مجله تحقیقات دامپزشکی
دوره ۷۵، شماره ۴، ۱۳۹۹، ۵۳۶-۵۲۹
مقاله پژوهشی

شناسایی سالمونلاهای جداشده از گاوداری‌های شیری استان تهران و البرز با استفاده از روش‌های کلاسیک و مولکولی

هادی غفاری[۱]، تقی زهرایی‌صالحی[۲]، فرهاد موسی‌خانی[۳]

[۱] *گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، کرج، ایران*
[۲] *گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران*
[۳] *گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، کرج، ایران*

تاریخ دریافت: ۲۵ فروردین ماه ۱۳۹۹، **تاریخ پذیرش:** ۲۷ خرداد ماه ۱۳۹۹
10.22059/jvr.2020.232882.2626

چکیده

زمینهٔ مطالعه: سالمونلا در گاوداری‌های با تراکم بالا بومی می‌شود و سالمونلوز عامل مرگ و میر در گوساله‌ها می‌باشد. شیوع بیماری و تلفات معمولاً ناشی از اشتباهات مدیریتی و عوامل استرس‌زای محیطی است که باعث تضعیف سیستم ایمنی و در معرض قرار گرفتن میزبان به پاتوژن می‌شود.

هدف: در این مطالعه از روش PCR برای شناسایی *سالمونلا انتریتیدیس*، *اینفنتیس*، *دابلین* و سرووارهای دیگر در نمونه‌های اسهال گوساله و جنین سقط شده در گاوداری‌های شیری استان تهران و البرز استفاده شد. مشاهدات بعدی نشان داد که *سالمونلا انتریتیدیس* و *سالمونلا اینفنتیس* ارتباط نزدیکی با پودر گوشت مرغی آلوده که در جیره غذایی استفاده شده دارد.

روش‌کار: ۴۱ نمونه جدا شده از اسهال گوساله و جنین سقط شده در گاوداری‌های استان تهران و البرز پس از تایید با آزمایش‌های بیوشیمیایی، برای سروتایپینگ با آنتی سرم‌های پلی والان و منو والان مورد آزمایش قرار گرفتند. DNA باکتری‌ها با روش جوشاندن استخراج شد و حضور ژن‌های اختصاصی *سالمونلا انتریتیدیس*، *اینفنتیس* و *دابلین* با پرایمرهای اختصاصی ردیابی شد.

نتایج: تمام نمونه‌ها درآزمایش PCR مثبت بودند. ۳۲ نمونه *سالمونلا انتریتیدیس* (۷۸/۰۴ درصد)، ۴ نمونه *سالمونلا اینفنتیس* (۹/۷۷ درصد) و پنج نمونه *سالمونلا دابلین*(۱۲/۱۹ درصد) شناسایی شدند.

نتیجه‌گیری نهایی: با توجه به نتایج به نظر می‌رسد PCR می‌تواند به عنوان یک روش جایگزین به جای روش‌های بیوشیمیایی و سرولوژیکی گران قیمت و وقت گیر برای شناسایی سرووارهای سالمونلا باشد. جداسازی *سالمونلا انتریتیدیس*که معمولاً ازطیور جدا می‌شود، ممکن است به دلیل استفاده از پودر گوشت مرغی درجیره غذایی گاوداری‌ها باشد.

کلمات کلیدی: سالمونلا، گوساله، PCR، سروتایپینگ، پودر گوشت

کپی‌رایت © تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است.

نویسنده مسئول: فرهاد موسی‌خانی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، کرج، ایران
پست الکترونیکی: fmoosakhani@kiau.ac.ir

مقدمه

جنس سالمونلا یکی از پنجاه و سه جنس و یکی ازمهم‌ترین جنس‌های خانواده انتروباکتریاسه محسوب می‌شود. تاکنون بیش از ۲۶۵۸ سرووار در این جنس شناخته شده و هرسال ده الی بیست سرووار جدید شناسایی و به آن‌ها افزوده می‌شود (۱۲)، تمامی سرووارهای این باکتری بالقوه بیماریزا بوده و طیف وسیعی از میزبان‌ها ازجمله انسان، طیور، پستانداران، ماهی‌ها و حتی برخی از بی‌مهرگان را آلوده می‌نماید (۱۰،۱۱،۲۹،۳۰،۳۱). سرووارهای سالمونلا را می‌توان به عنوان یکی از عوامل مهم ایجاد

بیماری در مرغداری‌ها و دامداری‌ها نام برد (۴). اگر فرآورده‌های غذایی اضافه شده به جیره دام به صورت اصولی و بهداشتی تهیه نشوند می‌توانند باعث ایجاد بیماری و خسارت‌های اقتصادی به صنعت دامپروری شوند. لذا برای جلوگیری از این موارد می‌توان از جداسازی عوامل بیماریزا بر پایه کشت، آزمون‌های بیوشیمیایی، سرولوژی و ملکولی به ویژه PCR کمک گرفت (۲۴). در مطالعه‌ای تحت عنوان بررسی چهره‌های بالینی سالمونلوز و میزان شیوع گروه‌های سرمی در گوساله که توسط Nadalian و همکاران در سال ۲۰۰۷ انجام گرفت پس انجام آزمون بر پایه کشت از مجموع ۱۳۲ نمونه مورد بررسی، ۱۸ نمونه سالمونلا شناخته شدند که از این تعداد بعد از آزمایشات تعیین گروه سرمی، ۱ نمونه (۵/۵ درصد) در گروه C۱، ۱ نمونه (۵/۵ درصد) در گروه C۲، ۵ نمونه (۲۷/۸ درصد) در گروه B و۱۱ نمونه (۶۱/۲ درصد) در گروه D قرار داشتند (۱۹). Zahraei و همکاران در سال ۲۰۰۵ در مطالعه‌ای تحت عنوان کاربرد توام روش جداسازی ایمینیومگنتیک و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز چندتایی جهت جستجو و ردیابی *سالمونلا انتریکا* تحت گونه انتریکا سرواز *تیفی موریوم* در نمونه‌های مدفوع اسهالی گاو پس از آزمایش باکتریولوژی از ۴۰۰ نمونه مدفوع اسهالی گاو ۳۳ مورد سالمونلا تشخیص داده شد و بعد از آزمایش آگلوتیناسیون از این ۳۳ مورد، تعداد ۳ جدایه *سالمونلا دابلین* (۹/۱درصد)، ۱ جدایه *سالمونلا انتریتیدیس* (۳ درصد) که هر دو در گروه D می‌باشند و ۲۲ نمونه *سالمونلا تیفی موریوم* (۶۶/۷ درصد) که در گروه B هستند نشان داده شد، سپس با استفاده از پرایمر اختصاصی مورد آزمایش PCR قرار گرفتند که از میان آن‌ها در نمونه‌های واجد سروتیپ دابلین و انتریتیدیس تنها یک باند ۲۸۴ جفت باز مربوط به ژن *invA* و چهار باند ۶۶۳، ۵۲۶، ۲۸۴ و ۱۸۳ که به ترتیب مربوط به ژن‌های *rfbJ*، *fljb*، *invA* و*fliC* در کلیه نمونه‌های واجد تیفی موریوم مشاهده شد (۳۴).

سالمونلاها به مدت طولانی در محیط خارج از بدن زنده می‌مانند ولی حاملین آن‌ها منبع مهمی در این رابطه می‌باشند و در انتشار آن در محیط دامداری نقش زیادی دارند. بنابراین شناسایی این حاملین در بروز بیماری‌ها نقش بسزایی در کنترل و پیشگیری از وقوع موارد جدید داشته و درنتیجه یکی از عوامل مهم در جلوگیری از ضررهای اقتصادی این بیماری است (۱۳،۱۵،۱۷،۳۱).

مواد و روش‌کار

در مطالعه حاضر ۴۱ جدایه مشکوک به سالمونلا (۳۵ جدایه مربوط به اسهال گوساله‌ها و ۶ جدایه متعلق به جنین سقط شده) که از گاوداری‌های شیری استان تهران و البرز جداسازی شده بودند، مورد بررسی قرار گرفتند. این جدایه‌ها ابتدا با استفاده از خواص بیوشیمیایی و تعیین گروه سرمی با آنتی سرم‌های اختصاصی شرکت BD و Diffco شناسایی شده سپس جهت تأیید نهایی آن‌ها، از آزمون PCR استفاده گردید (۳،۲۷). برای انجام آزمون PCR ابتدا استخراج DNA باکتری‌ها به روش جوشاندن صورت گرفت. بدین شکل که چند کلنی از باکتری کشت داده شده در محیط LB آگار در ۳۰۰ میکرو لیتر آب مقطر استریل در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شد و پس از مرحله سانتریفیوژ مقدار ۱۰۰ میکرولیتر مایع رویی برداشت شده و تا زمان آزمون PCR در۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید (۳،۲۷،۲۸،۳۱). در این تحقیق از سوش‌های *سالمونلا انتریتیدیس*، *اینفنتیس* و *دابلین* تأیید شده که در گنجینه میکروبی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران نگهداری می‌شدند به عنوان شاهد مثبت و از آب دو بار تقطیر دیونیزه نیز به عنوان شاهد منفی استفاده شد (۱،۲۴،۲۶).

انجام آزمون PCR: مواد مورد استفاده در واکنش PCR از شرکت سینا کلون تهیه شد که شامل مسترمیکس و پرایمرهای اختصاصی برای تشخیص *سالمونلاهای دابلین*، *انتریتیدیس* و *اینفنتیس* بودند (جداول ۱،۲،۳). حجم واکنش برای هر نمونه ۲۵ میکرو لیتر محاسبه شد و برنامه حرارتی در ۳۵ سیکل انجام گرفت (۹،۳۰). در این تحقیق از ژل آگارز۱/۲ درصد استفاده شد و به میزان ۵ میکرولیتر از محصول PCR به چاهک‌ها انتقال یافت و در کنار آن‌ها دو چاهک شاهد مثبت و منفی نیز در نظر گرفته شد (۱،۱۷،۲۴،۲۵). مارکر مورد استفاده در این مطالعه ۱۰۰bp و مربوط به شرکت سینا کلون انتخاب گردید. سپس ژل در داخل مخزن الکتروفورز حاوی بافر TBE 1X قرار گرفت و به مدت یک ساعت با ولتاژ ۱۲۰ و تواتر ۷۴ آمپر، الکتروفورز صورت گرفت. برای رنگ‌آمیزی به مدت ۱۰ تا ۲۰ دقیقه در محلول اتیدیوم بروماید قرار گرفت و ژل بعد از شستشو با آب بر روی دستگاه ژل داکیومنتیشن قرائت شد (۹،۱۳،۲۷،۳۰).

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده برای شناسایی *سالمونلا دابلین* (۲۷).

طول باند	ژن	دمای اتصال	توالی (´۳- ´۵)	پرایمر
۱۰۵ bp	1126 *SeD A*		ATCGGTGCTGGGTAATTTTG AGGAACGAGAGAAACTGCTT	DMP1F DMP1R
۲۰۳ bp	1104 SeD A	۶۰ درجه سانتی‌گراد	ACGCGAAATCTGATGGTCTT GCCCACCAGTTGTGAAAGGC	DMP2F DMP2R
۲۹۶ bp	227 SeD A		ATCACCCTCGCAAACTTGTC TCGGGCAATCAGGTCGCCGA	DMP3F DMP3R

جدول ۲. پرایمرهای مورد استفاده برای شناسایی *سالمونلا اینتریتیدیس* (۳۳).

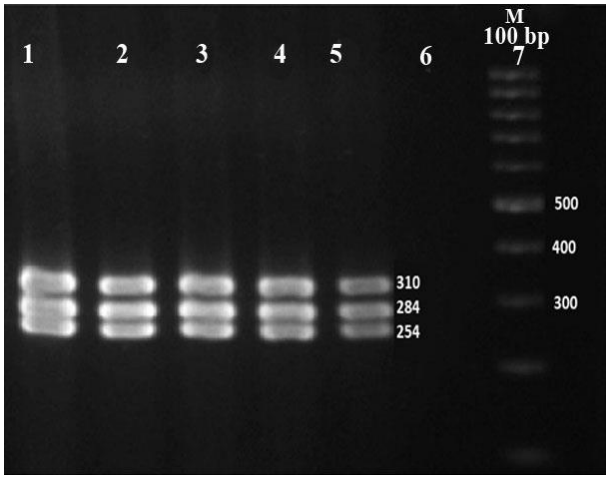
طول باند	ژن	دمای اتصال	توالی (´۳- ´۵)	پرایمر
۴۲۹ bp	*invA*		GCCAACCATTGCTAAATTGGCGCA GGTAGAAATTCCCAGCGGGTAACTGG	ST11 ST14
۲۵۰ bp	*spv*	۵۶ درجه سانتی‌گراد	GCCGTACACGAGCTTATAGA ACCTACAGGGGCACAATAAC	S1 S4
۳۱۰ bp	*sefA*		GCAGCGGTTACTATTGCAGC TGTGACAGGGACATTTAGCG	SEFA2 SEFA4

جدول ۳. پرایمرهای مورد استفاده برای شناسایی *سالمونلا اینفنتیس* (۳۲).

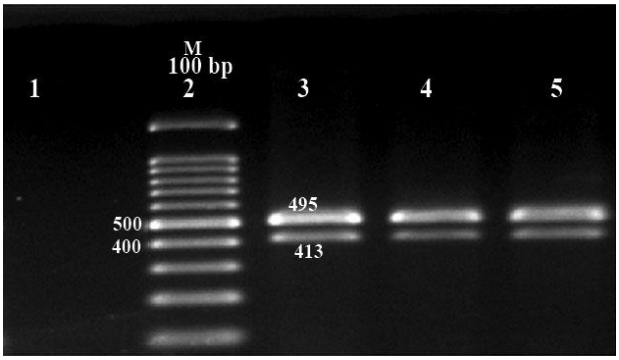
طول باند	ژن	دمای اتصال	توالی (´۳- ´۵)	پرایمر
۴۱۳ bp	*fijB*	۵۶ درجه سانتی‌گراد	TTGCTTCAGCAGATGCTAAG CCACCTGCGCCAACGCT	558F 1275R
۴۹۵ bp	*hut*		ATGTTGTCCTGCCCCTGGTAAGAGA ACTGGCGTTATCCCTTTCTCTGCTG	Hut-F Hut-R

نتایج

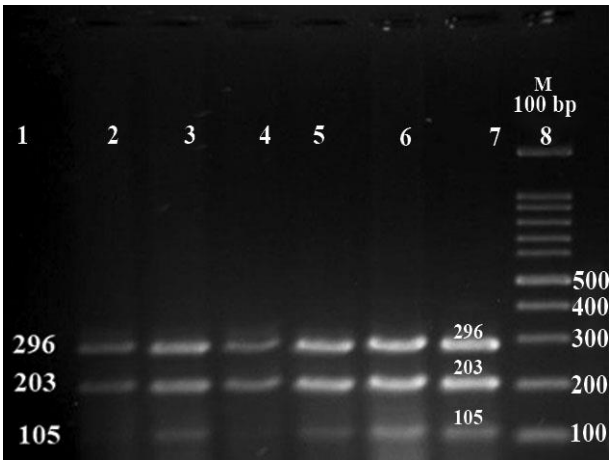
آزمایشات بیوشیمیایی و سروتایپینگ: پرگنه‌های لاکتوز منفی در محیط مک کانکی مربوط به تمامی ۴۱ جدایه، مورد آزمایش‌ها بیوشیمیایی قرار گرفتند که در محیط TSI به‌صورت ALK/A و H2S مثبت مشاهده شده و از نظر هیدرولیز اوره منفی بودند. آزمون اندول و وژس پروسکوئر جدایه‌ها منفی و آزمایش‌های متیل رد و مصرف سیترات آن‌ها مثبت بود. همچنین تمامی جدایه‌ها ازنظر حرکت مثبت بودند. در آزمایش‌های مربوط به تعیین گروه سرمی، ۳۷ جدایه در گروه D و ۴ جدایه نیز در گروه C جدول کافمن - وایت قرار گرفتند (۹۰/۲۳ درصد). در تعیین سرووار تاژکی مربوط به گروه D، ۳۲ جدایه (۱،۹،۱۲،g.m) *سالمونلا اینتریتیدیس* (۷۸/۰۴ درصد) و ۵ جدایه هم (۱،۹،۱۲،g.p) *سالمونلا دابلین* تشخیص داده شد (۱۲/۱۹ درصد). چهار جدایه مربوط به گروه C (۶،۷،r،۱و۵) نیز *سالمونلا اینفنتیس* شناسایی گردید (۹/۷۷ درصد) (نمودار ۱).



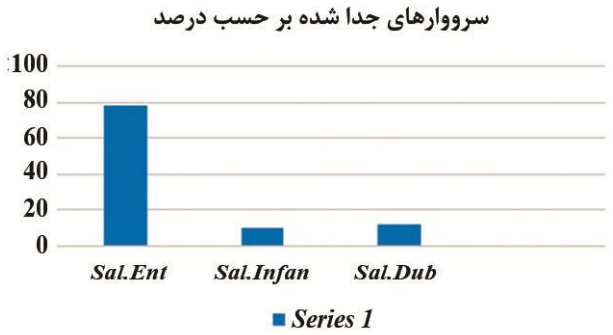
تصویر ۱. ژل الکتروفورز *سالمونلا انتریتیدیس*: چاهک ۱: مارکر 100bp، چاهک ۲: کنترل منفی، چاهک ۳ تا ۶: مربوط به ژن *InvA* با وزن ۲۸۴، ژن *sefA* با وزن ۳۱۰ و ژن *spv* با وزن ۲۵۴، چاهک ۷: کنترل مثبت.



تصویر ۲. ژل الکتروفورز *سالمونلا اینفنتیس*: چاهک ۱:کنترل منفی، چاهک ۲: مارکر ۱۰۰bp، چاهک ۳ و ۴: مربوط به ژن *fljB* با وزن ۴۱۳ و ژن *hut* با وزن ۴۹۵، چاهک ۵: کنترل مثبت.



تصویر ۳. ژل الکتروفورز *سالمونلا دابلین*: چاهک ۱: مارکر ۱۰۰bp، چاهک ۲: کنترل مثبت، چاهک ۳ تا ۷: مربوط به ژن‌های *SeD_A1126*، *SeD_A1104* و ژن *SeD_A2276* و چاهک ۸: کنترل منفی.



نمودار ۱. آمار مربوط به سرووارهای جداشده: *سالمونلا انتریتیدیس* (۷۸/۰۴ درصد) *سالمونلا دابلین* (۱۲/۱۹ درصد) و *سالمونلا اینفنتیس* (۹/۷۷ درصد) می‌باشد.

نتایج آزمون PCR: نتایج مربوط به این آزمون که به روش مولتی پلکس PCR و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی مربوط به *سالمونلا اینتریتیدیس*، *سالمونلا اینفنتیس* و *سالمونلا دابلین* انجام شده بود در تصاویر ۱، ۲ و ۳ نشان داده شده است. باندهای مشاهده شده مربوط به‌تمامی ژن‌ها با کنترل مثبت مورداستفاده همخوانی داشته و در کنترل منفی باندی مشاهده نشد.

بحث

تشخیص آزمایشگاهی سالمونلا به طور معمول با محیط‌های غنی کننده انتخابی یا غیر انتخابی و متعاقب آن کشت روی محیط‌های انتخابی صورت می‌گیرد که حداقل ۴ تا ۵ روز زمان بر است و امکان بروز پاسخ منفی کاذب هم وجود دارد درحالی که می‌توان از روش PCR برای شناسایی سریع‌تر سالمونلا استفاده نمود (۵،۷،۸).

Rhan و همکاران در سال ۱۹۹۲ تکثیر ژن *invA* را به‌عنوان روش اختصاصی برای تعیین جنس سالمونلا استفاده نمود. در این مطالعه اشاره شده است که تمامی سالمونلاها حاوی ژن *invA* هستند و از این ژن در شناسایی جنس سالمونلا می‌توان استفاده کرد (۲۴). در مطالعه حاضر نیز از تکثیر ژن *invA* برای تعیین جنس سالمونلا استفاده شد که تمامی جدایه‌ها، این ژن را دارا بودند. Cloutheir و همکاران در سال ۱۹۹۲ گزارش نمودند اپرون *sef* در *سالمونلا انتریتیدیس* بیش از سایر فیمبریه‌ها مورد مطالعه قرار گرفته است (۸). اپرون *sef* در *سالمونلا انتریتیدیس* دارای سه ژن *sefC*،*sefB*، *sefA* می‌باشد که عهده‌دار بیوسنتز فیمبریه SEF14 می‌باشند که در بین آن‌ها ژن *sefA* جز اصلی فیمبریه SEF14 (فیمبرین) را رمزدهی می‌نماید. البته ژن‌های *sefD* و*sefE* نیز بعدا در اپرون *sef* شناسایی گردیدند (۶). ژن *sef* فقط در سالمونلاهای گروهD حضور دارد (۵،۷). Choen و همکاران در سال ۱۹۹۶ موفق شدند بوسیله PCR و با استفاده از ژن *fimA* جدایه‌های متعلق به جنس سالمونلا را از جدایه‌های متعلق به غیر این جنس سالمونلا تفریق نماید (۵). اما ژن *fimA* برای تفریق سروتیپ‌های گوناگون سالمونلا از همدیگر قابل استفاده نبود (۵). در تحقیقی که Woodward و همکاران در سال ۱۹۹۶ برروی شناسایی میکروب‌های مواد غذایی بسته‌بندی شده با استفاده از روش Multiplex-PCR انجام دادند، *سالمونلا انتریتیدیس* شناسایی شد. در گزارشاتی که از مطالعات قبلی بدست آمده از پرایمرهای S1-S4 برای شناسایی ژن حدت *SPV* استفاده شده ولی این ژن در همه نمونه‌های جدا شده یافت نشده است (۳۲). در تحقیقات Woodward در سال ۱۹۹۶ این ژن فقط ۳۰ درصد

از *سالمونلا انتریتیدیس*های جدا شده از پرندگان یافت شد (۳۲) و حضور این ژن در مقایسه با *سالمونلا انتریتیدیس*های جدا شده در مطالعات Pan در سال ۲۰۰۲ به میزان بیشتری افزایش پیدا کرده است (۲۲). Chu و Jonathan در سال ۱۹۹۶ با استفاده از روش غنی سازی مدفوع روی ژن‌های *invA* و *spv* سالمونلا با روش PCR تحقیقاتی را انجام دادند و به این نتیجه رسیدند که محیط‌های غنی کننده به طور فزاینده‌ای باعث افزایش باکتری‌های مورد نظر شده و استخراج DNA راحت‌تر و بهتر صورت می‌گیرد (۷). همچنین Khan در سال ۱۹۹۹ نشان داد که ژن *invA* یک ژن ضروری برای ورود و تهاجم باکتری به قسمت‌های عمیق‌تر بافت است (۱۵). Pan در سال ۲۰۰۲ نشان داد برای شناسایی *سالمونلا انتریتیدیس* می‌توان از پرایمرهای SEFA که مربوط به تاژک آن‌هاست استفاده کرد (۲۲). در مطالعه حاضر ژن *sefA* و *spv* در همه جدایه‌های اینتریتیدیس مشاهده شد.

Itoh و همکاران در سال ۱۹۹۷ با پرایمرهای rfbE و fliC که به ترتیب برای تکثیر ژن‌های *rfbE* و *fliC* *سالمونلا دابلین* هستند استفاده نمودند (۱۳). Mirmoeini و همکاران نیز در سال ۲۰۰۸ با تکثیر ژن *SopE* و مشاهده باند آن در ۳۹۹bp حضور سالمونلا دابلین را تأیید کردند (۱۷). در این مطالعه نیز از تکثیر ژن‌های *SeD_A1226*، SeD_A1104 و*SeD_A2276* برای شناسایی *سالمونلا دابلین* استفاده گردید که پنج نمونه (۱۲/۱۹ درصد) *سالمونلا دابلین* شناخته شدند.

با توجه به بیماریزایی سالمونلاها در انسان و دام و خسارات اقتصادی فراوان این باکتری، شناسایی سریع و قطعی آن در مراحل اولیه بسیار حائز اهمیت می‌باشد. برای این مورد مطالعات فراوانی صورت گرفته است (۲۴،۲۸). Amavisit و همکاران در سال ۲۰۰۰ با استفاده از غنی‌سازی مدفوع اسب‌های مشکوک به سالمونلوز با استفاده از روش PCR به نتایج جالبی دست یافتند. پرایمرهای مورد نظر آن‌ها در این تحقیق S18 و S19 بود. با استفاده از این پرایمرها ژن مورد نظر یعنی *ompC* را تکثیر نمودند (۲). همچنین Oliveira در سال ۲۰۰۳ با آزمون PCR و با استفاده از پرایمر invA که مختص شناسایی جنس سالمونلا هستند توانست از نمونه‌هایی که بصورت منفی کاذب که بصورت متداول رخ می‌دهند بکاهد امروزه از ژن *invA* که یک استاندارد جهانی برای شناسایی جنس سالمونلا است به‌صورت متداول استفاده می‌شود (۲۱).

Zahraei و همکاران در سال ۲۰۰۷ در رابطه با شناسایی باکتری سالمونلا و سروارهای آن‌ها از۴۰۰ نمونه اسهال گاو با استفاده از آزمون Multiplex PCR و استفاده از چهار جفت پرایمر بنام پرایمرهای S_{139} وS_{141} برای ژن*invA* که تعیین کننده سالمونلا بودن است و پرایمرهای *RrfbJ* ، *FliC* و *FljB* که به ترتیب ژن هدف آن‌ها *FliC*،*rfbJ* و *FljB* استفاده نمودند (۳۳). نتیجه آن ۳۳ مورد (۸/۲۵ درصد) از ۴۰۰ نمونه آلوده به سالمونلا بودند، از این ۳۳ مورد ۲۲ مورد *سالمونلا انتریکا* سروتیپ *تیفی موریوم* (۶۶ درصد) و ۳ مورد مربوط به سروتیپ دابلین بودند (۳۳). در این تحقیق از تکثیر ژن‌های *SeD_A1226*، *SeD_A1104* و *SeD_A2276* برای شناسایی *سالمونلا دابلین* استفاده گردید که پنج نمونه (۱۲/۱۹ درصد) *سالمونلا دابلین* شناخته شدند. ولی در مطالعه حاضر چه در آزمایش‌های سرمی و چه در روش PCR *سالمونلا تیفی موریوم* شناسایی نشد.

Amini و همکاران در سال ۲۰۱۰ از آزمون Multiplex PCR برای جداسازی *سالمونلا انتریتیدیس* و شناسایی حضور ژن‌های *spv* و *invA* در ۱۰۰۱ نمونه از پرندگان که از کشتارگاه‌های طیور استان کرمان ارسال شده بودند استفاده نمودند و در آن مطالعه از آزمایش‌ها بیوشیمیایی و سرولوژیکی برای شناسایی سالمونلا استفاده شد و میزان ۶۸ نمونه (۶/۷۹ درصد) سالمونلا بود نشان مورد تأیید قرار گرفت (۳). در این تحقیق از تکثیر ژن‌های *invA*، *spv* و*sefA* برای شناسایی *سالمونلا انتریتیدیس* استفاده شد که حدود ۳۲ نمونه (۷۸/۰۴ درصد) *سالمونلا انتریتیدیس* شناخته شدند.

در مطالعه‌ای تحت عنوان شیوع *سالمونلا تیفی موریوم* در شیرهای خام گاو، گوسفند و بز عرضه شده در استان چهار محال و بختیاری که توسط Tadjbakhsh و همکاران در سال ۲۰۱۳ انجام گرفت پس انجام آزمون بر پایه کشت از مجموع ۵۵۰ نمونه مورد بررسی، ۲۰ نمونه سالمونلا شناخته شدند که از این تعداد نمونه‌های آلوده شامل ۱۴ نمونه (۲/۵۴درصد) شیر گاو، ۲ نمونه (۰/۳۶ درصد) شیر گوسفند و ۴ نمونه (۰/۷۲ درصد) شیر بز بودند. از ۲۰ جدایه سالمونلا به روش کشت ۹ جدایه (۱/۳۶ درصد) در PCR به‌عنوان *سالمونلا تیفی موریوم* مورد تأیید قرار گرفتند (۲۸).

Peyghambari و همکاران در سال ۲۰۱۴ در مطالعه‌ای تحت عنوان جستجوی *سالمونلا انتریکا سرووار اینفنتیس* با PCR در بین جدایه‌های گروه C سالمونلای طیور، پس از آزمایش آگلوتیناسیون روی لام برای تعیین گروه سرمی، کلیه ۱۰۰ جدایه سالمونلا در گروه C طبقه‌بندی شدند. سپس با استفاده از پرایمر

اختصاصی، ۱۰۰ جدایه سالمونلای گروه C مورد آزمایش PCR قرار گرفتند که از مجموع آن‌ها ۷۹ جدایه باند اختصاصی ۴۱۳bp را برای *سالمونلا اینفنتیس* نشان دادند (۲۳). در این تحقیق پس از تکثیر ژن‌های *hut* و*fljB* چهار نمونه (۹/۷۷ درصد) *سالمونلا اینفنتیس* شناخته شدند (۲۲). Ghodusi و همکاران نیز در سال ۲۰۱۴ با بررسی ۴۶ نمونه اخذ شده از ماکیان شمال ایران و پس از سروگروپینگ و انجام آزمون PCR و با استفاده از پرایمرهای ۱۲۷۵r و ۵۵۸f، نشان دادند که ۴۴ نمونه مربوط به *سالمونلا اینفنتیس* می‌باشند. در این مطالعه نیز ۴ جدایه *سالمونلا اینفنتیس* تشخیص داده شدند (۹).

نتیجه‌گیری نهایی: با بررسی اپیدمیولوژیکی که انجام گرفت برای مشخص نمودن علت اینکه چرا سروارهای *سالمونلا انتریتیدیس* و *سالمونلا اینفنتیس* که در تحقیقات مختلف بیشتر از طیور جدا شده است، ازگاوداری‌های استان تهران و البرز جدا شده است مشخص شد که این گاوداری‌ها مدتی است که از پودر گوشت طیور استفاده می‌کنند و به نظر می‌رسد برای تهیه پودر گوشت، از درجه حرارت پایین‌تر از حد استاندارد در کارخانه‌های تولید کننده استفاده می‌گردد و همین دلیل موجب شده است که این سالمونلاها در پودر تهیه شده زنده بمانند و به گاوها منتقل شود.

سپاسگزاری

نویسندگان برخودلازم می‌دانند تا مراتب قدردانی خود را از زحمات دکتر علیرضا شقایق، دکتر ایرج اشرافی‌تمای و سرکار خانم دکتر رامک یحیی رعیت به عمل آورند.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. Agron, G.P., Walker, R.L., Kind, H., Sawyer, S.J, Hayes, D.C., Wollard, J., Anderson, G.L. (2001). Identification by subtractive hybridization of sequence specific for *Salmonella serovar enteritidis*. Appl Environ Microbiol, 67(11), 4984–4991, https://doi/10.1128/AEM.67.11.4984-4991
2. Amavisit, P., Browning, G.F., Lightfoot, D., Church, S., Anderson, G.A., Whithear, K.G., Markham, P.F. (2001). Rapid PCR detection of Salmonella in horse fecal samples. Vet Microbiol, 79, 63-74. https://doi.org/10.1016/s0378-1135(00)00340-0 PMID: 11230929
3. Amini, K., Zahraei Salehi, T., Nikbakht, G., Ranjbar, R., Amini, J., Ashrafganjooei, S.H. (2010). Molecular detection of *invA* and *spv* virulence genes in *Salmonella enteritidis* isolated from human and animals in iran. African J Microbiol Res, 4(21), 2202-2210.
4. Chloe, K.B., Mortimer., Tansy, M.P., Saheer, E.G, Julie, M.J.L., Catherine, A. (2004). Towards the development of a DNA-sequence based approach to serotyping of *Salmonella enterica*. J BMC Microbiology, 4(31),1-10.
5. Choen, H.J., Mechanda S.M., Lin, W. (1996). PCR amplification of the *fimA* gene sequence of *Salmonella typhymurium*, a specific method for detection of *salmonella Spp*. Appl Environ Microbiol, 62, 4303-4308. PMID: 8953701
6. Chollighan, R.J., Woodward, M.J. (2001). The SEF14 fimberial antigen of *Salmonella enteritidis* is encoded within a pathogenicity islet. Vet Microbiol, 80, 235-245. https://doi.org/10.1016/s0378-1135(01)00309-1 PMID: 11337139
7. Chu, C.H., Jonathan, T.O. (1996). Rapid identification of Salmonella serovars in feces by specific detection of virulence gene, *invA* and *spv* enrichment broth culture – multiplex PCR combination assay, J Clin Microbial, 34, 2619-2622. PMID: 8880536
8. Cloutheir, S.C., Muller, K.H., Doran, J.L., Collinson, S.K., Kay, W.W. (1993). Characterization of three fimbrial genes, *sefABC*, of *Salmonella enteritidis*. J Bacteriol, 175(9), 2523-33. https://doi.org/10.1128/jb.175.9.2523-2533.1993
9. Ghoddusi, A., Nayeri Fasaei, B., Karimi, V., Ashrafi, T.I. (2014). Molecular identification of *Salmonella infantis* isolated from backyard chickens and detection of their resistance genes by PCR. Iran J Vet Res, 16 (3), 293-7. PMID: 27175192
10. Gyles, C.L., Prescott, J.f., Songer, F.J., Thoen, C.O. (2010). Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals, (4st ed.) Wiley- Blackwell. Hoboken, Newjersey, USA.
11. Holmes, D.S., Quiglev, M.A. (1993). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. Anal Biochem, 114(1), 193-7. https://doi.org/10.1016/0003-2697(81)90473-5 PMID: 6269464
12. Issenhuth-Jeanjean, S.1., Roggentin, P., Mikoleit, M., Guibourdenche, M., De Pinna, E., Nair, S., Fields, P.I., Weill, F.X. (2014). Supplement to the White-Kauffmann-Le Minor scheme, Res Microbiol, 165(7), 526-30. https://doi.org/10.1016/j.resmic.2014.07.004
13. Itoh, Y., Hirose, K., Miyake, M., Khan, A.Q., Hashimoto, Y., Ezaki, T. (1997). Amplification of *rfbE* and *fliC* genes by polymerase chain reaction for identification and detection of *Salmonella* serovar *enteritidis*, *dublin* and *gallinarum-pullorum*. Microbiol Immunol, 41(10), 791-4. https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1997.tb01928.x PMID: 9403503
14. Karimi, D.H., Esmaeili Pour, F., Ebrahimi Mohamadi, K. (2013). Study of prevalence of fresh meat beaf supply in the city of Sanandaj's *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium*. Lett in Applied Microbiol, 37(6), 463-469.
15. Khan, A.A., Nawaz, M.S, Khan, S., Serigelia, C.E. (1999). Detection of multidrug resistance *Salmonella typhimurium* DT104 by multiplex chain reaction. FEEMS Microbiol Lett, 182,355-360. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb08921.x PMID: 10620692

16. McVey, D.S, Kennedy, M., Chengappa, M.M. (2013). Vet Microbiol, (3st ed.) Wiley- Blackwell. Hoboken, Newjersey, USA.
17. Mirmomeini, M.H., Kiani, S., Sisakhtezhad, S. (2008). Rapid detection of *Salmonella dublin* by PCR Amplification of the *SopE* Gene and its Cloning. Pak J Microbiol Sci, 11(11),1497-501. https://doi.org/10.3923/pjbs.2008.1497.1501 PMID: 18817254
18. Mirzaie, S., Hassanzadeh, M., Ashrafi, I. (2010). Identification and characterization of *Salmonella* isolates from captured house sparrows. Turkish J Vet and Animal Sci, 34(2), 181- 186.
19. Nadalian, M.GH., Motahedin, A., Zahraei Salehi, M.T., Khajeh Nasiri, SH.A.M., Lotfalizadeh, S. (2008). A study on the clinical features of salmonellosis and prevalence of Salmonella serogroups in calves. J Vet Res, 63(4), 241-246.
20. Nayebi, N., Ghoreyshi, S.A., Harzandi, N., Shams Ara, M., Tabardei Bakhtiari, A. (2011). PCR methods for detection of Salmonella infection in poultry products in the city of Karaj. Med Sci, 21(1), 32-37
21. Oliveira, S.D., Rodenbusch, C.R., Cé, M.C., Rocha, S.L., Canal, C.W. (2003). Evaluation of selective and non-selective enrichment PCR procedure for Salmonella detection. Lett Microbiol, 36, 217-221. https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2003.01294.x PMID: 12641714
22. Pan, T.M., liu, Y.J. (2002). Identification of *Salmonella enteritidis* isolate by polymerase chain reaction and multiplex polymerase chain reaction. J Microbiol Immunol Infect, 35(3), 147-51. PMID: 12380786
23. Peighambari, S.M., Sorahi Nobar, M., Morshed, R. (2014). Detection of *Salmonella enterica* serovar infantis among serogroup C Salmonella isolates from poultry using PCR and determination of drug resistance patterns. Scientific-Research Iranian Veterinary Journal, 11(2), 54-61
24. Radostits, O.M., Gay, C., Hinchcliff, K.W., Constable, P.D. (2007). Veterinary Medicine A Textbook of the Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs and Goats. (10st ed.) Saunders Ltd. london, UK.
25. Rhan, K.D., Grandis, S.A, Clarke, R.C., Curtiss, R. Gyles, C.L. (1992). Amplification of *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of Salmonella. Mol Cell Probes, 6(4), 271-9. http://doi.org/10.1016/0890-8508(92)90002-f
26. Scholz, H.C., Arnold, T., Marg, H., Rösler, U., Hensel, A. (2001). Improvement of an *invA*-based PCR for specific detection of *Salmonella typhimurium* in organs of pigs. Berl Munch Tierarztl Wochenschr, 114(9-10), 401-3. PMID: 11570189
27. Tadjbakhsh, F., Rahimi, E., Tadjbakhsh, E. (2013). Prevalence of *Salmonella typhimurium* in raw milk of cows, sheep and goats supplied in Chaharmahal and bakhtiari province. J Food Protection, 60, 1341–1346
28. Tadjbakhsh, H., Atashparvar, N., Zahraei Salehi, T., Nadalain, M. (2005). Application of combination, immunomagnetic sepration plus multiplex PCR for the drtrction and identification of *Salmonella enterica* subspecies enterica serovar *Typhimurium bovine* diarrhoeic fecal samples. J Vet Res, 63(1), 41-46
29. Throns, C.J., Sojka, M.G., Chasey, D. (1990). Detection of novel fimberial structure on surface of *Salmonella enteritidis* by using a monoclonal antibody. J Clin Microbiol, 28(11), 2409-14. PMID: 1701443
30. Turcotte, C., Woodward, M.J. (1993). Cloning, DNA uneleotic Sequenceand disturbution of the gene encoding the SEF14 fimbrial antigene of *Salmonella enteritidis*. J Gen Microbiol, 139(7), 1477-85. https://doi/10.1099/00221287-139-7-1477 PMID: 8371111
31. Waltman, W.D., Gast, R.K., Mallinson, E.T. (1998). Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens. Swayane, D.E., Glisson, J.R., Jackwood, M.M., Person, J.E., Reed, W.M. (eds.). American Association of Avian Pathogenesis. Pennsylvania, USA. p. 4-13.
32. Woodward, M.J, Kirwan, S.E. (1996). Detection of *Salmonella enteritidis* in eggs by polymerase chain reaction. Vet Rec, 138(17), 411-3. http://doi.org/10.1136/vr.138.17.411 PMID: 8733179
33. Yang, L., Lou, Y.k., S.U, C.H., Zhang, H., Guan, M., XU., Jan, WEI. R., Chen, J.M., Peng, D.X. (2014). Development of Multiplex PCR for Rapid Identification of *Salmonella entreitidis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella gullinarum*. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 45(2), 268-273. http://doi.org/10.11843/j.issn.0366-6964.2014.02.015
34. Zahraeisalehi, T., Tadjbakhsh, H., Atashparvar. N., Nadalian, M.G., Mahzounieh, M.R. (2007). Detection and identification of *Salomonella typhimurium* in bovine diarrhoeic fecal samples by immunomagnetic seraration and multiplex PCR assay. Zoonoses and Public Health, 54(6-7), 231-6. http://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2007.01061

Journal of Veterinary Research
J Vet Res, Volume 75, Number 3, 2020
Original Article

Identification of Salmonella Isolated from Dairy Farms in Tehran and Alborz Provinces by Classical and Molecular Methods

Hadi Ghafari[1], Taghi Zahraei Salehi[2], Farhad Moosakhani[3]

[1] *Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Karaj Branch, Karaj, Iran*
[2] *Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran*
[3] *Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Karaj Branch, Karaj, Iran*

10.22059/jvr.2020.232882.2626
Received: *13 April 2020*, ***Accepted:*** *16 June 2020*

Abstract

BACKGROUND: Salmonella are endemic on most large intensive dairy farms and salmonellosis is a common cause of neonatal morbidity and mortality. Disease and mortality usually reflect a variety of management events and environmental stressors that contribute to compromised host immunity and increased pathogen exposure.

OBJECTIVES: In this study, PCR method was used to identify *Salmonella Enteritidis*, *Infantis*, *Dublin* and serovars isolated from diarrhea samples and aborted fetuses of Tehran and Alborz provinces dairy Farms. Further observation showed that the isolation of *S. Enteritidis* and *S. Infantis* is closely related to the consumption of contaminated poultry meat powder in diet of cows.

METHODS: Forty-one Salmonella were isolated from diarrhea and aborted fetus samples in Tehran and Alborz provinces Farms and were confirmed by biochemical assays, then the isolates were identified by serological methods by polyvalent and monovalent *Salmonella antisera*. DNA of samples was extracted by Boiling method and was tested by PCR. *Salmonella* serovars were identified according to the presence of specific genes for *Salmonella Enteritidis*, *Infantis* and *Dublin*.

RESULTS: All samples were tested by PCR were positive. 32 samples were identified as *Salmonella Enteritidis* (78/04 %), 4 samples were identified as *Salmonella Infantis* (9/77 %) and 5 samples were identified as *Salmonella Dublin* (12/19 %).

CONCLUSIONS: According to the results, it seems that PCR can be used as a alternative method to the expensive and time consuming biochemical and serological methods for identifying *Salmonella* serovars. As *Salmonella Enteritidis* was usually isolated from poultry, isolation from cows may be due to has been used chicken meat powder in diet of the dairy farms.

Keywords: Salmonella, Calf, PCR, Serotyping, Meat powder

Copyright © 2020. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution- 4.0 International License which permits Share, copy and redistribution of the material in any medium or format or adapt, remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially.

Corresponding author's email: fmoosakhani@kiau.ac.ir **Tel/Fax:** 026-33517422-23

How to cite this article:

Ghafari, H., Zahraei Salehi, T., Moosakhani, F. (2021). Identification of Salmonella Isolated from Dairy Farms in Tehran and Alborz Provinces by Classical and Molecular Methods. J Vet Res, 75(4), 529-536. https://doi.org/10.22059/jvr.2020.232882.2626

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Target genomic regions and primer sequences of the multiplex PCR.
Table 2. Target genomic regions and primer sequences of the multiplex PCR.
Table 3. Target genomic regions and primer sequences of the multiplex PCR.
Table 4. Target genomic regions and primer sequences of the multiplex PCR.
Figure 1. Electrophoresis gel documentation for *S. Enteritidis*.
Figure 2. Electrophoresis gel documentation for *S. Infantis*.
Figure 3. Electrophoresis gel documentation for *S. Dublin*.
Diagram 1. Measure of isolated serovar.