

# تعیین آلودگی آب مورد استفاده در سیستم خنک کننده لاشه طیور به باکتریهای جنس سالمونلا و گونه‌های انتریتیدیس و تایفی مور یوم در کشتارگاه صنعتی شهرستان مشهد با استفاده از روش Multiplex-PCR

عبدا... جمشیدی<sup>۱\*</sup> داوود نقدی پور<sup>۲</sup>

(۱) گروه آموزشی بهداشت مواد غذایی و آبریزان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد - ایران.

(۲) دانش آموخته دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد - ایران.

(دریافت مقاله: ۲۴ خرداد ماه ۱۳۸۹، پذیرش نهایی: ۱۱ بهمن ماه ۱۳۸۹)

## چکیده

محصولات طیور به عنوان یکی از مهمترین عوامل انتقال عفونت سالمونلانی در انسان شناخته شده است. آب مورد استفاده در قسمت پرکنی، پیش سردکن و سردکن (چیلر) در پروسه کشتار طیور می تواند موجب انتقال متقابل باکتری ها گردد. آب پیش سردکن و چیلر در پروسه کشتار طیور در مشهد به ترتیب هر ۲ و ۵ ساعت یکبار تعویض می گردد. در این بررسی تعداد ۵۲ نمونه، از آب منبع، آب پیش سردکن و چیلر کشتارگاه صنعتی طیور مشهد در ساعات های متوالی کاری با چهار تکرار در چهار روز برداشت گردید و با استفاده از روش کشت مرسوم شامل مراحل پیش غنی سازی، غنی سازی و کشت در محیط های اختصاصی و تفریقی، تعداد ۱۰ نمونه آلوده به جنس سالمونلا تشخیص داده شد. تمامی موارد مثبت مربوط به نمونه آب چیلر، و بیشترین میزان آلودگی مربوط به ساعات های انتهایی قبل از تعویض آب بود. جهت تایید تشخیص کلنی های جداسازی شده به عنوان جنس سالمونلا و تعیین سرووارهای تایفی مور یوم و انتریتیدیس، کلنی های جداسازی شده به روش مولتی پلکس PCR با استفاده از سه جفت پرایمر شامل S141 و S138 اختصاصی ژن *invA*، پرایمرهای *Fli15* و *Tym* اختصاصی ژن *fliC* و پرایمرهای *Prot6e-5* و *Prot6e-6* اختصاصی ژن *Prot6E* که به ترتیب اختصاصی جنس سالمونلا و سرووارهای تایفی مور یوم و انتریتیدیس می باشند مورد آنالیز قرار گرفت، در این بررسی ۱۹/۲ درصد آلودگی به جنس سالمونلا، ۱۹/۹ درصد به سالمونلا تایفی مور یوم، ۵/۸ درصد به سالمونلا انتریتیدیس و ۱۱/۵ درصد به سایر سرووارها مشخص گردید. با توجه به حضور گونه های بیماری زا در آب مورد استفاده در خط کشتار، استفاده از جریان متقابل آب و لاشه در چیلر و نیز استفاده از مواد ضد عفونی کننده توصیه می گردد.

واژه های کلیدی: جنس سالمونلا، سالمونلا تایفی مور یوم، سالمونلا انتریتیدیس، مولتی پلکس PCR.

ایمونولوژیک و روش هیبریداسیون اسید نوکلئیک فاقد حساسیت و ویژگی مناسب می باشند (۸). امروزه روش PCR ابزار مناسب در تشخیص های میکرو بیولوژیکی می باشد. در استفاده از روش PCR جهت تشخیص جنس سالمونلا و گونه های مختلف آن ژن های زیادی مورد هدف قرار گرفته است. ژن ها حدت کرموزمی مانند *invA* (۹)، ژن های حدت پلاسمیدی مانند *ipaB* (۱۰)، ژن های فعالیتی مانند *iroB* (۱۱)، ژن های رمز کننده سنتز فلاژلین مانند *fliC* (۱۱) و ژن فیمریال مانند *Prot6E* (۱۲) از جمله این هدف های می باشند.

هدف از انجام این مطالعه تعیین آلودگی آب مورد استفاده در سیستم خنک کننده لاشه طیور به باکتری های جنس سالمونلا در کشتارگاه صنعتی شهرستان مشهد با استفاده از روش کشت استاندارد و تایید تشخیص و همچنین تعیین درصد حضور سرووارهای انتریتیدیس و تایفی مور یوم به روش Multiplex-PCR با استفاده از پرایمر های اختصاصی جنس سالمونلا و هر یک از گونه های مورد مطالعه بود.

## مواد و روش کار

نمونه گیری: در کشتارگاه های صنعتی طیور مشهد آب پیش سردکن

## مقدمه

طیوری که به کشتارگاه ارسال می گردند می توانند حامل باکتری های پاتوژن و غیر پاتوژن در سطح پوست و پرها و نیز در محتویات روده ها باشند. این باکتری های می توانند طی مراحل مختلف فرایند تولید گوشت طیور به سایر لاشه ها منتقل شوند (۱). آب مورد استفاده در قسمت پرکنی، پیش سردکن و سردکن (چیلر) در پروسه کشتار طیور می تواند موجب انتقال متقابل باکتری ها گردد، لذا آب مورد استفاده در این قسمت ها به عنوان یکی از عوامل انتقال باکتری های بین لاشه های طیور حائز اهمیت است (۲). سرووارهای مختلف جنس سالمونلا به عنوان یکی از مهمترین پاتوژن های غذائی در جهان محسوب می گردند (۳). حیوانات مخزن اصلی این پاتوژن می باشند (۴) و طیور منشاء اصلی انتقال آلودگی به انسان شناخته شده است (۵). سالمونلا انتریکاسرووارهای انتریتیدیس و تایفی مور یوم عامل بروز اغلب موارد شیوع سالمونلوز در انسان می باشند (۶). جهت تعیین حضور سالمونلا در مواد غذائی استفاده از روش کشت مرسوم مستلزم صرف وقت به مدت حداقل ۶-۵ روز می باشد (۷). روش های سریع مانند استفاده از پروب های DNA و یا RNA، روش های



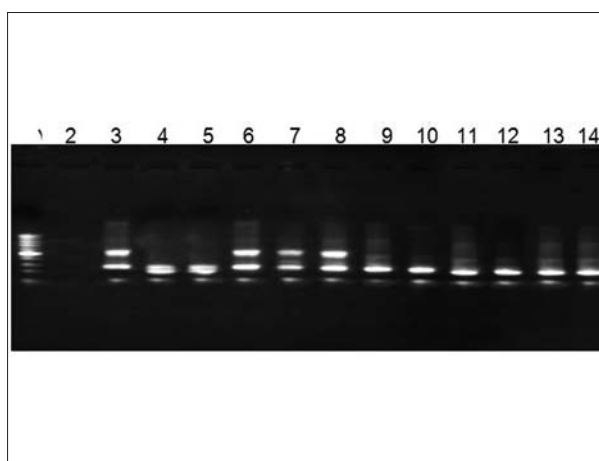
جدول ۱- مشخصات پرایمرهای مورد استفاده جهت تشخیص جنس سالمونلا و سرووارهای تایفی موریوم و انتریتیدیس.

پرایمر	توالی نوکلئوتیدی (32-52)	ژن هدف	اندازه محصول (bp)
S139-F	GTG AAA TTA TCG CCA CGT TCG GGC AA	Inv A	284
S141-R	TCA TCG CAC CGT CAA AGG AAC C		
Fli15-F	CGG TGT TGC CCA GGT TGG TAA T	fliC	559
Tym-R	ACT CTT GCT GGC GGT GCG ACT T		
Prot6e-5-F	ATATCGTCGTTGCTGCTTCC	Prot6E	185
Prot6e-6-R	CATTGTTCCACCGTCACTTTG		

شده را در هر یک از محیط‌های براث غنی کننده تتراتیونات (Merck) و سلنیت سیستمین (Merck) تلقیح نموده و در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری گردید و پس از آن در محیط‌های آگارانتخابی سالمونلا شینگلا (Merck) و سبزدخشان (Merck) SS agar و BG agar کشت داده شد و مشابه شرایط قبل گرمخانه گذاری گردید. در انتها با استفاده از محیط‌های تفریقی TSI agar (Merck) و LI agar (Merck)، اوره (Himedia) و محیط آبگوشت تریپتون (Himedia) (تست ایندول)، حضور باکتری سالمونلا مورد تایید قرار گرفت.

**آزمایش مولتی پلکس PCR:** در این آزمایش باکتری سالمونلا تایفی موریوم (ATCC-25923) و سالمونلا انتریتیدیس (ATCC-13076) خریداری شده از شرکت MSTT International، به عنوان کنترل مثبت و آب مقطر استریل به عنوان کنترل منفی مورد استفاده قرار گرفت.

از کلنی‌هایی که در روش کشت مرسوم به عنوان باکتری سالمونلا مورد شناسائی قرار گرفته بود، با استفاده از کیت DNA Prep 100 (Diatom) استخراج گردید و به عنوان الگو در آزمایش m-PCR مورد استفاده قرار گرفت. تست m-PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل: PCR buffer (۵.۲ μl) (۵۰mM KCl, 200mM Tris HCl)، dNTPs (۲۵.۱ μl) (۱۰mM)، MgCl<sub>2</sub> (۱/۵ μl) (2mM)، هر یک از پرایمرها (۵۰.۰ μl)، Taq DNA polymerase (۵۰.۰ μl) (Fermentase)، DNA استخراج شده (۲ μl). مشخصات پرایمرهای مورد استفاده و در جدول ۱ آمده است. پرایمرهایی که ژن invA را مورد هدف قرار می‌دهد اختصاصی جنس سالمونلا و پرایمرهایی که ژنهای fliC و Prot6E را مورد هدف قرار می‌دهند به ترتیب اختصاصی سرووارهای تایفی موریوم و انتریتیدیس می‌باشند (۱۲، ۱۳). تکثیر ژن‌های هدف در دستگاه ترموسایکلر (Biorad, icycler) با برنامه سیکل‌های حرارتی شامل مرحله شروع در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل شامل ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۶۰ ثانیه، ۵۶ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، و مرحله بسط نهائی در ۷۲ درجه



تصویر ۱- نتایج آزمایش مولتی پلکس PCR با استفاده از ۳ جفت پرایمر: باند ۲۸۴bp از ژن invA اختصاصی جنس سالمونلا، باند ۵۵۹bp از ژن fliC اختصاصی گونه انتریتیدیس. ستون ۱: تایفی موریوم، باند ۱۸۰bp از ژن Prot6E اختصاصی گونه انتریتیدیس. ستون ۲: کنترل منفی - ستون ۳: کنترل سالمونلا تایفی موریوم - ستون ۴: مارکر ۱۰۰bp - ستون ۵: کنترل منفی - ستون ۶: نمونه مثبت سالمونلا تایفی موریوم - ستون ۷: کنترل سالمونلا انتریتیدیس - ستون ۸: نمونه مثبت سالمونلا انتریتیدیس - ستون ۹: کنترل منفی - ستون ۱۰: نمونه مثبت سالمونلا تایفی موریوم - ستون ۱۱: کنترل منفی - ستون ۱۲: نمونه مثبت سالمونلا انتریتیدیس - ستون ۱۳: کنترل منفی - ستون ۱۴: جنس سالمونلا.

هر دو ساعت یکبار و آب سردکن (چیلر) هر پنج ساعت یکبار تعویض می‌گردد. در این بررسی تعداد ۵۲ نمونه، از آب منبع، آب پیش سردکن و چیلر کشتارگاه صنعتی طیور مشهد با چهار تکرار به میزان ۵۰ میلی لیتر بوسیله سرنگ استریل نمونه برداری انجام شد. با توجه به زمان تخلیه آب در هر قسمت، از آب قسمت پیش سردکن در دو مرحله (انتهای ساعت اول و انتهای ساعت دوم پس از شروع کشتار). از آب چیلر در پنج مرحله (انتهای ساعات اول، دوم، سوم، چهارم و پنجم پس از شروع کشتار) و در هر مرحله از دو قسمت ابتدا و انتهای آن نمونه برداری گردید. نمونه‌ها در شرایط استریل و در مجاورت یخ به آزمایشگاه ارسال گردید.

**روش کشت مرسوم جهت تعیین حضور سالمونلا:** حجم ۲۵ میلی لیتر از نمونه آب را به ۲۲۵ میلی لیتر محیط کشت پیش غنی کننده لاکتوز براث (Himedia) اضافه نموده و در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری گردید، سپس یک میلی لیتر از محیط پیش غنی سازی



ویژگی ۱۰۰ درصد می باشد (۳). در این بررسی با استفاده از پرایمرهای S141 و S138 که ژن هدف آن *invA* می باشد، جهت شناسایی جنس سالمونلا استفاده گردید. ژن *fliC* کد کننده فاز ۱ فلاژلین می باشد و به اندازه کافی متنوع می باشد که می توان پرایمرهای اختصاصی جهت تشخیص هرآنتی ژن فلاژلار سالمونلا طراحی نمود (۱۵). در یک مطالعه با استفاده از تست PCR در تشخیص جنس سالمونلا و سرووار تایفی موربوم با استفاده از ژن های *invA* و *fliC* حساسیت این روش ۹۵ درصد و ویژگی آن ۹۶/۲ درصد گزارش گردید (۱۳). ژن *Prot6e* یک ژن پلاسمیدی است که اختصاصاً کد کننده فیمبریه سطحی در سالمونلا انتریتیدیس می باشد و استفاده از این ژن به عنوان هدف در تشخیص این سرووار سالمونلا دارای حساسیت ۹۵ درصد و ویژگی ۱۰۰ درصد می باشد (۱۲). در این مطالعه جهت تشخیص دو سرووار تایفی موربوم انتریتیدیس به ترتیب از ژن های *fliC* و *Prot6E* به عنوان هدف استفاده گردید. امروزه جهت انجام تست PCR تشخیصی، در بسیاری از آزمایشگاه ها، استفاده از کنترل تکثیر داخلی (IAC) اجباری می باشد، که مشخص کننده حضور احتمالی ممانعت کننده های DNA پلیمرز، اشتباه در افزودن اجزاء تست PCR و یا عدم کارکرد مناسب دستگاه حرارتی (thermal cycler) است، ولی استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *invA* به همراه سایر پرایمرها که اختصاصی سرووارهای مختلف می باشد، کارکردی همانند کنترل تکثیر داخلی دارد (۱۲). در این مطالعه ۱۹/۲ درصد از نمونه ها آلوده به جنس سالمونلا تشخیص داده شد، که از این تعداد ۳۰ درصد به عنوان سالمونلا انتریتیدیس و ۱۰ درصد به عنوان سالمونلا تایفی موربوم و ۶۰ درصد نیز به عنوان سایر سرووارهای سالمونلا تشخیص داده شد. با توجه به حضور سرووارهای بیماری زای باکتری در آب چیلر و امکان انتقال آن به لاشه ها، رعایت اصول بهداشتی، استفاده از ضد عفونی کننده های مجاز در آب چیلر جهت کاهش آلودگی لاشه ها و نیز سرعت جریان آب متقابل حرکت لاشه توصیه می گردد.

## References

- Amavisit, P., Browning, G.F., Lightfoot, D., Anderson, C.S. (2001). Rapid PCR detection of *Salmonella* in horse faecal samples, *Vet. Microbiol.* 79: 63-74.
- Capita, R., Alonso-Calleja, C., Garcia-Fernandez, M.C., Moreno, M. (2002). Trisodium Phosphate (TSP) treatment for decontamination of Poultry. *Food. Sci. Tech. Int.* 8:11-24.

سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه صورت گرفت. در این بررسی از نشانگر 100bp جهت مشخص نمودن اندازه باندها استفاده گردید. محصول نهائی در ژل های آگاروز ۱/۲ درصد مورد الکتروفورز قرار گرفت و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید با استفاده از اشعه UV بررسی گردید.

## نتیجه

در روش کشت مرسوم، تعداد ۱۰ نمونه (۱۹/۲ درصد) که تمامی آنها از نمونه آب چیلر بودند از نظر حضور جنس سالمونلا مثبت تشخیص داده شد. تعداد یک نمونه مربوط به ساعت سوم، تعداد ۴ نمونه مربوط به ساعت چهارم و تعداد ۶ نمونه مربوط به ساعت پنجم قبل از تعویض آب بود. در آزمایش مولتی پلکس PCR نمونه هائی که در روش کشت مرسوم به عنوان مورد شناسائی قرار گرفته بود مورد تایید قرار گرفت که از این تعداد، ۳ نمونه به عنوان سالمونلا انتریتیدیس و یک نمونه به عنوان سالمونلا تایفی موربوم مورد شناسائی قرار گرفت (تصویر ۱).

## بحث

چیلرها به منظور سرد کردن و کاهش بار آلودگی لاشه ها طراحی شده اند، ولی طبق نظر بسیاری از محققین، باکتری هایی که در تعداد کمی از لاشه ها حضور دارند، ممکن است با انتشار در آب چیلر به سایر لاشه ها منتقل شوند (۲). مرحله تخلیه امعا و احشا در پروسه خط کشتار اغلب منجر به پارگی لوله گوارشی گردیده و در نتیجه موجب آلودگی بیشتر باکتریائی لاشه ها می گردد، این لاشه ها می توانند به عنوان منبع آلودگی برای سایر لاشه ها عمل نمایند (۱۴)، بنابراین لاشه ها با میزان آلودگی بالا وارد قسمت های بعدی (پیش سردکن و چیلر) می گردند.

لاشه های طیور که به پیش سردکن و چیلر وارد می شوند در صورت آلوده بودن به پاتوژن خاص مانند سالمونلا می توانند موجب آلودگی سایر لاشه ها گردند. در تحقیقی در ۹ کشتارگاه صنعتی طیور نشان داده شد که ۵/۵ درصد لاشه هایی که به چیلر وارد می شوند و ۱۱/۶ درصد لاشه هایی که از چیلر خارج می شوند، آلوده به سالمونلا بودند (۲). این بررسی نشان می دهد که چیلرها نه تنها باعث حذف یا کاهش سالمونلا نمی شوند، بلکه خود به عنوان مکانی جهت انتقال متقابل این باکتری بین لاشه ها عمل می کنند.

استفاده از روش کشت مرسوم در مقایسه با روش PCR در تشخیص جنس سالمونلا از حساسیت کمتری برخوردار می باشد و مستلزم صرف وقت بیشتری می باشد (۷) بعلاوه روش مرسوم قادر به تشخیص کلنی های خشن سالمونلا نمی باشد و با استفاده از این روش نمی توان سرووارهای مختلف سالمونلا را تشخیص داد (۱۲). در سال ۲۰۰۳ طی یک پروژه تحقیقاتی بین المللی جهت استاندارد نمودن تست PCR در تشخیص پاتوژن های مهم، مناسبترین ژن هدف جهت تشخیص جنس سالمونلا ژن *invA* معرفی گردید، که دارای حساسیت ۹۹/۶ درصد و



3. Cason, J., Berrang, M., Buhr, R., Cox, N (2004). Effect of pre-chill fecal contamination on numbers of bacteria recovered from broiler chicken carcasses before and after immersion chilling. *J. Food. Prot.* 67:1829-1833.
4. Cunningham, F.E., Cox, N.A (1987). *Microbiology of Meat*. 1st ed. Academic Press INC. p. 193-205
5. Herikstad, H., Motarjemi, Y., Tauxe, R.V (2002). *Salmonella* surveillance: a global survey of public health serotyping. *Epidemiol. Infect.* 129: 1-8.
6. Herrera-León, S., McQuiston, J. R., Usera, M. A., Fields, P. I., Javier Garaizar, J., Echeita, M. A (2004). Multiplex PCR for Distinguishing the Most Common Phase-1 Flagellar Antigens of *Salmonella* spp. *J. Clin. Microbiol.* 42: 2581-2586.
7. Kong, R.Y.C., Lee, S.K.Y., Law, T.W.F., Law, S.H.W., R.S.S. Wu, R.S.S (2002). Rapid detection of six types of bacterial pathogens in marine waters by multiplex PCR, *Wat. Res.* 36: 2802-2812.
8. Malorny, B., Bunge, C., Helmut, R. (2007). A real-time PCR for detection of *Salmonella Enteritidis* in poultry meat and consumption eggs. *J. Microbiol. Methods.* 70: 245-251.
9. Malorny, B., Hoorfar, J., Bunge, C., Helmuth, R. (2003a). Multicenter Validation of the Analytic Accuracy of *Salmonella* PCR: toward an international standard. *Appl. Environ Microbiol.* 69: 290-296.
10. Malorny, B., Hoorfar, J., Hugas, M., Heuvelink, A., Fach, P., Ellerbyoek, L., Bunge, C., Dorn, C., Helmuth, R. (2003b). Interlaboratory diagnostic accuracy of a *Salmonella* specific PCR-based method. *Inter. J. Food Microbiol.* 89: 241-249.
11. Oliveira, S.D., Santos, L.R.D., Schuch, M.T., Silva, A.B.C., Salle, T.P., Canal, C.W. (2002). Detection and identification of *salmonellas* from poultry-related samples by PCR. *Vet. Microbiol.* 87: 25-35.
12. Rahn, K., DeGrandis, S., Clarke, R., McEwen, S. (1992). Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Mol. Cell. Probe.* 6: 271-279.
13. Soumet, C., Ermel, G., Rose, N., Rose, V., Drouin, P., Salvat, G., Colin, P (1998). 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.
14. Winfield, M.D., Groisman, E.A (2003). Role of nonhost environments in the lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 3687-3694.
15. Zhu, Q., Lim, C.K., Chan, Y.N. (1996). Detection of *Salmonella typhi* by polymerase chain reaction. *J. Appl. Microbiol.* 80: 244-251.



# CONTAMINATION OF WATER USED FOR CHILLING OF POULTRY CARCASSES TO *SALMONELLA TYPHIMURIUM* AND *SALMONELLA ENTERITIDIS* USING MULTIPLEX-PCR METHOD

Jamshidi, A.<sup>1\*</sup>, Naghdipour, D.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Hygiene, School of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad- Iran.

<sup>2</sup>Graduated from School of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad- Iran.

(Received 14 June 2010 , Accepted 31 January 2011)

---

## Abstract:

Poultry products have been recognized as a major source of human illness caused by *Salmonella* serovars. The water content of pre-chiller and chiller in processing line could be the source of cross contamination. Water contents of pre-chillers and chillers, in Mashhad poultry abattoirs are regularly changed every 2 and 5 hours respectively. In this study, a total of 52 water samples were collected from the main tank, the pre-chiller, the initial and the final sections of the chiller in different hours and during four consecutive days. In order to isolate *Salmonella spp.*, conventional culture method: including pre- enrichment, enrichment, selective plating and differential plating were performed. To confirm the identification of isolated colonies as *Salmonella spp.* and determining serovars as *Typhimurium* and *Enteritidis* serovars, a multiplex PCR (m-PCR) assay, using three pairs of primers were employed. S141 and S139 for InvA gene, specific for the genus of *Salmonella*, Fli15 and Tym for *FliC* gene, specific for *Typhimurium* serovar and Prot6e-5 and Prot6e-6 for *Prot6E* gene, specific for *Enteritidis* serovar. Number of ten samples (19.2%) were determined as contaminated with *Salmonella spp.* All positive samples were from the source of water chiller and the highest rate of contamination was determined in the final hours before refilling of chiller water. In m-PCR assay, number of 1 (1.9%) of isolated colonies were confirmed as *Salmonella Typhimurium* and number of 3 (5.8%) of isolated colonies were confirmed as *Salmonella Enteritidis*. Considering the presence of pathogenic bacteria in chiller water, using counter flow of water and using disinfectants are recommendable.

**Key words:** *Salmonella spp.*, *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Enteritidis*, multiplex PCR.

\*Corresponding author's email: jamshidi638@yahoo.com, Tel: 0511-8802614, Fax: 0511-6620166

