

کاربرد توأم روش جداسازی ایمونومگنتیک و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز چندگانه‌ای جهت جستجو و ردیابی سالمونلا انتریکا تحت‌گونه انتریکا سرووار تیپی موریوم در نمونه‌های مدفوع اسهالی گاو

حسن تاجبخش^۱، نعمت آتش پرور^۲، تقی زهرایی صالحی^{۱*}، محمد قلی نادعلیان^۳

۱) گروه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی تهران، تهران - ایران.

۲) آموزشکده دامپزشکی دانشگاه لرستان، خرم‌آباد - ایران.

۳) گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی تهران، تهران - ایران.

(دریافت مقاله: ۱ شهریورماه ۱۳۸۴، پذیرش نهایی: ۲۷ اسفندماه ۱۳۸۴)

چکیده

در این تحقیق تعداد ۴۰۰ نمونه مدفوع اسهالی گاو و گوساله اخذ و به موازات آزمایش‌های متداول کشت میکروبی و سرو تایپینگ، بر روی نمونه‌ها آزمایش جداسازی با ذرات آهن ربای ایمن (ایمونیومگنتیک) و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز چندگانه‌ای انجام گرفت. برای شناسایی سالمونلاها در سطح جنس از پرایمر عمومی *inv-A* و جهت جستجو و ردیابی سرووار تیپی موریوم از سه جفت پرایمر اختصاصی *Flic*، *Fljb*، *Rfbj* و مربوط به توالی ژن‌های سنتزکننده پادگن‌های $H_1:i$ و $H_2:1,2, O_4$ استفاده شد. از ۴۰۰ نمونه مدفوع اسهالی گاو و گوساله که مورد آزمایش با کتریولوژی یک قرار گرفت تعداد ۳۳ مورد (۸/۲۵ درصد) سالمونلا جدا گردید. سالمونلا انتریکاسرووار تیپی موریوم با ۲۲ مورد (۶۶/۷ درصد)، سالمونلا دابلین با ۳ مورد (۹/۱ درصد)، سالمونلا وبرشو و سالمونلا گلوچستر هر کدام با ۲ مورد (۶/۱ درصد)، سالمونلا انتریکایتیدیس، سالمونلا جورجیا، سالمونلا آگوستینورگ و سالمونلا لیندنبرگ هر کدام با ۱ مورد (۳ درصد) بالاترین فراوانی را به خود اختصاص دادند. در آزمایش PCR چندگانه‌ای با استفاده از پرایمرهای مربوطه. چهار نوع محصول افزایش یافته ۶۶۳، ۵۲۶، ۲۸۴ و ۱۸۳ جفت بازی به ترتیب مربوط به ژن‌های *flic*، *inv-A*، *fljb*، *rfbj* در کلیه نمونه‌های واجد سرو تیپ تیپی موریوم (1,4,5,12:i:1,2) مشاهده شد. نتایج این تحقیق نشان داد که تشخیص اختصاصی سرووار تیپی موریوم با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن‌های بیان‌کننده پادگن‌های $H_2:1,2$ و $H_1:i, O_4$ می‌تواند بسیار موفقیت‌آمیز باشد، زیرا تنها سرووار است که از بین ۲۵۵۰ سرووار سالمونلا این نوع الگوی پادگنی را دارد.

واژه‌های کلیدی: سالمونلا تیپی موریوم، ایمونیومگنتیک، PCR چندگانه‌ای، مدفوع، ژن‌های *inv-A*، *fljb*، *rfbj*

با این روش‌ها با دقت و سرعت زیاد به شناسایی عوامل بیولوژی یک پرداخت. در این بین واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است. علی‌رغم بالا بودن حساسیت و ویژگی PCR، این روش بوسیله عوامل ممانعت‌کننده موجود در نمونه‌های مرضی نظیر بیلیروبین، نمک‌های صفرای و هپارین مهار می‌گردد از اینرو حذف و یا کاهش اینگونه عوامل در مراحل آماده‌سازی نمونه‌های بالینی جهت آزمایش مستقیم PCR اهمیت بسزایی دارد (۲۸، ۲۹، ۳۴). بسیاری از محققان با رقیق نمودن نمونه سعی بر غلبه کردن این عوامل دارند که این امر با کاهش حساسیت آزمایش همراه است. در سال‌های اخیر توجه دانشمندان به استفاده از تکنیک جداسازی ایمونیومگنتیک (IM) و توأم کردن آن با PCR که (Magnetic immuno-PCR assay, MIPA) نامیده می‌شود معطوف گشته است. روش جداسازی ایمونیومگنتیک یک روش نسبتاً نوین آزمایشگاهی جهت به دام انداختن عوامل پاتوژن از نمونه‌های بالینی است که در آن از ذرات مغناطیسی واجد پادتن‌های پلی‌ومونوکلونال جهت به دام انداختن ارگانایسم هدف و حذف عوامل مهارکننده PCR در یک نمونه استفاده می‌شود (۳۴، ۳۰، ۲۹، ۲۴، ۹، ۴). هدف از انجام این بررسی کاربرد توأم روش جداسازی ایمونیومگنتیک (IMS) و PCR چندگانه‌ای با استفاده از پرایمرهای اختصاصی به منظور شناسایی سالمونلا تیپی موریوم در

مقدمه

عفونت‌های سالمونلایی یکی از معضلات اصلی صنعت دامپروری جهان و یکی از بیماری‌های مشترک انسان و دام است که هر ساله خسارت‌های عمده‌ای به سرمایه دامی وارد می‌کند. در حال حاضر بیش از ۲۵۵۰ سرو تیپ سالمونلا شناسایی شده (۲۵) که برخی از آنها میزبان اختصاصی نداشته و در انسان و اکثر حیوانات عفونت ایجاد می‌کنند که نمونه بارز آن، سالمونلا تیپی موریوم است. این جرم که در گروه B جدول کافمن-وایت با فرمول آنتی ژنی (۱۲:۱و۲:۱و۴و۵و۱۰) قرار دارد از تنوع میزبانی بالایی برخوردار است به طوری که در اکثر حیوانات اهلی و وحشی به عنوان شایع‌ترین سرو تیپ بیماریزا در انسان یکی از مهم‌ترین عوامل مسمومیت غذایی شناخته شده است (۱۴). به همین دلیل کاربرد آزمایش‌های سریع و قابل اعتماد در آزمایشگاه‌های تشخیص پزشکی، دامپزشکی و صنایع غذایی به منظور تشخیص سالمونلاها امری مهم و ضروری به نظر می‌رسد. از آنجا که روش‌های متداول جداسازی سالمونلاها امری پرمحت بوده و حداقل به ۳ روز وقت نیاز دارد امروزه سعی بر این است که از روش‌های سریع اما حساس و با ویژگی بالا استفاده گردد (۳۰، ۲۳، ۱۹، ۱۸، ۱۷، ۱). در حال حاضر توسعه روش‌های زیست‌شناسی مولکولی این امکان را فراهم ساخته است که بتوان



نمونه‌های مدفوع اسهالی گاو و گوساله بود.

مواد و روش کار

در طی این تحقیق مجموعاً ۴۰۰ نمونه مدفوع از گاو و گوساله‌های مبتلا به اسهال از گاوداری‌های صنعتی و نیمه صنعتی استان‌های تهران، گلستان و لرستان اخذ گردید. نمونه‌ها پس از جمع‌آوری در ظروف استریل و در پوشدار در شرایط ۴ درجه سانتیگراد منتقل می‌گردیدند. در هنگام نمونه برداری ابتدا اطلاعات مربوط به دام (نام صاحب دام یا گاوداری، آدرس، سن، جنس، نژاد، علائم بالینی، تاریخ شروع اسهال...) در فرم‌های مربوطه ثبت، سپس به شرط عدم مصرف آنتی بیوتیک، نمونه مدفوع اخذ می‌گردید.

آماده سازی نمونه‌ها: در آزمایشگاه جهت آماده سازی، ابتدا نمونه‌ها با محلول فسفات بافر سالین (PBS, PH: 7.2 (1:2.5 W/V) یکنواخت کرده و سپس ذرات جامد و مواد خشبی موجود در مدفوع را با استفاده از سانتریفوژ با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه رسوب داده و مایع فوقانی در ظروف استریل دیگری در دمای ۴ درجه سانتیگراد جهت آزمایش‌های بعدی نگهداری گردید.

آزمایشات کشت میکروبی و سرو تایپینگ: برای جداسازی سالمونلاها ابتدا نمونه‌ها برای غنی سازی بر روی محیط آبگوشت سلنیت-سیستین برده شد. بدین منظور یک میلی لیتر نمونه آماده شده را با پیپت استریل داخل محیط برده و بعد از ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، از آن بر روی محیط ژلوز مکانکی به صورت خطی کشت داده شد. بعد از یک شبانه روز در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، پرگنه‌های مشکوک (لاکتوز منفی) را بر روی محیط‌های بیوشیمیایی نظیر ژلوز TSI، اوره، سیمون سترات، آبگوشت MRVP و محیط SIM انتقال و بعد از تأیید بیوشیمیایی، سرو تیپ با کتری با روش استاندارد آگلوتیناسیون با استفاده از آنتی سرم‌های اختصاصی O و H دیفکو تعیین گردید.

آزمایشات جدا سازی ایمونو مگنتیک: به موازات آزمایش‌های کشت میکروبی، بر روی نمونه‌ها روش جداسازی ایمونو مگنتیک انجام گرفت. بدین منظور از ذرات تجارتي (*Salmonella* (Dynal.A.S., Oslo, Norway) Dynabeads-anti که ذرات ۴۵۰ میکرونی متحدالشکل کروی از جنس پلی استیرین با خاصیت سوپر پارامگنتیک بودند طبق دستورالعمل پیشنهادی استفاده شد. در این روش باکتری‌های هدف با اتصال بر روی ذرات مغناطیسی که واجد پادتن‌های مونو و پلی کلونال علیه پادگن‌های سطحی میکروارگانیزم‌های هدف هستند توسط دستگاه تغلیظ کننده ذرات مغناطیسی (MPC) (Dynal.A.S., Oslo, Norway) Concentrator، پس از یک دوره انکوباسیون کوتاه مدت در مخلوط کن از نمونه جدا می‌گردند. پس از جداسازی ارگانیزم هدف جهت آزمایش‌های بعدی نظیر استخراج DNA و آزمایش PCR مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۹، ۲۹، ۳۰، ۳۴).

استخراج DNA: در این بررسی استخراج DNA از سالمونلاها به روش

هولمز و گوئیکی در سال ۱۹۸۱ با تغییراتی انجام گردید (۱۶). نمونه‌های ایمونو مگنتیک شده را به مدت ۷ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد جوشانیده و سپس در ۶۰۰۰×g به مدت ۷ دقیقه سانتریفوژ گردیدند و از مایع رویی ۱۰ میکرولیتر جهت انجام آزمایش PCR چند گانه‌ای استفاده شد.

افزوده سازی با PCR چند گانه‌ای: برای انجام آزمایش PCR چند گانه‌ای از چهار زوج پرایمر استفاده شد (جدول ۱). پرایمرهای *Flic*، *RfbJ* و *FliJ* به ترتیب از ژن‌های سنتزکننده پادگن‌های H_2O_4 ، H_1i ، H_2i جهت تشخیص اختصاصی سالمونلا تیفی موریوم و نیز سایر سرو تیپ‌هایی که با سالمونلا تیفی موریوم ساختار آنتی ژنیکی مشابهی دارند، مورد استفاده قرار گرفتند (۲۰). پرایمر *inv-A* از ژن مسئول مهاجم سالمونلاها (*inv*) به عنوان پرایمر عمومی جهت تشخیص سالمونلاها در حد جنس در نمونه‌ها انتخاب گردید (۲۶). از سالمونلا تیفی موریوم استاندارد (ATCC 14028) اخذ شده از انستیتو تحقیقاتی اینسبروک اتریش به عنوان شاهد مثبت استفاده شد.

آزمایش PCR چند گانه‌ای در یک واکنش حجمی ۲۵ میکرولیتری انجام گرفت: بافر PCR (-Tris ۱۰mM، KCl ۵mM، PH=8.7، HCl، $MgCl_2$ ، 1.5mM)، dNTPs (200μM)، پرایمرها هر کدام (1μM)، آنزیم تگ پلی مرز یک واحد و DNA الگو ۱۰ میکرولیتر از نمونه استخراج شده. برنامه PCR عبارت بود از سه مرحله: مرحله اول، دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه. مرحله دوم، شامل سی سیکل و هر سیکل شامل سه گام: گام اول، دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، گام دوم، ۶۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، گام سوم، ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه. مرحله سوم، یک واسرشت نهایی ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۷ دقیقه (۲۰). واکنش PCR در یک دستگاه ترموسایکلر مدل (England Techne, TC-512) انجام شد. محصول PCR بر روی ژل آگاروز ۱/۲ درصد الکتروفورز شد و سپس با استفاده از ترانس ایلومیناتور بعد از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید مورد مشاهده و ارزیابی قرار گرفتند.

نتایج

از ۴۰۰ نمونه مدفوع اسهالی گاو و گوساله که مورد آزمایش باکتریولوژی قرار گرفت تعداد ۳۳ مورد (۸/۲۵ درصد) سالمونلا جدا گردید. فراوانی مطلق و نسبی گروه‌های سرمی و سرو تیپ‌های جدا شده در جدول ۲ نشان داده شده است. همان‌طور که آمده است گروه سرمی B با ۲۴ مورد (۷۲/۸ درصد) بالاترین فراوانی را به خود اختصاص داد. بعد از آن گروه سرمی D و C₁ هر کدام با ۴ مورد (۱۲/۱ درصد) و گروه سرمی C₂ با ۱ مورد (۳ درصد) در درجات بعدی قرار گرفتند. سالمونلا تیفی موریوم با ۲۲ مورد (۶۶/۷ درصد)، سالمونلا دابلین با ۳ مورد (۹/۱ درصد)، سالمونلا ویرشو و سالمونلا گلوچستر هر کدام با ۲ مورد (۶/۱ درصد)، سالمونلا انتری تیدیس، سالمونلا جورجیا، سالمونلا آگوستنبرگ و سالمونلا لیندنبرگ هر کدام با ۱ مورد (۳ درصد) بالاترین فراوانی را به خود اختصاص دادند.

در آزمایش PCR چند گانه‌ای پنج الگو با استفاده از پرایمرهای مربوطه



جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق.

منبع	اندازه قطعه مورد انتظار (bp)	توالی (5'-----3')	طول پرایمر (bp)	ژن هدف	پرایمر
(26)	۲۸۴	GTGAAATTATCGCCACGTTTCGGGCAA	۲۶	<i>inv-A</i>	ST-۱۳۹
		TCATCGCACCGTCAAAGGAACC	۲۲		ST-۱۴۱
(20)	۶۶۳	CCAGCACCAGTTCCAATTGATAC	۲۴	<i>rfbj</i>	<i>Rfbj</i>
		GGCTTCCGGCTTTATTGGTAAGCA	۲۴		<i>Rfbj</i>
(20)	۱۸۳	ATAGCCATCTTACCAGTCCCCC	۲۴	<i>fliC</i>	<i>Flic</i>
		GCTGCAACTGTTACAGGATATGCC	۲۴		<i>Flic</i>
(20)	۵۲۶	ACGAATGGTACGGCTTCTGTAACC	۲۴	<i>fljB</i>	<i>FljB</i>
		TACCGTCGATAGTAACGACTTCGG	۲۴		<i>FljB</i>

بر اساس ساختار آنتی ژنیک سروتیپ‌های موجود در نمونه‌ها مشاهده شد (تصویر ۱). چهار نوع محصول افزایش یافته ۶۶۳، ۵۲۶، ۲۸۴، ۱۸۳ جفت باز به ترتیب مربوط به ژن‌های *rfbj*، *fljB*، *inv-A* و *flic* در کلیه نمونه‌های واجد سروتیپ تیفی موریوم (1,2;i:1,2,4,5,12) مشاهده شد (تصویر ۱، ستون ۱). در نمونه‌های واجد سروتیپ دابلین، (-;1,9,12:g,p) انتریتیدیس (-;1,9,12:g,m) و جورجیا (6,7;b:e,n,z15) تنها یک باند ۲۸۴ جفت باز مربوط به ژن *inv-A* مشاهده شد (تصویر ۱، ستون ۱، ۲، ۷، ۸). در نمونه‌هایی که سروتیپ آگوستنبرگ (6,7;i:1,2) و یا لیندنبرگ (6,8;i:1,2) داشتند سه باند ۵۲۶، ۲۸۴ و ۱۸۳ جفت باز به ترتیب مربوط به ژن‌های *fljB*، *inv-A* و *flic* دیده شد (تصویر ۱، ستون ۴). در نمونه‌های واجد سروتیپ ویرشو (6,7;r:1,2) دو باند ۵۲۶، ۲۸۴ جفت باز مربوط به ژن‌های *fljB* و *inv-A* مشاهده شد (تصویر ۱، ستون ۳). در نمونه‌های واجد سروتیپ گلوچستر (1,4,12(27):i:I,w) سه باند ۶۶۳، ۲۸۴، ۱۸۳ جفت باز مربوط به ژن‌های *inv-A*، *rfbj* و *flic* مشاهده گردید (تصویر ۱، ستون ۱۰). هر چهار باند قابل انتظار، ۶۶۳، ۵۲۶، ۲۸۴، ۱۸۳ جفت باز در شاهد مثبت مشاهده شد (تصویر ۱، ستون PC).

مقایسه آماری نتایج: جدول ۳ مقایسه آماری روش کشت میکروبی و آزمایش IMS+mPCR را در خصوص جستجو و ردیابی سالمونلا تیفی موریوم در نمونه‌های مدفوع اسهالی نشان می‌دهد. همان‌طور که در جدول آمده است کلیه ۲۲ جدایه سالمونلا تیفی موریوم که در آزمایش کشت میکروبی مثبت بودند در آزمایش PCR چندگانه‌ای نیز مثبت تشخیص داده شده‌اند. حساسیت و ویژگی آزمون صدم درصد و ضریب همخوانی آزمون‌ها با استفاده از ضریب کاپا، یک محاسبه گردید که نشان از توافق کامل بین دو آزمون به‌کاررفته دارد (۳۱).

بحث و نتیجه‌گیری

انجام آزمایش PCR مستقیم بر روی نمونه‌های بالینی مدفوع با توجه به

جدول ۲- فراوانی مطلق و نسبی سروتیپ‌های جدا شده از نمونه‌های مدفوع اسهالی.

گروه سرمی	تعداد	درصد	سروتیپ	تعداد	درصد
B	۲۴	۷۲/۸	سالمونلا تیفی موریوم	۲۲	۶۶/۷
			سالمونلا گلوچستر	۲	۶/۱
C1	۴	۱۲/۱	سالمونلا ویرشو	۲	۶/۱
			سالمونلا جورجیا	۱	۳
C2	۱	۳	سالمونلا آگوستنبرگ	۱	۳
			سالمونلا لیندنبرگ	۱	۳
D	۴	۱۲/۱	سالمونلا دابلین	۳	۹/۱
			سالمونلا آنتریتیدیس	۱	۳
جمع	۳۳	۱۰۰		۳۳	۱۰۰

ترکیبات مهار کننده نظیر بیلیروبین و نمک‌های صفرای امری دشوار است (۲۸، ۳۴). این ترکیبات به طور معنی‌داری حتی در غلظت‌های ۵۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم در هر میلی لیتر نمونه از PCR جلوگیری می‌کنند. انجام آزمایش PCR مستقیم بر روی اینگونه نمونه‌ها تنها زمانی امکان‌پذیر است که نمونه‌های مدفوع به حدی رقیق شوند تا غلظت عوامل مهارکننده به حداقل برسد لیکن این امر باعث کاهش حساسیت آزمایش به لحاظ کاهش تعداد باکتری‌های موجود در نمونه رقیق شده می‌گردد (۳۴). محققین زیادی استفاده از روش جداسازی ایمونو مگنتیک را به عنوان یک روش غیر وابسته به رشد در تغلیظ سازی قبل از PCR و به هدف آزمایش مستقیم مورد ارزیابی قرار دادند و ادعا نمودند که در مقایسه با روش کشت استاندارد که در آن یک مرحله غنی‌سازی انجام می‌گیرد موارد مثبت واقعی مشابهی از خود نشان می‌دهد (Mansfield و Forsythe در سال ۱۹۹۳)، (Fluit) و همکاران در سال ۱۹۹۳، (Blackburn) در سال ۱۹۹۳ و (Cudjoe) و همکاران در سال ۱۹۹۵، (Widjojoatmodjo) و همکاران در سال ۱۹۹۲). در اغلب روش‌های متکی بر آزمایش PCR مستقیم جهت استخراج و خالص‌سازی DNA و به منظور حذف عوامل ممانعت‌کننده PCR از موادی نظیر آنزیم پرو تئیناز K، فنل - کلروفرم و رسوب با اتانل، ذرات شیشه‌ای و ژل سیلیکا استفاده می‌شود، لیکن استفاده از این روش‌ها اغلب وقت‌گیر و گران می‌باشد (۲). روشی که در بررسی حاضر جهت استخراج باکتری هدف از نمونه مورد استفاده قرار گرفت نه تنها سبب حذف عوامل مهارکننده می‌گردد بلکه در مقایسه با سایر روش‌ها کم هزینه‌تر بوده و از سرعت بیشتری نیز برخوردار می‌باشد. از طرفی ژن‌های متنوعی جهت جستجو و ردیابی جنس سالمونلاها و نیز بعضی از سروتیپ‌های خاص در آزمایش PCR به صورت منفرد و یا چندتایی مورد ارزیابی قرار گرفته است. نواحی از ژنوم سالمونلاها که در آزمایش PCR مورد استفاده قرار گرفته عبارت است از *agfA* (۱۰)، *fimA* (۸)، *hin* (۳۳)، *H-li* (۳۳)، *IS200* (۶)، *invA* (۷، ۲۶)، *iroB* (۳)، *mkfA* (۲۷)، *ompC* (۷)، *spvR* (۲۱)، *spvC* (۷) و *viaB* (۱۵). بعضی از این روش‌ها دارای محدودیت‌هایی هستند به عنوان مثال انجام آزمایش PCR بر پایه *IS200* با واکنش‌های مثبت کاذب به ویژه با سایر آنتریاکتر یا سه‌ها نظیر شیگلا، اشریشیاکلی ورتوکسین‌زا، یرسینیا و لیستریا همراه بوده



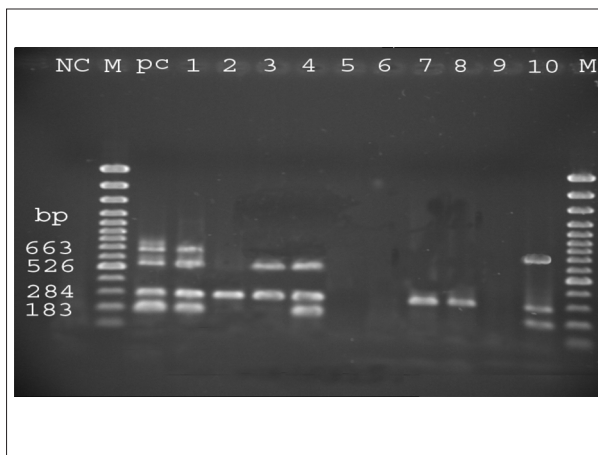
جدول ۳- مقایسه آماری نتایج حاصل از آزمون IMS+Multiplex PCR با آزمایش کشت متداول میکروبی.

کشت متداول میکروبی	IMS+mPCR		جمع
	مثبت	منفی	
مثبت	۲۲	۰	۲۲
منفی	۰	۳۷۸	۳۷۸
جمع	۲۲	۳۷۸	۴۰۰

ژن های هدف *invA* و *FljB*، *fliC*، *rfbJ* را دارند به طور همزمان در یک واکنش PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. این بررسی نشان داد که تشخیص اختصاصی سروتیپ تیفی موریوم با استفاده از ژن های بیان کننده پادگن های $H_2:1,2$ و $H_1:i,O_4$ می تواند ما را در جستجو و ردیابی سالمونلا تیفی موریوم کمک نماید زیرا تنها سرووار تیفی موریوم است که از بین ۲۵۵۰ سروتیپ سالمونلا این الگوی پادگنی را دارد. این نتایج با مشاهدات Lim و همکاران در سال ۲۰۰۰ که خود از طراحان پرایمرهای مورد مطالعه در این بررسی بودند، همخوانی دارد. نامبردگان نیز توانستند با به کارگیری این پرایمرها و ردیابی ژن های هدف فوق الذکر، با موفقیت کلیه سروتیپ های تیفی موریوم را از سایر سرووار های سالمونلا حتی آنهایی که با سالمونلا تیفی موریوم مشابهت پادگنی داشتند از یکدیگر تفریق دهند (۲۰). در نتیجه با توجه به ضریب همخوانی آزمون ها، روش جداسازی ایمونومگنتیک (IMS) و استفاده توأم آن با PCR چندگانه ای را می توان به عنوان یک روش سریع و قابل اعتماد در مقایسه با کشت میکروبی به لحاظ سرعت تشخیص بالا و نیز حساسیت و ویژگی زیاد آن برای تشخیص و شناسایی سالمونلاها در سطح جنس و سروتیپ در نمونه های بالینی نظیر مدفوع به کار برد.

تشکر و قدردانی

این مقاله از طرح تحقیقاتی شماره ۲۱۲/۶/۷۷۲ که بودجه آن از طرح تحقیقاتی قطب پاتوبیولوژی بخش میکروبیولوژی تامین شده است، استخراج گردیده. نگارندگان بر خود لازم می دانند مراتب تشکر و قدردانی را از وزارت علوم، تحقیقات و فناوری، شورای محترم پژوهشی دانشکده دامپزشکی و معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تهران به عمل آورند. از جناب آقای دکتر داریوش خاشابی عضو هیئت علمی موسسه اینسبروک اتریش به لحاظ در اختیار گذاشتن شاهد استاندارد سالمونلا تیفی موریوم قدردانی می شود. ضمناً از مدیریت گاو داری های مزرعه نمونه، رضایی و احسان نیاب به لحاظ کمک در ارسال نمونه تشکر می گردد.



تصویر ۱- نتایج الکتروفورز محصولات PCR چندگانه ای بر روی ژل آگاروز ۱/۲ درصد: M: مارکر ۱۰۰bp، NC: شاهد منفی، PC: شاهد مثبت (Salmonella typhimurium ATCC 14028)، ستون ۱: سالمونلا تیفی موریوم (1,4,5,12:i:1,2)، ستون ۲: سالمونلا آنتریتیدیس (1,9,12:g,m:-) ستون ۳: سالمونلا ویرشو (6,7:r:1,2)، ستون ۴: سالمونلا آگوستنبرگ (6,7:i:1,2) و سالمونلا لیندنبرگ (6,8:i:1,2)، ستون ۵، ۶، ۹: نمونه های منفی، ستون ۷: سالمونلا دابلین (-:1,9,12:g,p)، ستون ۸: سالمونلا جورجیا (6,7:b:e,n,z15)، ستون ۱۰: سالمونلا گلوچستر [1,4,12,(27):i:l,w].

است (۶). Hashimoto و همکاران در سال ۱۹۹۵ نیز عنوان کردند که استفاده از ژن *viaB* تنها منحصراً به سالمونلا تیفی و پاراتیفی C است (۱۵). پرایمرهای طراحی شده از توالی ژن های *H-li* و *hin* تنها قادر به تشخیص سالمونلاهای متحرک می باشد و در خصوص سالمونلاهای غیرمتحرک نظیر گالیناروم و پولوروم مناسب نیستند (۳۳). با این حال محققین بسیاری اخیراً گزارشات را جمع به تشخیص اختصاصی سالمونلا تیفی موریوم منتشر نمودند. Ebner و Mathew در سال ۲۰۰۱ (۱۱) و Khan و همکاران در سال ۲۰۰۰ (۱۸) گزارشی را جمع به تشخیص اختصاصی سرووار تیفی موریوم DT104 با استفاده از PCR چندگانه ای و استفاده از ژن های فلورفنیکول (*Flo*)، اینتگرون (*int*)، ژن *invA* و ژن حدت *spvC* منتشر نمودند. Bolton و همکاران در سال ۱۹۹۹ مشاهده کردند که ۹۸ درصد جداپه های سالمونلا تیفی موریوم که نامبردگان مورد بررسی قرار دادند برای ژن *invA* و ۸۸ درصد برای *spvC* مثبت می باشند (۵). به علاوه آنها مشاهده نمودند سایر سروتیپ های سالمونلا به غیر از سالمونلا تیفی موریوم واجد ژن های *int* و *spvC* نیز هستند. این نتایج نشان داد که تشخیص اختصاصی سالمونلا تیفی موریوم با استفاده از ژن های مذکور نمی تواند مضمّن ثمر واقع شود (۵). Soumet و همکاران در سال ۱۹۹۹ نیز ادعا نمودند با به کارگیری ژن *fliC* که در بیان پادگن های تاژکی فاز اول مؤثر است می توان به تشخیص اختصاصی سرووار تیفی موریوم دست یافت. لیکن بررسی ها نشان داد که استفاده به تنهایی از این ژن نیز نمی تواند امیدوارکننده باشد (۳۲). همچنین Echeita و همکاران در سال ۱۹۹۸ با انجام آزمایش PCR چندگانه ای با استفاده از ژن های بیان کننده فاز دوم پادگن های تاژکی اقدام به این مهم نمودند اما این بررسی ها کارگشا نبود (۱۲). در مطالعه حاضر کارایی چهار زوج پرایمر که توانایی ردیابی



References

1. Aabo, S., O. R. Rasmussen, P. D. Sorensen, and J. E. Olson.(1993)Salmonella identification by polymerase chain reaction. Mol. Cell. Probes 7:171-178.
2. AL-soud, W. a., Radstrom, P.(2000)Effects of amplification facilitators on diagnostic PCR in the presence of blood, feces, and meat. J. Clin. Microbiol. 38: 4463-4470
3. Baumler, A.J., Heiron,F., Reissbrodt, R.(1997)Rapid detection of Salmonella enterica with primers specific for iroB. J. Clin. Microbiol. 35:1224-1230.
4. Blackburn, C. D. W.(1993)Rapid and alternative methods for the detection of Salmonellas in foods. J. Appl. Bacteriol. 75:199-214.
5. Bolton, L.F., Kelley, L.C., Lee, M.D., Fedorka-Cray, P.J. and Maurer, J. J.(1999)Detection of multidrug-resistant salmonella enterica serotype Typhimurium DT104 based on a gene which confers cross-resistance to flofenicol and chloramphenicol. J. Clin. Microbiol. 37:1348-1351.
6. Cano,P.J., Rasmussen, S.R., Fraga,G.S.,Palomares, J. C.(1993)Fluorescent detection-polymerase chain reaction(FD-PCR)as say on microwell plates as a screening test for Salmonellas in foods. J. Appl. Bacteriol.75:247-253.
7. Chiu,C.H., Ou, J.T.(1996)Rapid identification of Salmonella serovars in feces by specific detection of virulence genes inv-A and spv C, by an enrichment broth culture-multiplex PCR combination assay.J. Clin. Microbiol. 34:2619-2622.
8. Cohen, H. J., Mechanda, S. M., Lin W.(1996)PCR amplification of the fimA gene sequence of Salmonella typhimurium, a specific method for detection of Salmonella *Spp*. Appl. Environ. Microbiol. 62:4303-4308.
9. Cudjoe, K.S., Hagtvedt, T., Dainty, R.(1995)Immunomagnetic separation of Salmonella from foods and their detection using immunomagnetic particle(IMP)-ELISA. Int. J. Food Microbiol. 27, 11 - 25.
10. Doran, J.L., Collinson, S.K., Clouthier, S.C., Cebula, T.A., Koch, W.H., Burian, J., Banser, P.A., Todd, E.C.D., Kay, W.W.(1996)Diagnostic potential of sefA DNA probes to *Salmonella enteritidis* and certain other O-serogroup D1 Salmonella serovars. Mol. Cell. Probes 10: 233-246.
11. Ebner, P.D., Mathew, A.G.(2001)Three molecular methods to identify Salmonella enterica serotype Typhimurium DT104:PCR fingerprinting,multiplex PCR and rapid PFGE.FEMS Microbiol.Lett. 205:25-29.
12. Echeita, M. A., Usera, M. A.(1998)Rapid identification of Salmonella *Spp*. Phase 2 antigens of the H1 antigenic complex using "multiplex PCR". Res. Microbiol. 149:757-761.
13. Fluit, A.C., Widjojoatmodjo, M.N., Box, A.T.A., Torensma, R.,Verhoef, J.(1993)Rapid detection of Salmonellae in poultry with the magnetic immunopolymerase chain reaction assay. Appl. Environ. Microbiol. 59:1342-1346.
14. Gay,J.(1995)Bovine herd Salmonellosis. Am.J.Infect. Control.23:56-62.
15. Hashimoto,Y., Itho,Y., Fujinaga,Y., Khan,A.O., Sultana,F., Miyake,M., Hirose,K., Yamamoto,H., Ezaki,T.(1995)Development of nested PCR based on the viaB sequence to detect Salmonella typhi.J. Clin. Microbiol. 33:775-777.
16. Holmes, D.S., Quigley, M.(1981)A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. Anal. Biochem.114:193-197..
17. Holt, P.S., Gast, R.K., Greene, C.R.(1995)Rapid detection of *Salmonella enteritidis* in pooled liquid egg samples using a magnetic bead-ELISA system. J. Food Prot. 58: 967- 972.
18. Khan,A.A., Nawaz, M.S., Khan,S.A., Cerniglia, C.E.(2000)detection of multidrug-resistant Salmonella Typhimurium DT104 by multiplex polymerase chain reaction. FEMS. Microbiol. Lett.182:355-360.
19. Kwang, J., Littledike, E. T., Keen, J. E.(1996)Use of polymerase chain reaction for Salmonella detection. Lett. Appl. Microbiol. 22:46-51.
20. Lim,Y.H., Hirose,K., Izumiya,H., Arakawa,E., Takahashi, H., Terajima,J., Itoh,K.I., Tamura,K., Kim, S. and Watanabe,H.(2003)Multiplex polymerase chain reaction assay for selective detection of Salmonella enterica serovar Typhimurium. Jpn. J. infect. Dis. 56:151-155.



21. Mahon, J., Laz, A.J. (1993) A quantitative polymerase chain reaction method for the detection in avian faeces of *Salmonella* carrying the *spvR* gene. *Epidemiol. Infect.* 111:455-464.
22. Mansfield, L.P., Forsythe, S.J. (1993) Immunomagnetic separation as an alternative to enrichment broths for *Salmonella* detection. *Lett. Appl. Microbiol.* 16:122-125.
23. Nguyen, A. V., Khan, M. I., Lu, Z. (1994) Amplification of *Salmonella* chromosomal DNA using polymerase chain reaction. *Avian Dis.* 38:119-126.
24. Parmar, N., Easter, M.C., Forsythe, S.J. (1992) The detection of *Salmonella enteritidis* and *Salmonella* Typhimurium using immunomagnetic separation and conductance molecular biology. *Lett. Appl. Microbiol.* 15:175-178.
25. Popoff, M. M., Bockemuhl, J., Gheesling, L. L. (2004) Supplement 2002 (no.46) to the Kauffmann-White scheme. *Res. Microbiol.* 155:568-70.
26. Rahn, K., De Grandis, S.A., Clarke, R.C., Gala'n, J.E., Ginocchio, C., Curtiss III, R., Gyles, C.L. (1992) Amplification of an *invA* sequence of *Salmonella* Typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Mol. Cell. Probes.* 6: 271-279.
27. Rexach, L., Dilassier, F., Fach, P. (1994) Polymerase chain reaction for *Salmonella* virulence-associated plasmid genes: a new tool in *Salmonella* epidemiology. *Epidemiol. Infect.* 112:33-43.
28. Rossen, L., Novskov, P., Holstrom, K., Rassmussen, O.P. (1992) Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA extraction solution. *Int. J. Food Microbiol.* 14:37-45.
29. Safarýk, I., Safarýkova, M. (1999) Use of magnetic techniques for the isolation of cells. *J. Chromatography, B.* 722: 33-53.
30. Safarýk, I., Safarýkova, M., Forsythe, S.J. (1995) The application of magnetic separation in applied microbiology. *J. Appl. Bacteriol.* 78:575-585.
31. Thrusfield, M. (1995) *Veterinary epidemiology*. 2nd edition, Blackwell science publication, pp.280-282.
32. Soumet, C., Ermel, G., Rose, N., Rose, V., Drouin, P., Salvat, G., Colin, P. (1999) 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.* 28: 113-117.
33. Way, J. S., Josephson, K. L., Pillai, S. D., Abbaszadagan, M., Gesba, C. P. and Pepper, I. L. (1993) Specific detection of *Salmonella* Spp. by multiplex polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 39:1473-1479.
34. Widjoatmodjo, M. N., Fluit, A.C., Torensma, R., Verdonk, G.P., Verhoef, J. (1992) The magnetic immuno polymerase chain reaction assay for direct detection of *Salmonella* in faecal samples. *J. Clin. Microbiol.* 30:3195-3199.



APPLICATION OF COMBINATION, IMMUNOMAGNETIC SEPARATION PLUS MULTIPLEX PCR FOR THE DETECTION AND IDENTIFICATION OF *SALMONELLA ENTERICA* SUBSPECIES *ENTERICA* SEROVAR TYPHIMURIUM IN BOVINE DIARRHOEIC FECAL SAMPLES

Tadjbakhsh, H.¹, Atashparvar, N.², Zahraei Salehi, T.^{1*}, Nadalain, M.³

¹Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran.
²School of Veterinary Medicine, University of Lorstan, Khorram-Abad, Lorestan-Iran. ³Department of
³Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran.

(Received 22 August 2005 , Accepted 17 March 2005)

Abstract:

A total of 400 bovine diarrhoeic fecal specimens were obtained and conventional microbial culture, immunomagnetic separation and multiplex PCR were simultaneously carried out on samples. For detection of *Salmonella* at genus level, *inv-A* universal primer was selected. In order to identify *Salmonella typhimurium*, specific primers of *Rfbj*, *Fljb* and *Flic* related to gene sequence of O₄, H₂:1,2 and H₁: i were used, respectively. Results showed, 33(8.5%) were culture positive for *Salmonella* serotypes. However, *Salmonella typhimurium* with (66.7%), *Salmonella dublin* (9.1%), *Salmonella virchow* (6.1%), *Salmonella gloucester* (6.1%), *Salmonella enteritidis* (3%), *Salmonella georgia* (3%), *Salmonella augustenburg* (3%) and *Salmonella lindenburg* (3%), were the most common isolated serovars, respectively. In the IMS+Multiplex PCR four amplified products (663, 526, 284 and 183 bp) were found in all specimens which had *typhimurium* serovar (1,4,5,12:i:1,2) from *rfbj*, *fljb*, *inv-A* and *flic* genes, respectively. Results showed that detection and identification of *Salmonella typhimurium* using specific primers of O₄, H₂:1,2 and H₁: i antigens can be useful.

Key words: *Salmonella typhimurium*, Immunomagnetic separation, Multiplex PCR, *inv-A*, *rfbj*, *fljb* Genes, Feces.

*Corresponding author's email: tsalehi@ut.ac.ir, Tel: 021-66427517, Fax: 021-66933222

