typhimuriun*, *Salmonella enteritidis*, Virulence gene, Dairy products, Isfahan province.

Copyright © 2014 Iranian journal of medical microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Shaigan nia S, Rostami F, Safarpour dehkordi F, Rahimi E, Yahaghi E, Khodaverdi Darian E, et al . Isolation and Evaluation Virulence Factors of Salmonella typhimurium and Salmonella enteritidis in Milk and Dairy Products. Iran J Med Microbiol. 2014; 8 (1) :54-61

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۸ – شماره ۱ – بهار ۱۳۹۳

Journal homepage: www.ijmm.ir

Downloaded from ijmm.ir at 5:30 +0330 on Wednesday November 21st 2018

جداسازی و بررسی فاکتور های ویرولانس گونه های *سالمونلا تیفی موریوم* و *سالمونلا انتریتیدیس* در شیر و فرآورده های لبنی

شیما شایگان نیا[۱]، فاطمه رستمی[۱]، فرهاد صفرپور دهکردی[۲]، ابراهیم رحیمی[۳]، عماد یاحقی[۴]، ابراهیم خداوردی داریان[۵]، ماهرخ باقری مقدم[۶]

۱. گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران
۲. باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد شهرکرد، دانشگاه دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
۳. گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.
۴. دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) ، تهران، ایران
۵. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، کرج، ایران
۶. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، تهران، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت:۱۳۹۳/۰۲/۲۰

پذیرش:۱۳۹۳/۰۳/۱۵

انتشار آنلاین:۱۳۹۳/۰۳/۲۰

موضوع:

میکروب شناسی مولکولی

IJMM 1392; 8(1): P 54-61

نویسنده مسئول:

شیما شایگان نیا

گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.

تلفن: ۰۹۱۳۲۱۲۹۷۹۳

پست الکترونیک:

shima.shaigan@yahoo.com

چکیده

زمینه و اهداف: اهمیت تغذیه ای و اقتصادی شیروفراورده های آن غیر قابل انکار است. روزانه میلیون ها نفر از این محصولات در وعده های غذایی خود استفاده می کنند اما متاسفانه کیفیت بهداشتی این فراورده ها در اثر حضور پاتوژن های باکتریایی می تواند تغییر یابد.*سالمونلا انتریتیدیس* و *سالمونلا تیفی موریوم* ۲ پاتوژن مهم منتقله از شیر هستند. پاتوژنیسیته آنها به وسیله چندین فاکتور حدت ایجاد می شود. این مطالعه به منظور بررسی میزان شیوع*سالمونلا انتریتیدیس* و *سالمونلا تیفی موریوم* در شیر و فراورده های لبنی و مطالعه حضور ژن های حدتشان انجام پذیرفت.

مواد و روش کار: ۳۶۰ نمونه شیر و فراورده لبنی به صورت تصادفی از استان اصفهان جمع آوری گردید و در ظروف استریل به مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مواد غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد انتقال داده شد. تمام نمونه ها کشت داده شدند و پرگنه های بی رنگ با مرکز سیاه در محیط سالمونلاـشیگلا آگارانتخاب گردید و تست های تکمیلی IMVIC روی آن ها انجام گرفت. سپس برای مشخص کردن دقیق گونه های *سالمونلا انتریتیدیس* و *سالمونلا تیفی موریوم* و ژن های حدتشان، از واکنش PCR استفاده گردید.

یافته‌ها: بر پایه نتایج PCR در مطالعه حاضر مجموعا ٦ نمونه (۱/٦٦٪) از نمونه ها از نظر *سالمونلا* مثبت بودند. میزان شیوع *سالمونلا انتریتیدیس* و *سالمونلا تیفی موریوم* به ترتیب ۰/۲۷٪ و ۰/۸۳٪ بود. شیر خام گوسفند بیشترین میزان شیوع گونه های *سالمونلا* را داشت (۷/۵٪). تمام جدایه های *سالمونلا انتریتیدیس* و *سالمونلا تیفی موریوم* ژن های حدت اختصاصی خود را داشتند.

نتیجه‌گیری: با توجه به اطلاعات ما، مطالعه حاضر اولین بررسی میزان شیوع گونه های *سالمونلا انتریتیدیس* و *سالمونلا تیفی موریوم* در نمونه های شیر خام گوسفند و بز در ایران است. مصرف شیر و فراورده های لبنی پاستوریزه خطر ابتلا به بیماری سالمونلوزیس را کاهش می دهد.

کلمات کلیدی : *سالمونلا تیفی موریوم*، *سالمونلا انتریتیدیس*، ژن های حدت، فراورده های لبنی، اصفهان

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

شیر و فراورده های لبنی در بین غذاهای متعدد با منشا حیوانی و گیاهی از جایگاه خاصی برخوردار هستند. وجود مقدار کافی پروتئین، چربی، اسید های آمینه ضروری و مواد معدنی همچون کلسیم و فسفراهمیت شیر و فراورده های لبنی را بیشتر

Downloaded from ijmm.ir at 5:30 +0330 on Wednesday November 21st 2018

کرده است (۱). علاوه بر این روزانه میلیون ها نفر از شیر و فراورده های لبنی در وعده های غذایی خود استفاده می کنند. بنابراین تامین کیفیت بهداشتی بالا برای این فراورده ها امری ضروری و فراهم کننده سلامت جامعه خواهد بود.

سالمونلا ها باکتری هایی گرم منفی، میله ای کوتاه، فاقد کپسول و بجز گونه *سالمونلا گالیناروم* متحرک می باشند.آنها به عنوان یکی از عوامل اصلی ایجاد کننده مسمومیت های غذایی مطرح می باشند (۲، ۳). معمولا تمام سروتیپ های *سالمونلا* برای انسان بیماری زا هستند و در این بین اهمیت *سالمونلا تیفی موریوم* و *سالمونلا انتریتیدیس* به عنوان گونه های غذازاد بیشتر است (۱۰-۴). مسمومیت های غذایی ناشی از این میکروب ها با علایمی همچون گاستروانتریت، اسهال، کرامپ شکمی و تب های انتریک (تب حصبه) بروز می کنند (۴، ۵). میزان شیوع مسمومیت های غذایی ناشی از این باکتری ها در کشور های در حال توسعه و توسعه یافته بسیار زیاد برآورد شده است (۶، ۷).

در بین مواد غذایی اهمیت تولیدات با منشا دامی و خصوصا شیر و گوشت به مراتب بیشتر از سایر فراورده هاست (۱۰-۸). مطالعاتی که توسط Helba در سال۲۰۱۱، Vankesel در سال ۲۰۱۱، Jamshidi در سال ۲۰۰۹ برروی نمونه های گرفت این نتایج ثابت می کند. (۱۳-۱۱) بررسی ها نشان می دهند که شیر و فراورده های لبنی که تحت تیمار حرارتی مناسب قرار نگرفته اند، عامل اصلی بروز مسومیت های سالمونلایی هستند (۱۰-۸). بقا باکتری های گونه *سالمونلا* در پنیر، کره، بستنی و سایر فراورده های لبنی تولید شده از شیر غیر پاستوریزه و آلوده در مطالعات فراوانی گزارش شده است (۱۸-۱۴).

از آنجایی که شیر و فراورده های لبنی یکی از مهمترین اقلام غذایی مردم ایران را تشکیل می دهند و با توجه به این که تا کنون هیچ مطالعه ای به بررسی میزان شیوع گونه های *سالمونلا* و خصوصا *سالمونلا تیفی موریوم* و *سالمونلا انتریتیدیس* در شیر و فراورده های لبنی نپرداخته است لذا بررسی حاضر را به منظور تشخیص و بررسی فراوانی فاکتور های حدت *سالمونلا تیفی موریوم* و *سالمونلا انتریتیدیس* جداسازی شده از شیر و فراورده های لبنی، انجام دادیم.

مواد و روش ها

جمع آوری نمونه ها

در فاصله زمانی تیرماه ۱۳۹۰ تا تیر ماه سال۱۳۹۱، از مناطق مختلف استان اصفهان ۳۶۰ نمونه فراورده لبنی شامل شیر خام گاو(۵۰ نمونه)،شیر خام گوسفند (۴۰ نمونه)، شیر خام بز (۴۰ نمونه)، شیر خام شتر (۲۰ نمونه)، شیر پاستوریزه (۱۵ نمونه)، پنیر سنتی (۴۰ نمونه)، پنیر صنعتی (۲۰ نمونه)، بستنی سنتی (۲۵ نمونه)، بستنی صنعتی (۱۰ نمونه)، کره سنتی(۲۰ نمونه)، کره صنعتی (۱۰ نمونه)، ماست سنتی(۱۳ نمونه)، ماست صنعتی (۷ نمونه)، دوغ سنتی(۱۳ نمونه)، دوغ صنعتی (۷ نمونه)، کشک سنتی (۲۰ نمونه) و کشک صنعتی (۱۰ نمونه) به طور تصادفی جمع آوری گردید. نمونه ها در روز نمونه گیری در فریزر به آزمایشگاه کنترل کیفی مواد غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد انتقال داده شدند.

جداسازی سالمونلا

نمونه های جمع آوری شده ابتدا به محیط پیش غنی سازی آب پپتونه (مرک، آلمان) انتقال داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری شدند. کلنی های رشد کرده را به محیط سلنیت سیستین (مرک، آلمان) منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴۳ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری شدند. متعاقبا کلنی های باکتریایی در محیط سالمونلا-شیگلا آگار (مرک، آلمان) به صورت خطی کشت داده شدندو پش از گذشت ۲۴ ساعت در گرم خانه ۳۷ درجه سلسیوس، پرگنه های بی رنگ با مرکز سیاه به عنوان پرگنه های مشکوک به سالمونلا جهت تست های تکمیلی در نظر گرفته شدند. به موازات کشت کلنی های باکتریایی در محیط سالمونلا-شیگلا، کلنی ها همچنین در محیط برلیانت گرین آگار (مرک، آلمان) نیز کشت داده شدند و پس از گذشت ۲۴ ساعت گرم خانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، پرگنه های زرد با مراکز مشکی رنگ جهت تست های تکمیلی انتخاب گردیدند. تست های تکمیلی انجام شده شامل تست های IMVIC، اوره آز و سه قندی TSI، بودند.(۱۱)

استخراج DNA و واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR)

کلنی های باکتریایی در محیط غنی کننده Trypticase Soy Agar (مرک، آلمان) در طول یک شب در دمای ۳۷ درجه

Downloaded from ijmm.ir at 5:30 +0330 on Wednesday November 21st 2018

سلسیوس گرم خانه گذاری شدند. سپسDNA ژنومی به وسیله کیت استخراج DNA شرکت فرمنتاز لیتوانی و با توجه به دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد و تا زمان انجام واکنش های PCR در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

در بررسی حاضر از ژن های هدف 23S rRNA (جهت ردیابی گونه های سالمونلا)، ژن typh (جهت ردیابی گونه سالمونلا تیفی موریوم)، ژن ent (جهت ردیابی گونه سالمونلا انتریتیدیس) و انواع ژن های حدت در این دو گونه شامل ژن های invA، rfbJ، fliC، fliB، spV وsefA از پرایمر های معرفی شده توسط Emaddi Chashni و همکاران (۲۰۰۹) (۲۰)، استفاده شد. لیست پرایمر های مورد استفاده در بررسی حاضر در جدول ۱ آمده است.

در تمام واکنش های PCR از دستگاه PCR ترموسایکلر ساخت شرکت Eppendorf آلمان (EppendorfMastercycler-Nethel-Hinz GmbH, Hamburg, Germany)، استفاده شد.

واکنش PCR در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر شامل: ۵ میکرولیتر × ۱۰ PCR buffer، ۱/۵ میلی مول Mgcl2، ۲۵۰ میکرومول دیوکسی نوکلیوتید تری فسفات، ۲۰۰ میکرو مول dNTP، ۱ میکرومول از زوج پرایمرهای جلویی و عقبی، ۵ میکرولیتر از هر نمونه DNA و 1.25 واحد آنزیم DNA Taq Polymerase، انجام پذیرفت. برنامه های حرارتی مورد نظر بسته به نوع ژن متفاوت و به شرح زیر انتخاب گردید:

- در مورد ژن23SrRNA: یک سیکل ۹۴ درجه ۶ دقیقه، ۳۷ سیکل تکراری ۹۵ درجه ۴۰ ثانیه، ۶۴ درجه ۱ دقیقه، ۷۲ درجه ۷۵ ثانیه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه ۸ دقیقه.
- در مورد ژن های*ent* و *typh*: یک سیکل ۹۴ درجه ۶ دقیقه، ۴۰ سیکل تکراری ۹۴ درجه ۵۰ ثانیه، ۵۶ درجه ۱ دقیقه، ۷۲ درجه ۷۰ ثانیه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه ۸ دقیقه.

ردیابی ژن های حدت در گونه های *سالمونلا تیفی موریوم و انتریتیدیس*

- در مورد ژن های *invA*، *rfbJ*، *fliC* و*fljB*: یک سیکل ۹۴ درجه ۶ دقیقه، ۳۵ سیکل تکراری ۹۴ درجه ۶۰ ثانیه، ۵۷ درجه ۱ دقیقه، ۷۲ درجه ۶۰ ثانیه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه ۸ دقیقه.
- در مورد ژن های *spV* و *sefA*: یک سیکل ۹۴ درجه ۶ دقیقه، ۳۵ سیکل تکراری ۹۴ درجه ۶۰ ثانیه، ۵۷ درجه ۱ دقیقه ۷۲ درجه ۶۰ ثانیه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه ۸ دقیقه.

برای بررسی محصولات PCR از الکتروفورز در ژل آگاروز ۱٪ و رنگ آمیزی DNA با رنگ سایبرگرین انجام شد. ژلها با استفاده از دستگاه Gel Documentation مورد بررسی قرار گرفتند.

بررسی آماری

داده های حاصل از این مطالعه با استفاده از نرم افزار آماری SPSS (شماره ۱۶) و آزمون های آماری مربع کای و فیشر تجزیه و تحلیل گردید و اختلافات آماری بین حضور و فراوانی انواع گونه های سالمونلا و ژن های حدت بر پایه ضریب اطمینان ۹۵٪ (P_{value}<۰/۰۵) مورد بررسی قرار گرفت.

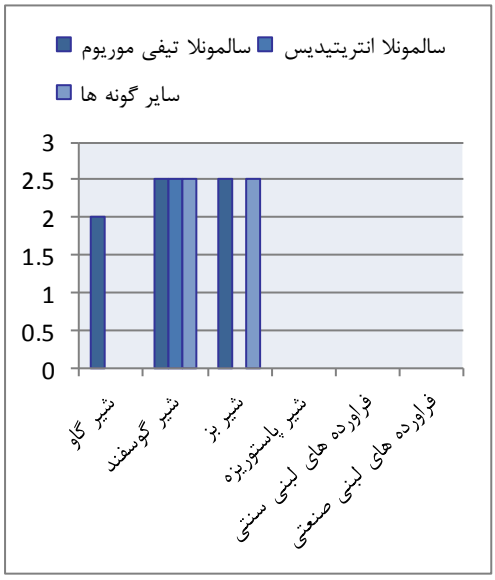
یافته ها

بر پایه آزمون PCR، از بین ۱۰ سوش *سالمونلا* جدا شده به روش کشت تنها ۶ گونه مورد تأیید قرار گرفتند. شکل ۱ فراوانی گونه های *سالمونلا* تشخیص داده شده در نمونه های شیر و فراورده های لبنی را نشان می دهد. بر پایه این نتایج از ۳۶۰ نمونه مورد مطالعه ۶ نمونه (۱/۶۶٪) آلوده به *سالمونلا* تشخیص داده شد. بررسی مولکولی نشان داد که از ۶ سوش *سالمونلا* تأیید شده، یک سوش مربوط به گونه *سالمونلا انتریتیدیس*(۰/۲۷٪)، ۳ سوش *سالمونلا تیفی موریوم* (۰/۸۳٪) و دو سوش باقی مانده مربوط به سایر گونه های *سالمونلا* بوده است (۰/۵۵٪) (نمودار ۱ و ۲). به منظور تایید تشخیص، محصول PCR بدست آمده از هرکدام از نمونه های مثبت از نظر حضور باکتری و ژن های حدت، توالی یابی شد. سپس توالی های بدست آمده با استفاده از تکنیک BLAST (Basic Logical Alignment Search Tool) مورد ارزیابی قرار گرفتند و با توالی های ثبت شده در بانک ژنی، مقایسه شد. توالی های بدست آمده از نمونه های بررسی حاضر با موارد ثبت شده در بانک ژنی مشابهت داشتند.

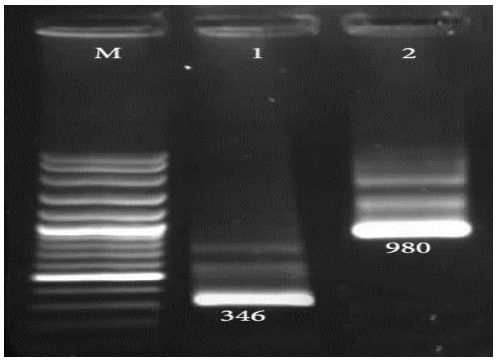
Downloaded from ijmm.ir at 5:30 +0330 on Wednesday November 21st 2018

جدول ۱: توالی پرایمر های مورد استفاده جهت ردیابی ژن های مورد مطالعه در *سالمونلا تیفی موریوم وسالمونلا انتریتیدیس*.

ژن هدف	توالی پرایمر (5'-3')	اندازه محصول (bp)
23S rRNA	F:ACG GAG TTA CAA AGG ACG AC R:AGC TCA GCC TTA ACG AGT AC	1250
typh	F:CGA GAC CAA GAT TCA ACA AG R:AAA GAA AAC CAC TCA CAT CA	346
ent	F:GCC TTC AGT GCT TGT AGG R:TTT TCA GGG TCA ATA TAA GC	980
invA	F:GTGAAATTATCGCCACGTTCGGGCAA R:TCATCGCACCGTCAAAGGAACC	284
rfbJ	F:CCAGCACCAGTTCCAACTTGATAC R:GGCTTCCGGCTTTATTGGTAAGCA	663
fliC	F:ATAGCCATCTTACCAGTTCCCCC R:GCTGCAACTGTTACAGGATATGCC	183
fljB	F:ACGAATGGTACGGCTTCTGTAACC R:TACCGTCGATAGTAACGACTTCGG	526
spV	F:GCCGTACACGAGCTTATAGA R:ACCTACAGGGGCACAATAAC	250
sefA	F: GCAGCGGTTACTATTGCAGC R: TGTGACAGGGACATTTAGCG	310



نمودار ۱: فراوانی گونه ای سالمونلا در نمونه های شیر و فراورده های لبنی استان اصفهان.



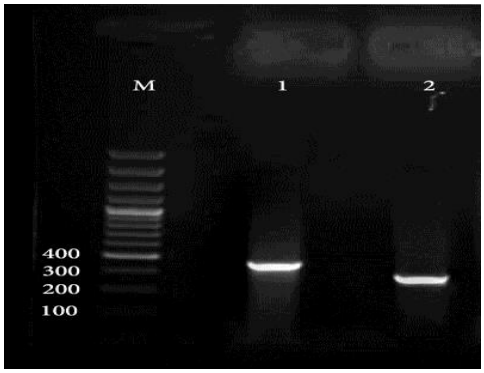
شکل ۲: واکنش زنجیره ای پلیمراز جهت تشخیص گونه های سالمونلا در شیر و فراورده های لبنی. M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ۱: نمونه مثبت برای سالمونلا تیفی موریوم و ۲: نمونه مثبت برای *سالمونلا انتریتیدیس*.

فراوانی ژن های حدت در گونه های *سالمونلا* جداسازی شده از شیر و فراورده های لبنی جمع آوری شده از استان اصفهان در جدول ۲ نشان داده شده است. نتایج بررسی حاضر نشان داد که از ۶ نمونه *سالمونلا* جداسازی شده از شیر و فراورده های لبنی،تمامی آنها از نظر حضور ژن های حدت *invA*، *rfbJ*، *fliC*، *fljB* ، *spv* و *sefA*، مثبت بودند (اشکال ۳ و ۴).

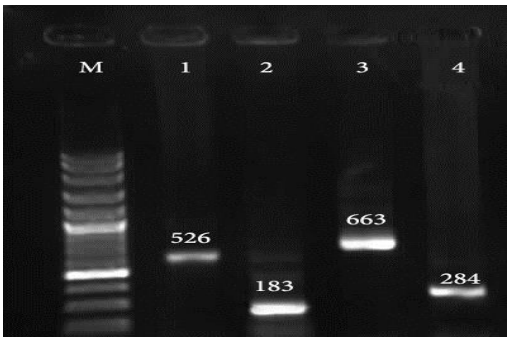
Downloaded from ijmm.ir at 5:30 +0330 on Wednesday November 21st 2018

جدول ۳: فراوانی ژن های حدت در گونه های سالمونلا جدا شده از نمونه های شیر و فراورده های لبنی جمع آوری شده از استان اصفهان.

نام ژن	*سالمونلا تیفی موریوم*	*سالمونلا انتریتیدیس*	سایر گونه های *سالمونلا*
invA	+	-	-
rfbJ	+	-	-
fliC	+	-	-
fljB	+	-	-
spv	-	+	-
sefA	-	+	-



شکل ۳: واکنش زنجیره ای پلیمراز جهت تشخیص ژن های حدت در سوش های سالمونلا انتریتیدیس جداسازی شده از شیر و فراورده های لبنی. M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ۱: نمونه مثبت برای ژن sefA و ۲: نمونه مثبت برای ژن spV. (قطعه ژن ۳۱۰مربوط به ژنsefA و ۲۵۰ جفت بازی مربوط به ژن spV).



شکل ۱: واکنش زنجیره ای پلیمراز جهت تشخیص ژن های ژن های حدت در سوش های *سالمونلا تیفی موریوم* جداسازی شده از شیر و فراورده های لبنی. M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، حضور باند های روشن به اندازه های ۱۸۳جفت بازی مربوط به ژن fliC، ۲۸۴ جفت بازی مربوط به ژن invA، ۵۲۶ جفت بازی مربوط به ژن fliB و ۶۶۳ جفت باز rfbJ میباشد که نشان دهنده مثبت بودن واکنش برای حضور ژن های حدت است.

بحث

نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر نشان داد شیر خام دارای بیش ترین میزان آلودگی به *سالمونلا* در مقایسه با سایر فراورده های لبنی است. مطالعات مشابه از ایران و سایر کشور ها آلودگی بالای شیر نسبت به سایر فراورده ای لبنی را به گونه های *سالمونلا*، گزارش کردند (**۲۳ و ۲۴**). میزان آلودگی شیر خام به گونه های *سالمونلا* در مطالعه حاضر ۴٪ به دست آمد. این میزان در شیر گاو، گوسفند و بز به ترتیب ۲، ۷/۵ و ۵ ٪ بوده است. اگر چه در خصوص آلودگی شیر گوسفند و بز به *سالمونلا* گزارش ثبت شده ای وجود ندارد اما وضعیت آلودگی شیر خام گاو در مطالعه حاضر با نتایج مطالعات پیشین، مطابقت دارد (**۲۷-۲۵**).

Sharma و Joshi (۱۹۹۲) نشان دادند که از کل ۱۵۰ نمونه شیر خام مورد بررسی در کشور هند، تنها ۳ نمونه (۲٪) آلوده به *سالمونلا* بودند و گونه های غالب در بررسی آنها شامل *سالمونلا تیفی موریوم*، *سالمونلا انتریتیدیس* و *سالمونلا ولتوردن* بودند(**۲۵**). Chye و همکاران (۲۰۰۴) نشان دادند که از کل ۹۳۰ نمونه شیر خام جمع آوری شده از مناطق مختلف کشور مالزی، ۱۳ نمونه (۱/۴٪) آلوده به *سالمونلا* بوده است و گونه های شناسایی شده شامل *سالمونلا تیفی موریوم*، *سالمونلا آگونا*، *سالمونلا مونیچن*، *سالمونلا هادر* و *سالمونلا آناتوم*، بودند. در بررسی Addis و همکاران (**۱۷**)، ۱۰/۷۶٪ از نمونه های شیر گاو و مدفوع آلوده به گونه های *سالمونلا* بودند. آنها نشان دادند که ۳ نفر از کارگرانی که در دامداری های آلوده مشغول به کار بودند (۱۳/۶٪) نیز آلوده به *سالمونلا* بودند. برخلاف بررسی حاضر و مطالعات ذکر شده، میزان شیوع *سالمونلا* در فراورده های لبنی در بررسی های Rea و همکاران در ایرلند Steele و همکاران در کانادا (۱۹۹۷) ، توکلی و همکاران در ایران (۲۰۱۰) و Kawasaki و همکاران در ژاپن (۲۰۱۱) ، بسیار ناچیز و نزدیک به صفر گزارش شده است (**۳۱-۲۸**).

در مطالعه حاضر هیچ یک از ۳۰ نمونه شیر شتر بررسی شده آلوده به گونه های *سالمونلا* نبودند. لذا شیر شتر منبع مهمی برای باکتری *سالمونلا* محسوب نمی شود. دلیل اصلی این یافته را می توان به حضور تعداد کم باکتری های هتروژنیک در شکمبه شتر، تجمع هیدروژن و نهایتا جلوگیری از بقای باکتری های حساس از قبیل گونه های *سالمونلا*، دانست.

Downloaded from ijmm.ir at 5:30 +0330 on Wednesday November 21st 2018

علاوه بر بررسی حاضر، میزان شیوع بسیار ناچیز گونه های *سالمونلا* در نمونه های پنیر در مطالعات فراوان دیگری از جمله Tavakoli و همکاران در ایران (۲۰۱۰)، Angelidis و همکاران در یونان، Kawasaki و همکاران در ژاپن (۲۰۱۱) و Aygun و همکاران در ترکیه (۲۰۰۵) (**۳۲-۲۹**) گزارش شده است. با این وجود میزان شیوع گونه های *سالمونلا* در نمونه های پنیر در بررسی های پیشین بیشتر از مطالعه ما برآورد شده است (**۱۵ و ۳۶-۳۴**). در بررسی حاضر هیچ کدام از نمونه های کشک، ماست، دوغ وکره به گونه های *سالمونلا* آلوده نبودند. عدم حضور *سالمونلا* در این نمونه ها را می توان به اسیدیته بالای این فراورده ها، رطوبت پایین و اعمال حرارت کافی به این فراورده ها در زمان تولید، نسبت داد.

به طور کلی هیچ یک از فراورده های لبنی صنعتی و شیر پاستوریزه به گونه های سالمونلا آلوده نبودند در حالی که ۱/۶۶٪ از نمونه های فراوررہ های سنتی حامل گونه های سالمونلا بودند. عدم حضور گونه های سالمونلا را می توان به وجود فرآیند حرارتی این محصولات دانست که حداقل حرارت سالم سازی (۷۲ درجه سلسیوس برای چند ثانیه) کافی است تا این پاتوژن را از بین ببرد.

بررسی حاضر نشان داد که ژن های *spv* و *sef-A* در تمام جدایه های *سالمونلا انتریتیدیس* و ژن های *invA*، *rfbj*، *fliB* و *fliC* نیز در تمام جدایه های *سالمونلا تیفی موریوم*، حضور داشتند. با این وجود هیچ ژنی در سایر گونه های *سالمونلا* یافت نشد. نتایج مشابهی در مطالعات Amini و همکاران (۲۰۱۰) (**۳۴**)، Bisi-johnson و همکاران (**۳۵**) و Nashwa و همکاران (**۳۶**)، گزارش شد. Amini و همکاران (**۳۴**) در بررسی که بر روی۱۰۰۱ نمونه گوشت مرغ کشتارگاهی در استان کرمان انجام دادند، نشان دادند که ۶/۷۹٪ از نمونه ها از نظر حضور باکتری *سالمونلا*، مثبت بودند. آنها نشان دادند که فراوانی گونه *سالمونلا انتریتیدیس* ۵۱/۴٪ و فراوانی ژن های حدت *spV* و *invA* به ترتیب ۸۸/۰۶٪ و ۱۰۰٪، بود که با نتایج بررسی ما مشابهت دارد.

این اولین تحقیق در زمینه شیوع *سالمونلا* جدا شده از شیر بز و شیر گوسفند در ایران می باشد. اختلافاتی که در میزان شیوع گونه های *سالمونلا* و حتی ژن های حدت در بررسی های متفاوت بدست آمد می تواند ناشی از وضعیت سلامت دام، وضعیت بهداشتی دامپروری ها، رعایت اصول بهداشتی در طول پروسه شیردوشی، تعداد و نوع نمونه مورد مطالعه، روش نمونه گیری، روش انجام آزمون و شرایط جغرافیایی، باشد. رعایت اصول بهداشتی در طول فرآیند دوشش، نگه داری، حمل و نقل، ضدعفونی وسایل حمل و نقل و رعایت زنجیره سرما می تواند در کاهش آلودگی مدفوعی و در نتیجه آلودگی به پاتوژن های چون *سالمونلا* در این فرآیند موثر باشد. با توجه به این که حداقل حرارت سالم سازی شیر (۷۲ درجه سلسیوس برای چند ثانیه) برای از بین بردن کامل گونه های *سالمونلا*، کافی است لذا آلودگی فراورده های لبنی سنتی به گونه های *سالمونلا* را می توان ناشی از عدم سالم سازی حرارتی شیر قبل از تهیه فراورده ها یا آلودگی در طول فرآیند تولید (عدم رعایت اصول بهداشتی) دانست.

در پایان توصیه می گردد سالم سازی شیر قبل از تولید فراورده های لبنی، رعایت اصول بهداشتی در طول فرآیند تولید، بسته بندی مناسب، نگه داری در شرایط یخچال و سالم سازی شیر خام قبل از مصرف، رعایت اصول HACCP در کارخانه ها و اخذ نکردن شیرهای مشکوک، رعایت بهداشت فردی کارگرها و صدور کارت سلامت برای آن می توانند از بروز عفونت های سالمونلایی در مصرف کنندگان، جلوگیری کنند.

تقدیر و تشکر:

نویسندگان بررسی حاضر از کلیه کارکنان مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی و مرکز کنترل کیفی بهداشت مواد غذایی و میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد و همچنین جناب آقای دکتر حسن ممتاز و دکتر امیر شاکریان کمال تشکر و قدردانی را دارند.

تعارض منافع

بین نویسندگان هیچ گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

Downloaded from ijmm.ir at 5:30 +0330 on Wednesday November 21st 2018

References

1. Rostrosa N. Technology of milk and dairy products. Tekhnologiya moloka i molochnykh produktov. 1973.
2. Koluman A, Celik G, Unlu T. Salmonella identification from foods in eight hours: A prototype study with Salmonella Typhimurium. Iran J Microbiol. 2012;4(1):15-24.
3. Wood DS, Collins-ThompsonD L, Irvine DM, Myhr AN. Source and Persistence of *Salmonella*muenster in Naturally Contaminated Cheddar Cheese. J Food Protect. 2007;47(1):20-22.
4. Tabatabaei A, Firuzi R. Animal diseases due to bacteria. 1st ed. Tehran University Press; 2009. P. 206-261.
5. Jones MA, Hulme SD, Barrow PA, Wigley P. The Salmonella pathogenicity island 1 and Salmonella pathogenicity island 2 type III secretion systems play a major role in pathogenesis of systemic disease and gastrointestinal tract colonization of Salmonella enterica serovar Typhimurium in the chicken. Avian Pathol. 2007;36(3):199-203.
6. Armorai P. Medical Microbiology. Valad Beygi B. Taghe Bostan Press. 1474: 128-139.
7. James Steel H. Zoonotic Diseases. Zooghi A (Translator). Vol 2. Iran, Karaj: Razi Vaccine and Serum Institute Press; 1997. P. 27-57.
8. .Center for Epidemiology and Animal Health. Prevalence of *Salmonella* and *Listeria* in Bulk Tank Milk and In line Filters on U.S. Dairies. Aphis info sheet. 2005;1-2.
9. Espi E, Vaillant V. International outbreak of *Salmonella* Stourbridge infection results of epidemiological food and veterinary investigations in France. Euro Surveill. 2005;10(8):1-13.
10. Knabel SJ. Food borne illness role of home food handling practices. Food Tech. 1995;49(2):119-131.
11. Van Kessel, J.A., J.S. Karns, J.E. Lombard, C.A. Kopral. Prevalence of *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogene*s, and *Escherichia coli* Virulence Factors in Bulk Tank Milk and In-Line Filters from U.S. Dairies. J Food Protect. 2011;74(5):759-768.
12. Hleba, L., M. Kacaniova, J. Pochop, J. Lejkova, J. Cubon, S. Kunova. Resistance antibiotic 0f *Enterobacterriaceae* genera and *Salmonella* spp., *Salmonella enterica* ser. Typhimurium and Enteritidis isolated from milk, cheese and other dairy Products from conventional farmine Slovakia. J Microbiol Biotech Food Sci. 2011;1(1):1-20.
13. Jamshidi, A., Zahraei-salehi, Afshin-Nics. Detection of Salmonella spp contamination of carcasses slaughtered in poultry abattoir in mashhad, Iran. Arch Razi Inst. 2009;62(4):229-233.
14. Cody SH, Abbott SL, Marfin AA, Schulz B, Wagner P, Robbins K, et al. Two outbreaks of multidrug-resistant *Salmonella* serotype typhimurium DT104 infections linked to raw-milk cheese innorthen California. JAMA.1999;281(19):1805-1810.
15. Villar RG, Macek MD, Simons S, Hayes PS, Goldoft MJ, Lewis JH, et al. Investigation of multidrug-resistant Salmonella serotype typhimurium DT 104 infections linked to raw-milk cheese in Washington State. JAMA. 1999;281(19):1811-1816.
16. Latorre L, Parisi A, Fraccalvieri R, Normanno G, La Porta MC, Goffredo E, et al. low Prevalence of *Listeria monocytogenes* in Foods from Italy. J Food Protect. 2007;70(6):1512-1707.
17. Addis Z, Kebede N, Sisay Z, Alemayehu H, Yirsaw A, Kassa T. Prevalence and antimicrobial resistance of Salmonella isolated from lactating cows and in contact humans in dairy farms of Addis Ababa across sectional study. BMC Infect Dis. 2001;11:222.
18. Elahi ME, Habib S, Rahman MM, Rahman GL. Sanitary quality of commercially produced ice cream sold in the retail stores. Pak J Nut. 2002;1(2):93-94.
19. Emaddi SH, Hassanzadeh M, Bozorgmehri MH, Mirzaie S. Characterization of the Salmonella isolated from backyard in north of Iran by serotyping, Multiplex PCR and antibiotic resistance analysis. Arch Razi Inst. 2009;64(7):77-83.
20. Singh J, Batish VK, Grover S. Molecular beacon based real-time PCR assay for simultaneous detection of Listeria monocytogenes and Salmonella spp. in dairy products Dairy. Dairy Sci Tech. 2001;91(3):373–382.
21. Van Kessel JA, Karns JS, Lombard JE, Kopral CA. Prevalence of *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogene*s, and *Escherichia coli* Virulence Factors in Bulk Tank Milk and In-Line Filters from U.S. Dairies. J Food Protect. 2011;74(5):759-768.
22. Chye FY, Abdullah A, Ayob MKH. Bacteriological quality and safety of raw milk in Malaysia. Food Microbiol. 2003;21(5):535-541
23. Sharma DK, Joshi DV. Bacteriological quality of milk and Milk products with special reference to Salmonella and its public health significance. J Food Sci Tech.1992;29(2):105–107.
24. van kessel JS, Karns JS, Perd ML. Using a Portable Real-Time PCR assay to detect Salmonella in raw milk. J Food Protect. 2004;66(10):1762-1767.
25. Rea MC, Cogan TM, Tobin S. Incidence of pathogenic bacteria in raw milk in Ireland. J Appl Bacteriol. 1992;73(4):331–336.
26. Steele ML, McNab WB, Poppe C, Griffiths MW, Chen S, Degrandis SA. Survey of Ontario bulk tank milk for foodborne pathogens. J Food Protect. 1997;60(11):1341–1346.
27. Tavakoli HR, Najafi A, Ahmadi A. Rapid specific and concurrent detection of Listeria, Salmonella and Escherichia coli pathogens by multiplex PCR in Iranian. J Microbiol Res. 2010;4(23):2503-2507.
28. Kawasaki S, Fratamico P. Development of the Multiplex PCR Detection Kit for *Salmonella* spp.,

Downloaded from ijmm.ir at 5:30 +0330 on Wednesday November 21st 2018

Listeria monocytogenes, and *Escherichia coli* O157:H7. JPN Agric Res Quarter. 2011;45(1):77–81.
29. Angelidis AS, Chronis EN, Papageorgiou DK, Kazakis II, Arsenoglou KC, Stathopoulos GA. Non-lactic acid, contaminating microbial Xora in ready-to-eat foods: a potential food-quality index. Food Microbiol. 2006;23(1),95–100.
30. Aygun O, Aslantas O, OnerS. A survey microbiological quality of Carra, a traditional Turkish cheese. J Food Eng. 2005;65(3):401-404.
31. Tekinsen KK, Ozdemir Z. Prevalence of foodborne pathogens in Turkish Van Otlu (Herb) cheese. Food Control. 2006;17(9):707–711.
32. Torres-Vitela MR, Mendoza-Bernardo M, Castro-Rosas J, Gomez-Aldapa CA, Garay-Martinez LE, Navarro-Hidalgo V, Villarruel-Lopez A. Incidence of *Salmonella, Listeria monocytogenes, Escherichia coli* O157:H7 and staphylococcal toxin in two types of fresh cheese. J Food Protect. 2012;75(1):79-84.
33. Daneshmand A, Rasouli M, Kargar M, Kiani S. Study the Contamination rate of traditional Fresh cheeses with Salmonella spp and Staphilococcus aureus in Jahrom City. J South Med. 2008,10(1):19-26.
34. Amini K, Salehi T, Nikbakht GH, Ranjbar R, Amin J, Ashrafganjooei SH. Molecular detection of invA and spV virulence gnes in Salmonella entritidis isolated from human and animal in Iran. Afr J Microbiol Res. 2010;4(21):2202-2210.
35. Bisi-johnson MA, Obi CH, Vasaikar SD, Boba KA, Hattori T. Molecular basis of virulence in clinical isolates of Escherichia coli and Salmonella species from tertiary in the eastern Cape, south Africa. Gut Pathogen. 2011; 3(1):9..
36. Nashwa M, Mahmoud AH, Adewy S. Placation of multiplex polymerase chain reaction (MPCR) for identification and characterization of Salmonella enteritidis and Salmonella typhimurium. J Appl Sci Res. 2009;5(12):2343-2348.