مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۸۷، دوره ۶۳، شماره ۴، ۲۳۴-۲۲۹

فراوانی ژن *sefA* در جدایه‌های سالمونلا آنتریتیدیس طیور و پتانسیل آن به عنوان یک شاخص تشخیصی و اپیدمیولوژیک

ریما مرشد سید مصطفی پیغمبری*

گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

(دریافت مقاله: ۵ شهریور ماه ۱۳۸۵، پذیرش نهایی: ۲۱ اسفند ماه ۱۳۸۵)

چکیده

هدف از این مطالعه جستجوی حضور ژن *sefA* در جدایه‌های سالمونلا آنتریتیدیس طیور با استفاده از روش PCR و بررسی ارزش آن به عنوان یک ابزار تشخیصی و اپیدمیولوژیک بود. تعداد ۳۰ جدایه سالمونلا از مزارع مرغ مادر گوشتی، گوشتی، تخمگذار، جوجه کشی‌ها، و کشتارگاه ها در این مطالعه مورد آزمایش قرار گرفت. پرایمرهای مورد نیاز براساس سکانس ژن *sefA*، رمزکننده جزء اصلی (فیمبرین) فیمبریه‌ای SEF14، برای تکثیر قطعه ای از این ژن به اندازه ۵۲۶ جفت باز ساخته شدند و قطعه مورد نیاز با استفاده از تکنیک PCR تکثیر شد. با توجه به آنکه آنزیم BamHI این قطعه را به دو قطعه ۱۸۶ و ۳۴۰ جفت باز تقسیم می نماید، متعاقبا برای تایید اختصاصی بودن فرآورده واکنش، قطعه تکثیر یافته با کمک آنزیم BamHI هضم آنزیمی گردید. همه جدایه‌های سالمونلا آنتریتیدیس دارای قطعه ۵۲۶ جفت باز مربوط به ژن *sefA* بودند، در حالی که جدایه های متعلق به سایر گروه‌های سرمی (B ,C) فاقد قطعه مزبور بودند. آنزیم BamH1 قطعه ۵۲۶ جفت باز را به دو قطعه ۱۸۶ و ۳۴۰ جفت باز تقسیم نمود و این الگو در همه جدایه های سالمونلا آنتریتیدیس تکرار شد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که ژن *sefA* از پتانسیل بالائی به عنوان یک شاخص تشخیصی و اپیدمیولوژیک برای سالمونلا آنتریتیدیس برخوردار است.

واژه‌های کلیدی: سالمونلا آنتریتیدیس، فیمبریه، *sef A*، SEF14، PCR.

مقدمه

عفونت‌های سالمونلایی همچنان به عنوان یکی از مهمترین مشکلات حیوانات اهلی در سراسر جهان مطرح هستند و بصورت مستقیم با ایجاد تلفات و کاهش رشد متعاقب بیماری بالینی و بصورت غیرمستقیم با انتقال عفونت به انسان سبب خسارات اقتصادی زیادی می‌گردند(۷). در سالهای اخیر، سروتیپ غالب سالمونلاهای جدا شده از مسمومیت‌های غذایی در انسان در اغلب کشورها، سالمونلا آنتریتیدیس بوده است. به نظر می رسد که افزایش مصرف تخم مرغ و سایر محصولات طیور آلوده به این سروتیپ در افزایش مسمومیت های غذایی مربوط به سالمونلا آنتریتیدیس نقش داشته است(۷). امروزه سیاست های بین المللی در جهت کنترل و کاهش شیوع سالمونلاها در طیور و سایر حیوانات فارمی به منظور کاهش شیوع عفونت‌های غذایی در انسان تبیین شده است. بخش مهمی از این سیاستهای کنترلی نیازمند روشهای سریع، اختصاصی و ارزان برای تشخیص سالمونلا و بخصوص سالمونلا آنتریتیدیس و همچنین به کارگیری روشهای موثرتر برای کاهش عفونت توسط سالمونلا در حیوانات فارمی می باشد.

ساختارهای سطحی باکتریها مانند فیمبریه‌ها برای شناسائی سروتیپ های مختلف یک گونه باکتری مورد استفاده قرار گرفته است (۳۰، ۲۶، ۲۳، ۱۴، ۸، ۶). فیمبریه ساختاری سطحی است که بر روی بسیاری از گونه های انتروباکتریاسه حضور دارد(۲۸، ۲۴). بعضی از فیمبریه ها به عنوان فاکتور حدت مطرح هستند و اولین مرحله را در کلونیزه شدن برروی سطوح مخاطی میزبان آغاز می‌کنند(۷). فیمبریه براساس خواص مورفولوژیکی و توانایی آگلوتینه کردن اریتروسیت ها در حضور یا غیاب D مانوز طبقه‌بندی می‌شوند(۲۴، ۱۲). وجود ساختارهای فیمبریه ای یا شبه فیمبریه ای گوناگونی در سروتیپ های سالمونلا گزارش شده است(۲۴، ۱۲، ۷). تاکنون چند ساختار فیمبریه‌ای در سالمونلا آنتریتیدیس شناسایی شده است. فیمبریه SEF21 یا تیپ ۱ که رشته ای پروتئینی با قطر ۷ nm است که به مانوز حساس است و در همه اعضاء خانواده انتروباکتریاسه حضور دارد (۲۴، ۱۵، ۱۲). فیمبریه های دیگر SEFI7 و SEFI4 نیز برای اولین بار بر روی سویه های سالمونلا آنتریتیدیس شناسایی شدند(۱۰، ۵). فیمبریه SEFI4 اجزایی رشته‌ای، نازک با قطر کمتر از ۳ نانومتر هستند که از واحدهای پروتیئنی تکراری با وزن مولکولی ۱۴ کیلودالتون تشکیل شده‌اند. این فیمبریه علاوه بر سالمونلا آنتریتیدیس فقط در سایر سروتیپ های گروه سرمی D مشاهده شده‌اند(۲۴). شواهد قطعی از نقش فیمبریه های SEF14,SEF17,SEF21 در بیماریزایی وجود ندارد(۲۰، ۱۶). حضور فیمبریه های LPF و PEF نیز بر روی سالمونلا آنتریتیدیس مورد تائید قرار گرفته است و شواهدی مبنی بر نقش آنها در پاتوژنز وجود دارد(۲۴، ۹).

ژن رمزکننده فیمبریه SEFI4 تحت عنوان *sef A* نامیده می شود(۲) که فقط در گروه D سالمونلاها (سالمونلا تیفی، سالمونلا دابلین، سالمونلا سرمبن، سالمونلا پولوروم، سالمونلا گالیناروم، سالمونلا بلگدام، سالمونلا روستوک، سالمونلا مسکو، سالمونلا آنتریتیدیس) یافت می‌شود (۲۶، ۸، ۴). با توجه به اینکه سالمونلا تیفی اختصاصی انسان و سالمونلا دابلین اختصاصی گاو هستند و شیوع سالمونلا پولوروم و سالمونلا گالیناروم در طیور بسیار کاهش یافته و سالمونلا سرمبن، سالمونلا بلگدام، سالمونلا

*)نویسنده مسؤول: تلفن: ۶۱۱۱۷۱۵۰-۰۲۱، نمابر: ۶۶۹۳۳۲۲۲-۰۲۱ Email: mpeigham@ut.ac.ir

جدول ۱- سویه‌ها و جدایه‌های سالمونلا استفاده شده در این مطالعه و نتایج حاصله از PCR.

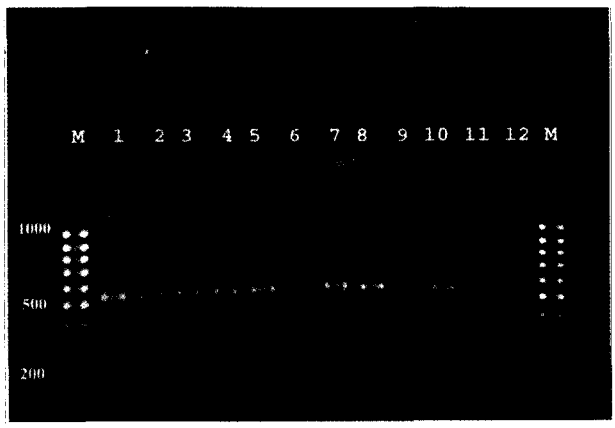
سویه‌ها و جدایه‌ها	سروگروپ	سروتیپ	منبع	حضور فرآورده PCR (۵۲۶ جفت باز)
SE PT21	D	*Salmonella enteritidis*	سویه استاندارد	+
ATCC14028	B	*S.typhimarium*	سویه استاندارد	-
S1	D	*Salmonella enteritidis*	جوجه کشی (تخم مرغ هچ نشده)	+
S2	D	*Salmonella enteritidis*	جوجه کشی (تخم مرغ هچ نشده)	+
S3	D	*Salmonella enteritidis*	جوجه کشی (تخم مرغ هچ نشده)	+
S4	D	*Salmonella enteritidis*	جوجه کشی (تخم مرغ هچ نشده)	+
S5	D	*Salmonella enteritidis*	جوجه گوشتی ۸ روزه	+
S6	D	*Salmonella enteritidis*	جوجه گوشتی ۸ روزه	+
S7	D	*Salmonella enteritidis*	جوجه یکروزه	+
S8	D	*Salmonella enteritidis*	جوجه یکروزه	+
S9	D	*Salmonella enteritidis*	جوجه یکروزه	+
S10	D	*Salmonella enteritidis*	جوجه یکروزه	+
S11	D	*Salmonella enteritidis*	جوجه گوشتی	+
S12	D	*Salmonella enteritidis*	جوجه گوشتی	+
S13	D	*Salmonella enteritidis*	جوجه گوشتی	+
S14	D	*Salmonella enteritidis*	جوجه گوشتی	+
S15	D	*Salmonella enteritidis*	جوجه گوشتی	+
S16	D	*Salmonella enteritidis*	جوجه گوشتی	+
S17	C	Unknown	جوجه گوشتی	-
S18	D	*Salmonella enteritidis*	مرغ ذبح شده در کشتارگاه	+
S19	D	*Salmonella enteritidis*	مرغ ذبح شده در کشتارگاه	+
S20	C	Unknown	مرغ ذبح شده در کشتارگاه	-
S21	C	Unknown	مرغ ذبح شده در کشتارگاه	-
S22	D	*Salmonella enteritidis*	گله مادر گوشتی	+
S23	D	*Salmonella enteritidis*	گله مادر گوشتی	+
S24	D	*Salmonella enteritidis*	گله مادر گوشتی	+
S25	D	*Salmonella enteritidis*	گله مادر گوشتی	+
S26	D	*Salmonella enteritidis*	گله مادر گوشتی	+
S27	D	*Salmonella enteritidis*	گله مادر گوشتی	+
S28	C	Unknown	گله مادر گوشتی	-
S29	D	*Salmonella enteritidis*	گله تخمگذار	+
S30	D	*Salmonella enteritidis*	گله تخمگذار	+
S31	D	*Salmonella enteritidis*	محیط مرغداری گوشتی	+
S32	D	*Salmonella enteritidis*	محیط جوجه کشی	+

روستوک و سالمونلا مسکو به ندرت در طیور یافت می‌شود و جزء سالمونلاهای پاراتیفی معمول در طیور نیستند(۱۱)، می‌توان از ژن *sef A* برای تشخیص سالمونلا آنتریتیدیس بهره برد(۲۳، ۱۴، ۸).

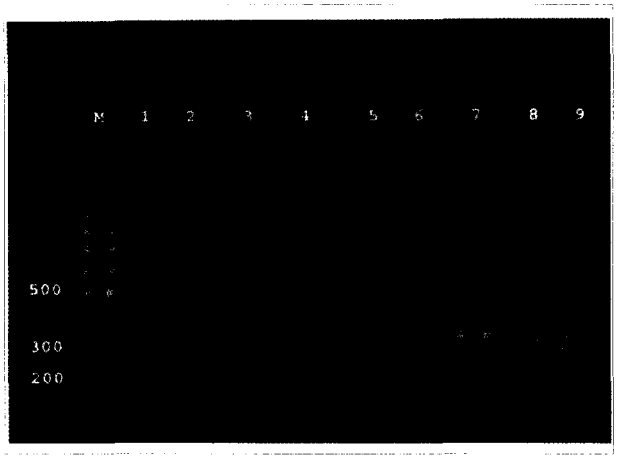
مواد و روش کار

جدایه‌های سالمونلا: تعداد ۳۲ جدایه سالمونلا از گنجینه میکروبی دانشکده که در سالهای ۸۵-۸۴ از مزارع پرورش طیور شامل گله‌های گوشتی، تخمگذار، مادر گوشتی، جوجه کشی و کشتارگاه بر اساس روشهای استاندارد جداسازی و شناسایی گردیده بودند و در فریزر ۷۰- درجه سانتیگراد نگهداری می‌شدند، برای این مطالعه انتخاب شدند (جدول ۱). دو سویه استاندارد که توسط آقای دکتر خاشابی (عضو محترم هیأت علمی موسسه تحقیقاتی میکروبیولوژی در اطریش) تامین گردیده بودند نیز به عنوان کنترل مورد استفاده قرار گرفتند.

استخراج DNA: استخراج DNA کروموزومی به روش جوشاندن



تصویر۱- تصویر ژل الکتروفورز فراورده‌های PCR. دو ستون مشخص شده با حرف M، مارکر تجاری (50 bp) و ستون‌های ۱۲-۱ قطعه تکثیر شده ۵۲۶ جفت باز ژن *sef A* را نشان می دهند.



تصویر۲- تصویر ژل الکتروفورز هضم آنزیمی با آنزیم *Bam* HI ستون مشخص شده با حرف M، مارکر تجاری (50 bp)، ستون۱، محصول ۵۲۶ جفت باز بدون هضم آنزیمی، و ستون‌های ۹-۲ قطعات ۱۸۶ و ۳۴۰ جفت باز در نتیجه هضم آنزیمی را نشان می دهند.

همانطور که توسط Medici و همکاران (۱۴) شرح داده شده است، طی مراحل زیر انجام شد. ابتدا ۱ میلی لیتر از کشت ۱۸ ساعته جدایه سالمونلا در محیط TSB (Merck ,Gemany) و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری منتقل و به مدت ۵ دقیقه در $g \times 10000$ سانتریفوژ شد. پس از دور ریختن مایع رویی، پلت در ۳۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل ورتکس و مخلوط گردید. تیوب حاوی مخلوط میکروبی به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰ درجه سانتیگراد جوشانده شد و بلافاصله بر روی یخ منتقل گردید و مجددا به مدت ۵ دقیقه در $g \times 14000$ و در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ شد و مایع رویی با احتیاط به یک تیوب جدید انتقال یافت که به عنوان DNA الگو در PCR مورد استفاده قرار گرفت.

واکنش زنجیره‌ای پلی مراز(PCR): حضور ژن *sef A* که کد کننده فیمبریه SEFI4 می باشد در واکنش PCR با کمک دو پرایمر F با سکانس '3-5'-tgtgcgaatgctaatagttg و R با سکانس '3-5'-ctgctgaacgtagaaggtcg مورد جستجو قرار گرفت (۲۳). پرایمرها و کلیه مواد مورد نیاز واکنش PCR از شرکت سیناژن (تهران، ایران) تهیه گردیدند. تمام واکنشها در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر انجام شد. هر مخلوط واکنش حاوی ۵ میکرولیتر buffer 10 x PCR، ۱/۵ میکرولیتر از $MgCl_2$ 50 mM، یک میکرولیتر dNTPs 10 mM، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر با غلظت ۱۰ میکرومولار، ۲/۵ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase، ۵ میکرولیتر از DNA الگو و آب دیونیزه استریل تا رسیدن به حجم نهائی ۵۰ میکرولیتر که به تیوبهای ۰/۲ میلی لیتر مخصوص PCR اضافه شد. برای تکثیر فراورده PCR به طول ۵۲۶ جفت باز، برنامه تکثیر در ترموسایکلر (Eppendorf ,Germany) بدین شرح انجام شد: denaturation اولیه به مدت ۲ دقیقه در ۹۴ درجه سانتیگراد، سپس ۳۰ سیکل شامل مراحل denaturation به مدت ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتیگراد، annealing به مدت ۳۰ ثانیه در ۵۵ درجه، extention به مدت ۱ دقیقه در ۷۲ درجه، و در آخر تکثیر نهایی به مدت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه (۲۳). فرآورده‌های PCR در یخچال در دمای ۴ درجه سانتیگراد تا زمان ژل الکتروفورز نگهداری شدند.

الکتروفورز فرآورده PCR: الکتروفورز فرآورده‌های PCR هم به روش توصیه شده Sambrook and Russell (۲۱) انجام شد. این روش با استفاده از آگاروز ۲ درصد حل شده در TAE 1 x (Tris Acetate-EDTA) انجام گرفت. مخلوط ۸ میکرولیتر از فرآورده PCR هر نمونه مورد بررسی با ۴ میکرولیتر Gel-loading buffer به داخل هر گوده ژل افزوده شد. این بافر مرکب از ۰/۲۵ گرم بروموفنل بلو و ۴ گرم ساکاروز در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر بود. جهت تعیین وزن ملکولی باندهای مشاهده شده بر روی هر ژل از مارکر 50bp DNA ladder (Fermentas ,Germany) استفاده شد. نحوه آماده‌سازی مارکر تجاری براساس توصیه کارخانه سازنده صورت گرفت. با استفاده از دستگاه ژل الکتروفورز (Apelex ,France) و بافر TAE 1 x جریانی به ظرفیت ۸۰ ولت به مدت یک ساعت از ژل عبور داده شد. سپس ژل به مدت ۲۰ دقیقه در ظرف حاوی محلول اتیدیوم بروماید (10 mg/ml) (سیناژن) جهت رنگ آمیزی و بعد به مدت ۱۰ دقیقه در ظرف حاوی آب مقطر جهت شستشو قرار داده شد. باندهای DNA روی ژل، بلافاصله با استفاده از نور ماوراء بنفش ترانس ایلومیناتور و دوربین عکسبرداری از ژل (Visi-Doc-It system ,UVP,UK) مشاهده و تصویربرداری شدند. محاسبه وزن ملکولی باندها با استفاده از نرم افزار کامپیوتری Seqaid II (Ver .3.5 ,Kansas State University) صورت پذیرفت.

هضم آنزیمی: بر اساس سکانس نوکلئوتیدی ژن *sef A* که در GeneBank موجود است (شماره دسترسی: I44902)، فراورده PCR این مطالعه (۵۲۶bp) دارای فقط یک سایت برش برای آنزیم *Bam*HI است و پس از هضم با این آنزیم به دو قطعه ۱۸۶bp و ۳۴۰bp تقسیم می‌گردد و نتیجه PCR تایید می‌گردد. لذا به منظور تایید نتیجه واکنش، فراورده‌های PCR با آنزیم اندونوکلئاز *Bam*HI (سیناژن) به روش زیر هضم گردیدند (۲۳). ابتدا ۱۰ میکرولیتر فراورده PCR (حاوی ۵۰۰۰-۲۰۰۰ نانوگرم DNA)، ۲ میکرولیتر بافر x

۱۰ اختصاصی آنزیم BamHI (حاوی ۱۰ واحد) و هفت میکرولیتر آب دیونیزه استریل با همدیگر مخلوط گردیدند و سپس ۱ میکرولیتر آنزیم BamHI در پایان کار به مخلوط اضافه گشت. این مخلوط به مدت ۳ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری و سپس با استفاده از آگارز ۲ درصد ژل الکتروفورز گردید.

نتایج

واکنش PCR: کلیه جدایه‌های سالمونلاآنتریتیدیس دارای قطعه ۵۲۶ جفت باز بودند در حالی‌که سایر سروتیپ‌های سالمونلای غیرگروه D فاقد چنین قطعه‌ای بودند (جدول ۱). تصویر ۱ نتایج بدست آمده از جدایه‌های سالمونلاآنتریتیدیس را نشان می‌دهد.

هضم آنزیمی: محصول تکثیر یافته با هضم توسط آنزیم BamHI تایید گردید. این آنزیم محصول ۵۲۶ جفت باز را به دو قطعه ۱۸۶ و ۳۴۰ جفت باز تقسیم می‌نماید. قطعات ۵۲۶ جفت باز حاصل از PCR همه جدایه‌های سالمونلاآنتریتیدیس پس از هضم شدن با آنزیم BamHI الگوی پیش بینی شده را ایجاد نمودند. تصویر ۲ نتایج هضمی آنزیمی با BamHI را نشان می‌دهد.

بحث

امروزه تشخیص آزمایشگاهی سالمونلا به طور معمول با محیط‌های غنی کننده انتخابی یا غیرانتخابی ومتعاقب آن کشت روی محیط‌های انتخابی صورت می‌گیرد که حداقل ۵-۴ روز زمان می خواهد و به میزان زیادی پاسخ منفی کاذب هم ایجاد می‌کند (۲۹)، در حالی که می‌توان از تکنیک PCR برای شناسایی سریعتر سالمونلاها استفاده نمود(۳). Cohen 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 نمایند(۳). اما ژن *fimA* برای تفریق سروتیپ‌های گوناگون سالمونلا از همدیگر قابل استفاده نبود.

با توجه به اهمیت سالمونلاآنتریتیدیس، روشهای مختلف از جمله PCR توسط محققین برای تفریق این سروتیپ از بقیه سروتیپ‌های سالمونلا مورد مطالعه قرار گرفته است(۳۰، ۲۷، ۲۶، ۲۵، ۲۳، ۱۹، ۱۴، ۸، ۶). وجود ساختارهای فیمبریه‌ای یا شبه فیمبریه‌ای گوناگون در سروتیپ‌های سالمونلا(۲۴، ۱۲، ۷)، پژوهشگران را تشویق به مطالعه هر چه بیشتر این ساختارها و کاربرد احتمالی آن‌ها در تفریق سروتیپ‌ها نموده است. همانطور که قبلا اشاره شد تاکنون چند ساختار فیمبریه‌ای در سالمونلاآنتریتیدیس شناسائی شده است و در بین آنان، فیمبریه SEF14 سالمونلاآنتریتیدیس بیش از سایر فیمبریه‌ها مورد مطالعه قرار گرفته است. Clouthier و همکاران در سال ۱۹۹۳ (۲) گزارش نمودند اپرون *sef* در سالمونلاآنتریتیدیس دارای سه ژن *sefA*، *sefB*، *sefC* می‌باشد که عهده دار بیوسنتز فیمبریه SEF14 می‌باشند که در بین آنان، ژن *sefA* جزء اصلی فیمبریه SEF14 (فیمبرین) را رمزدهی می‌نماید. البته ژنهای *sefD* و *sefE* نیز بعدا در اپرون *sef* شناسائی گردیدند(۴، ۱). ژن *sefA* فقط در سالمونلاهای گروه D حضور دارد ولی فقط سویه‌های سالمونلاآنتریتیدیس، سالمونلا بلگدام و سالمونلا مسکو و ۹۰ درصد از سویه‌های سالمونلا دابلین آنتی‌ژن فیمبریه‌ای SEF14 را در سطح سلول بروز می‌دهند(۲۷). در یک بررسی، همه جدایه‌های سالمونلا بلگدام، سالمونلا مسکو و سالمونلا آنتریتیدیس و ۹۳ درصد جدایه‌های سالمونلا دابلین با ذرات لاتکس پوشیده شده با آنتی‌بادی مونوکلونال آگلوتینه شدند در حالی‌که سایر سروتیپ‌های گروه D آگلوتینه نشدند (۲۶). بر همین اساس، امروزه یکی از روشهای تشخیص براساس فیمبریه‌های سالمونلا، تست آگلوتیناسیون لاتکس با آنتی‌بادی مونوکلونال است که به عنوان روشی برای شناسایی اختصاصی سالمونلا آنتریتیدیس مطرح است (۲۴).

در این مطالعه با استفاده از تکنیک PCR حضور ژن *sefA* در تمام جدایه‌های سالمونلا آنتریتیدیس مورد تائید قرار گرفت در حالیکه در هیچکدام از جدایه‌های متعلق به گروه‌های سرمی B و C حضور این ژن مشاهده نشد. یافته‌های ما با مشاهدات سایرین که حضور ژن *sefA* را در تمام جدایه‌های سالمونلاآنتریتیدیس چه با استفاده از پرایمرهای بکار برده شده در مطالعه حاضر(۲۳) و چه پرایمرهای دیگر(۱۸،۲۲،۳۰) مشاهده نمودند، همخوانی دارد. همچنین در مطالعه پژوهشگران قبلی، عدم حضور ژن *sefA* در بسیاری از سالمونلاهای غیر گروه سرمی D و باکتریها و میکروارگانیسم‌های دیگر نیز مورد تائید قرار گرفته است(۱۸،۲۲،۲۳،۳۰). گرچه ژن *sefA* در سایر سروتیپ‌های گروه D سالمونلا نیز یافت می‌شود ولی با توجه به اینکه سالمونلا تیفی اختصاصی انسان و سالمونلا دابلین اختصاصی گاو است و سالمونلا بلگدام، سالمونلا مسکو، سالمونلا روستوک و سالمونلا سرمبن به ندرت در طیور یافت شده‌اند(۱۱) و شیوع سالمونلا پولوروم و سالمونلا گالیناروم در صنعت مرغداری در سراسر دنیا کاهش یافته است و در ایران هم اکنون همه گله‌های مادر طیور جوجه‌های SP و SG منفی تولید می‌کنند، مطالعه ما نشان داده است که تائید حضور ژن *sefA* در جدایه‌های سالمونلاآنتریتیدیس که با تکثیر قطعه‌ای به اندازه ۵۲۶ جفت باز توسط پرایمرهای بکار برده شده صورت گرفت، از ارزش بالایی در تائید آلودگی طیور به این سروتیپ مهم می‌تواند داشته باشد. با توجه به اینکه PCR بصورت موفقیت‌آمیزی برای نمونه‌های بالینی نظیر مدفوع، پوست، گوشت، و تخم مرغ مورد استفاده قرار گرفته است(۳۰)، می‌توان از این پرایمرها بصورت مستقیم برای تشخیص آلودگی سالمونلاآنتریتیدیس در نمونه‌های بالینی مثل مدفوع وتخم‌مرغ استفاده نمود(۱۳). البته بعضی محققین ابتدا غنی سازی مقدماتی را بر روی نمونه‌های بالینی انجام دادند و سپس از PCR استفاده نمودند. همانطور که Woodword و همکاران در سال ۱۹۹۶ برای شناسایی سالمونلاآنتریتیدیس در کشت ۱۶ ساعته تخم مرغ در آب پپتونه موفق شدند یک قطعه کوچکتر از ژن *sefA* را با استفاده از PCR تکثیر نمایند(۳۰). همچنین Oliveria و همکاران در سال ۲۰۰۲، برای

تشخیص سالمونلا آنتریتیدیس دو روش کشت باکتریایی با غنی سازی در محیط های انتخابی و سپس تکثیرژن *sef A* با PCR را با کشت باکتریایی با غنی‌سازی در محیط های غیرانتخابی و سپس تکثیرژن *sef A* با PCR مقایسه نمودند. واکنش PCR با نمونه های غنی شده در محیط های انتخابی تعداد بیشتری از نمونه های مثبت را در مقایسه با واکنش PCR با نمونه های غنی شده در محیط های غیرانتخابی و همچنین روش کشت بدون انجام PCR شناسایی نمود(۱۷). بنابراین برای بکارگیری روش PCR استفاده شده در مطالعه ما برای نمونه های بالینی، ابتدا باید حساسیت آزمایش را تعیین نموده و سپس مشخص نمود که آیا احتیاج به محیط های کشت غنی‌کننده دارد یا می تواند بصورت مستقیم روی استخراج شده از مواد خام بکار برده شود. البته باید در نظر داشت که استفاده از محیط های غنی کننده قبل از انجام PCR چندین مزیت به همراه دارد. اولا سبب رقیق شدن مواد مهار کننده موجود در نمونه های بالینی می‌گردد. ثانیاً تعداد ارگانیسم های زنده را در نمونه افزایش می دهد. انجام PCR با محیط های غنی کننده حداقل ۵-۴ روز زمان شناسایی سالمونلا نسبت به روشهای استاندارد تشخیص سالمونلا (کشت باکتریایی) کاهش داده است(۱۷). بنابراین کاهش زمان تشخیص سالمونلا و افزایش نمونه های مثبت (کاهش منفی کاذب) از مزایای PCR نسبت به روشهای استاندارد تشخیص سالمونلا (کشت باکتریایی) به حساب می‌آید که می تواند در آینده PCR را جایگزین روشهای استاندارد نماید.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با استفاده از اعتبارات طرح مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه تهران به شماره ۷۵۰۸۰۰۷/۶/۴ و کمکهای سازمان دامپزشکی کشور انجام گرفته است. نگارندگان مقاله از آقای دکتر خاشابی بخاطر تامین نمودن سویه های استاندارد تشکر می نمایند.

References

1. Clouthier, S. C., Collinson, S. K., Kay, W. W. (1994) Unique fimbriae-like structures encoded by sefD of the SEF14 fimbrial gene cluster of *Salmonella* Enteritidis. Mol. Microbiol. 12: 893-901.
2. Clouthier, 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: 2523-2533.
3. 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.
4. Collighan, R. J., Woodward, M. J. (2001) The SEF14 fimbrial antigen of *Salmonella* Enterica serovar Enteritidis is encoded within a pathogenicity islet. Vet. Microbiol. 80: 235-245.
5. Collinson, S. K., Emody, L., Muller, K. H., Trust, T. J., Kay, W. W. (1991) Purification and characterization of thin, aggregative fimbriae from *Salmonella* Enteritidis. J. Bacteriol. 173: 4773-4781.
6. Cooper, G. L., Thorns, C. J. (1996) Evaluation of SEF14 fimbrial dot blot and flagellar western blot tests as indicators of *Salmonella* Enteritidis infection in chickens. Vet. Rec. 138: 149-153.
7. Darwin, K. H., Miller, V. L. (1999) Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. Clin. Microbiol. Rev. 12: 405-28.
8. Doran, J. L., Collinson, S. K., Clouthier, S. C., Cebula, T. A., Koch, W. H., Burian, J., Banser, P. A., Todd, E. C., 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.
9. Duguid, J. P., Dareker, M. R., Wheater, D. W. F. (1976) Fimbriae and infectivity in *Salmonella* Typhimurium. J. Med. Microbiol. 9: 459-473.
10. Feutrier, J., Kay, W. W., Trust, T. J. (1986) Purification and characterization of fimbriae from *Salmonella* Enteritidis. J. Bacteriol. 168: 221-227.
11. Gast, R. K. (2003) Paratyphoid infection. In Disease of Poultry. Edited by WM Saif, HJ Barnes, JR Glisson, AM Fadly, LR McDougald, DE Swayne. (11th ed.), Iowa State Press, Iowa, USA. pp. 583-613.
12. Klemm, P. (1994) Fimbriae: Adhesion, genetics biogenesis, and vaccines. CRC press Inc. UK.
13. Malorny, B., Hoorfar. J. (2005) Toward standardization of diagnostic PCR testing of fecal samples: lessons from the detection of *Salmonellae* in pigs. J. Clin. Microbiol. 43: 3033-3037.
14. Medici, D. D, Croci, L., Delibato, E., Pasquale, S. D., Filetici, E., Toti, L. (2003) Evaluation of DNA extraction methods for use in combination with SYBR green I real-time PCR to detect *Salmonella* Enterica serotype Enteritidis in poultry. Appl. Environ. Microbiol. 69: 3456-3461.
15. Muller, K. H., Collinson, S. K., Trust, T. J., Kay, W.

W. (1991) Type 1 fimbriae of *Salmonella* Enteritidis. J. Bacteriol. 173: 4765-4772.

16. Ogunniyi, A. D., Kotlarski, I., Morona, R., Manning, P. A. (1997) Role of SefA subunit protein of SEF14 fimbriae in the pathogenesis of *Salmonella* Enterica Serovar Enteritidis. Infect. Immun. 65: 708-17.
17. Oliviera, S. D., Rodenbusch, M. c. Ce., Rocha, S. L. C., Canal, C. W. (2002) Evaluation of selective and non-selective enrichment PCR procedure for *Salmonella* detection. Lett. App. Microbiol. 36: 217-221.
18. Pan, T. M., Liu, Y. J. (2002) Identification of *Salmonella* Enteritidis isolates by polymerase chain reaction and multiplex polymerase chain reaction. J. Microbiol. Immunol. Infect. 35: 147-151.
19. Porwollik, S., Santiviago, C. A., Cheng, P., Florea, L., Jackson, S., McClelland, M. (2005) Differences in gene content between *Salmonella* Enterica Serovar Enteritidis isolates and comparison to closely related serovars Gallinarum and Dublin. J. Bacteriol. 18: 6545-6555.
20. Rajashekara, G., Munir, S., Alexeyev, M. F., Halvorson. D. A., Wells, C. L., Nagaraja, K. V. (2000) Pathogenic role of SEF14, SEF17, and SEF21 fimbriae in Salmonella Enterica serovar Enteritidis infection of chickens. Appl. Environ. Microbiol. 66: 1759-1763.
21. Sambrook, J., Russell, D. W. (2001) Molecular Cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbour, NY. USA. pp.
22. Soumet, C., Ermel, G., Rose, V., Rose, N., Drouin, P., Salvat, G., Colin, P. (1999) Identification by a multiplex PCR-based assay of *Salmonella* Typhimurium and Salmonella Enteritidis strains from environmental swabs of poultry houses. Lett. Appl. Microbiol. 29: 1-6.
23. Thomas, C. J. (1994) Distribution and expression of the 14 KDa fimbrial gene among Salmonella Enteritidis isolates and potential as diagnostic and epidemiological tools. Research Report of Project: UA 2A. Rural Industries Research and Development Corporation, Australian Government.
24. Thorns, C. J. (1995) Salmonella Fimbriae: Novel antigens in the detection and control of *Salmonella* Infections. Br. Vet. J. 151: 643-658.
25. Thorns, C. J, Bell, M.M., Sojka, M.G., Nicholas, R.A. (1996) Development and application of enzyme-linked immunosorbent assay for specific detection of *Salmonella* Enteritidis infections in chickens based on antibodies to SEF14 fimbrial antigen. J. Clin. Microbiol. 34: 792-797.
26. Thorns, C. J., Sojka, M. G., Chasey, D. (1990) Detection of a novel fimbrial structure on the surface of *Salmonella* Enteritidis by using a monoclonal antibody. J. Clin. Microbiol. 28: 2409-2414.
27. Turcotte, C., Woodward, M. J. (1993) Cloning, DNA nucleotic Sequence and distribution of the gene encoding the SEE14 fimbrial antigene of *Salmonella* Enteritidis. J. Gen. Microbiol. 139: 1477-1485.
28. Van Asten, A. J. A. M., Van Dijk, J. E. (2005) Distribution of "classic" virulence factors among *Salmonella* spp. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 44: 251-259.
29. Waltman, W. D., Gast, R. K., Mallinson, E. T. (1998) Salmonellosis. In A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens. Edited by DE Swayne, JR Glisson, MM Jackwood, JE Pearson, WM Reed. (4^{th}ed.), American Association of Avian Pathologists, Pennsylvania, USA. pp. 4-13
30. Woodward, M. J., Kirwan, S. E. S. (1996) Detection of *Salmonella* Enteritidis in eggs by the polymerase chain reaction. Vet. Rec. 138: 411-413.

J.Vet.Res. 63, 4:229-234, 2008

DISTRIBUTION OF *SEFA* GENE AMONG *SALMONELLA* ENTERITIDIS ISOLATES FROM POULTRY SOURCES AND POTENTIAL AS DIAGNOSTIC AND EPIDEMIOLOGICAL TOOLS

Morshed, R., Peighambari, S. M.*

Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran - Iran.

(Received 26 August 2006 , Accepted 11 March 2007)

Abstract:

This study was conducted to detect the presence of *sefA* gene among *Salmonella* Enteritidis isolates from poultry sources by polymerase chain reaction (PCR) and evaluate its potential as diagnostic and epidemiological tools. Thirty *Salmonella* isolates from poultry sources: broilers, broiler breeders, layers, hatcheries, and poultry abattoirs were investigated. Upper and forward primers were constructed based on the published sequence of the *sefA* gene that encodes the SEF14 fimbrial subunit (fimbrin). The size of target product was 526 bp. To confirm the specificity, the PCR products were digested with *Bam*HI restriction enzyme that divides the product to two segments of 186 and 340 bp. The PCR reaction was set up as described in the previous literature. All *Salmonella* Enteritidis isolates showed the presence of 526 bp product. None of isolates belonging to serogroups B and C were positive for the 526 bp fragment. The restriction enzyme *Bam*HI divided each 526 bp product into two fragments of 186 and 340 bp. This pattern was demonstrated for all *Salmonella* Enteritidis isolates. The results of the present study showed that the *sefA* gene carries a high potential to be used as a diagnostic and an epidemiological tool for *Salmonella* Enteritidis.

Key words: *Salmonella* Enteritidis, *sefA*, SEF14, PCR, Fimbriae.

***Corresponding author's email: mpeigham@ut.ac.ir, Tel: 021-61117150, Fax: 021-66933222**

09121483694