



Semnan University



Research Article

Comparative Detection of *Salmonella typhimurium* from Imported Frozen Chickens using Traditional Culture Method and Real Time PCR

Mahnoosh Parsaeimehr ^{1*}, Shahrzad Mohammadi ³, Ashkan Jebellijavan ¹, Hamid Staji ²

Abstract

Chicken meat is recognized as a cost-effective, healthy source of high-quality protein with low fat content. One of the primary causes of foodborne illnesses is *Salmonella* and its various serotypes. *Salmonella typhimurium* is a major public health issue worldwide. This study evaluates the comparative separation and diagnosis of *Salmonella* spp. and *Salmonella typhimurium* in 73 imported frozen chicken samples by culture and simultaneous Real Time PCR with specific primers. The results indicated that, out of the 73 frozen chicken samples analyzed through microbial cultivation for *Salmonella* detection, 5 samples were identified as *Salmonella* spp. (6.8%). Among these, 2 samples were specifically diagnosed as *Salmonella typhimurium* using serological method (2.7%). In molecular method, 9 samples were identified as positive (12.3%), with 4 of these PCR-positive samples confirmed as *Salmonella typhimurium* (5.4%). Thus, the comparative results between the two testing methods revealed that the Real-Time PCR method was 1.8 times (approximately double) more effective than the conventional cultivation method. In conclusion, the monitoring of frozen imported chickens for *Salmonella* contamination demonstrated that Real-Time PCR offers significant advantages in terms of accuracy and speed compared to traditional cultivation methods.

Keywords: *Salmonella typhimurium*, Real Time PCR, Imported chicken, Traditional culture method.

1. Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran.

2. Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran.

3. Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran.

*Corresponding author: mparsaei@semnan.ac.ir

DOI: [10.22075/jvlr.2025.37919.1172](https://doi.org/10.22075/jvlr.2025.37919.1172)

Received: 30.05.2025

Revised: 19.09.2025

Accepted: 30.09.2025

How to Cite this Article:

Parsaeimehr, M. , Mohammadi, S. , Jebellijavan, A. and Staji, H. (2026). Comparative Detection of *Salmonella typhimurium* from Imported Frozen Chickens using Traditional Culture Method and Real Time PCR. *Journal of Veterinary Laboratory Research*, 18(1), 27-37.

doi: [10.22075/jvlr.2025.37919.1172](https://doi.org/10.22075/jvlr.2025.37919.1172)





ردیابی مقایسه‌ای سالمونلا تایفی موریم به روش کشت و *Real Time PCR* در مرغ‌های منجمد وارداتی

مهنوش پارسایی مهر^{۱*}، شهرزاد محمدی^۲، اشکان جبلی جوان^۱، حمید استاجی^۱ ID.

خلاصه

گوشت مرغ به عنوان یک غذای ارزان، سالم و دارای پروتئین بالا و چربی کم شناخته شده است. یکی از عوامل اصلی بیماری‌های غذازاد، سالمونلا و سروتیپ‌های آن می‌باشد. سالمونلا تیفی موریم یک معضل بزرگ بهداشتی در جهان می‌باشد. در این مطالعه مقایسه‌ای تشخیصی، تعداد ۷۳ نمونه مرغ منجمد وارداتی، به روش کشت و همزمان با پرایمر اختصاصی به روش *Real Time PCR* برای جداسازی جنس و گونه سالمونلا تیفی موریم بررسی شد. نتایج نشان داد که از ۷۳ نمونه مرغ منجمد وارداتی درآزمون‌های کشت میکروبی، تعداد ۵ نمونه آلوده به جنس سالمونلا تشخیص داده شد (۶/۸ درصد) و از این تعداد، ۲ نمونه سالمونلا تایفی موریم درآزمون آنتی‌سرم تشخیص داده شد (۲/۷ درصد). در روش مولکولی با پرایمرهای اختصاصی جنس سالمونلا، ۹ نمونه آلوده تشخیص داده شد (۱۲/۳ درصد) و از این تعداد، ۴ نمونه با پرایمرهای اختصاصی سالمونلا تایفی موریم مثبت تشخیص داده شد (۵/۴ درصد). با توجه به نتایج مقایسه‌ای بین روش آزمون‌ها، در روش *Real Time PCR*، ۱/۸ برابر (حدود ۲ برابر) نسبت به روش کشت، برتری وجود داشته است. بدین ترتیب در پایش مرغ‌های منجمد وارداتی آلوده به سالمونلا، دقت و سرعت تشخیص *Real Time PCR* نسبت به روش سنتی کشت قابل ملاحظه بوده است.

واژه‌های کلیدی: سالمونلا تیفی موریم، *Real Time PCR*، مرغ وارداتی، روش کشت سنتی.

۱. گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران.

۲. گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران.

۳. دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران.

*نویسنده مسئول: mparsaei@semnan.ac.ir

DOI: [10.22075/jvlr.2025.37919.1172](https://doi.org/10.22075/jvlr.2025.37919.1172)

دریافت: ۱۴۰۴/۰۳/۰۹

بازنگری: ۱۴۰۴/۰۶/۲۸

پذیرش: ۱۴۰۴/۰۷/۰۸

با توجه به افزایش جهانی مصرف گوشت مرغ، آگاهی از انواع آلودگی‌های میکروبی و راهکارهایی جهت افزایش طول عمر و کیفیت گوشت مرغ متعاقب مقابله با این آلودگی‌ها، امری ضروری است. در میان آلودگی‌های میکروبی، باکتری‌ها اصلی‌ترین نقش را در آلودگی لاشه و تهدید سلامت انسان بر عهده دارند. گونه‌های مختلف کمپیلوباکتر و سالمونلا در درجه اول و گونه‌های *آئروموناس*، *اشریشیا کلائی*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *لیستریا مونوسیتوژنز* و *کلستریدیوم پرفرینجنس* در درجه دوم، از عوامل ایجاد آلودگی و فساد در لاشه بوده و علاوه بر کاهش کیفیت و طول زمان نگهداری، می‌توانند بر سلامت مصرف‌کننده نیز موثر باشند (Nhunge et al., 2018). گوشت مرغ نسبت به سایر گوشت‌های طیور به علت خصوصیات مانند هزینه و چربی کمتر، طبخ سریع و هضم آسان، ارجحیت یافته است. همچنین، گوشت از جنبه‌های متفاوت مانند اسیدیته، رطوبت، گلیکوژن، فاکتورهای رشد و مواد از ته و معدنی، محیط مناسبی برای رشد میکروارگانیسم‌ها است (Abdel-Aziz et al., 2016). سالمونلوزیس یکی از بیماری‌های عمده ناشی از مواد غذایی است که اخیراً منجر به نگرانی‌هایی در سطح بهداشت عمومی شده است. این باکتری با ۲۶۵۹ سروتیپ، جزء دومین موارد بیماری‌های ناشی از مصرف مواد غذایی آلوده در آمریکا می‌باشد (Lamichhane et al., 2024). از بین سروتیپ‌های مختلف سالمونلا، سروتیپ‌های سالمونلا تایفی موریوم (*S. Typhimorium*) و سالمونلا انتریتیدیس (*S. Enteritidis*) در رتبه اول عفونت غذایی قرار دارند، که در آسیا (کره، ژاپن، تایلند و...) نیز بسیار شایع می‌باشند. در مطالعات مختلف، میزان شیوع آن از ۲/۷۴ درصد در آمریکا تا ۸/۳ درصد در کشور ایران گزارش شده است. این باکتری تقریباً ۲۵ میلیون مورد عفونت و حدود ۲۰۰۰۰۰ مرگ در سطح جهان در هر سال ایجاد می‌نماید. با توجه به میزان مرگ و میر بالا، این مساله به عنوان خطری جدی برای جامعه بشری تلقی می‌گردد. با توجه به پژوهش‌های محققین مختلف و اطلاعات آماری، محصولاتی از جمله گوشت مرغ، گوشت گاو، شیر و تخم-مرغ از مهم‌ترین منابع غذایی حاوی سالمونلا می‌باشند (Rahman et al., 2018). سالمونلا تایفی موریوم یکی از شایع‌ترین پاتوژن‌های مواد غذایی جدا شده از گوشت مرغ

است (Agridemir et al., 2020). به دنبال توسعه صنعت مرغداری و افزایش تولید و مصرف گوشت طیور و فرآورده‌های آن‌ها در دهه‌های اخیر، سهم فرآورده‌های طیور در ایجاد عفونت غذایی در جوامع انسانی افزایش یافته است. در نتیجه، سهم سروتیپ *S. Typhimorium* و *S. Enteritidis* با منشاء گوشت و تخم مرغ در ایجاد مسمومیت‌های انسانی نیز افزایش یافته و پیش‌بینی می‌شود دلیل افزایش بروز سویه‌های سالمونلا مقاوم به آنتی‌بیوتیک و انتقال آن از طریق زنجیره غذایی، بیماری‌زایی آن خطرناک‌تر شده است (Fahimi et al., 2017). برنامه‌های گسترده و فشرده‌ای که برای تشخیص آلودگی محصولات متنوع طیور به سالمونلا در سطح جهان به اجرا در آمده، موفقیت در تشخیص و گزارش موارد آلودگی یا عفونت را در پی داشته‌اند. امروزه روش میکروبیولوژی مبتنی بر کشت، مطمئن‌ترین طریق برای ردیابی و نشان دادن حضور سالمونلا در مواد غذایی محسوب می‌شود. با این وجود، این روش وقت‌گیر می‌باشد و برای رسیدن به جواب نهایی به ۴ تا ۷ روز زمان نیاز است. استفاده از روش الایزا برای ردیابی سالمونلا در مواد غذایی نیز کارایی گسترده‌ای یافته است ولی مشکل ایجاد نتایج مثبت کاذب باعث محدودیت در استفاده از این روش گردیده است. لذا به روش‌های دقیق‌تر و سریع‌تر اما حساس و با ویژگی بالا در این زمینه نیاز است. کشف و ابداع روش‌های مولکولی، راه‌های سریع‌تری را برای ردیابی و تشخیص سویه‌های سالمونلا ایجاد نموده است. در حال حاضر، توسعه روش‌های زیست‌شناسی مولکولی این امکان را فراهم ساخته است که بتوان با این روش‌ها با دقت و سرعت زیاد به شناسایی عوامل بیولوژیک در نمونه‌های بالینی و به موقع آن برای جلوگیری از اپیدمی و عوارض مخرب این باکتری پرداخت. در این بین، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است. آزمایش‌های PCR متنوعی از جمله Real-time PCR جهت تشخیص سریع سالمونلاها در نمونه‌های بالینی و مواد غذایی استفاده شده است (Riose-Castillo et al., 2022). روش واکنش زنجیر ای پلیمرز که براساس پدیده طبیعی تکثیر DNA در سلول‌ها استوار شده است، از نظر تئوری امکان ردیابی حتی یک سلول باکتری را در عرض چند ساعت در نمونه فراهم می‌نماید. لذا با استفاده از این روش، یک نسخه از

ژن‌های خانه‌دار که ژن‌های ضروری در متابولیسم و فعالیت سلول می‌باشند و به دلیل تولید پروتئین که برای بقا و عملکرد ضروری است، می‌توان از آن‌ها علاوه بر شناسایی، با حذف بسیاری از فرایندهای وقت گیر، امکان بررسی تولید محصول در حین انجام واکنش در نمونه‌ها را میسر ساخته است (Hosseinpour et al., 2013). بنابراین تشخیص سریع، با هزینه موثر و اتوماتیک پاتوژن‌های غذازاد در طول زنجیره مواد غذایی، همچنان به عنوان نگرانی و دغدغه اصلی صنایع و سلامت عمومی ادامه دارد. به دلیل این نیازمندی Real-time PCR، توانایی برآورده کردن تمام این نیازها را، به وسیله تکثیر و کشف هم‌زمان، در یک واکنش یک مرحله‌ای را دارد (Tajik et al., 2022). هدف از این تحقیق، بررسی مقایسه‌ای میزان آلودگی *سالمونلا* تایفی موریوم در *سالمونلا*های جدا شده از نمونه‌های مرغ منجمد وارداتی به روش کشت و Real-time PCR می‌باشد.

مواد و روش کار

جامعه آماری و نمونه‌برداری

۷۳ نمونه در سه هفته متوالی از سه شماره بهر متفاوت از مرغ‌های منجمد وارداتی به صورت تصادفی (۲۴+۲۴+۲۵) اخذ گردید و مطابق دستور العمل شماره ۱۷۲۱۹ استاندارد ملی ایران جهت اخذ نمونه از مرغ‌ها، پوست و بافت زیر پوست ناحیه سینه توسط تیغه اسکالپل استریل برش داده و مقدار معینی برداشته شد.

جست‌وجو، جداسازی و تشخیص *سالمونلا* از نمونه‌ها به روش کشت و مولکولی

شناسایی باکتری *سالمونلا* به روش کشت مطابق استاندارد ملی شماره ۱۸۱۰ انجام شد. در ابتدا ۲۵ گرم از نمونه را وزن کرده و در شیشه استریل ریخته و به آن ۲۲۵ میلی‌لیتر بافر پپتون واتر (Merck, Germany) اضافه شد. مخلوط را بخوبی مخلوط کرده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شبانه روز (۲۰-۱۶ ساعت) گرم‌خانه‌گذاری شد. سپس مقدار ۱/۱ میلی‌لیتر از محیط پیش‌غنی کننده به ۱۰ میلی‌لیتر از محیط *Rappaport-Vassiliadis Soy Peptone Broth (RVS)* (Merck, Germany) انتقال داده و در دمای ۴۱/۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شبانه‌روز گرم‌خانه‌گذاری شد. سپس با استفاده از یک لوپ، از محیط *RVS* برداشته و روی پلیت‌های *Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) agar* یا *SS agar*

(Merck, Germany) کشت و به مدت یک شبانه‌روز در دمای ۳۷±۱ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شد. کلنی مشکوک به *سالمونلا* دارای مرکز سیاه و هاله شفاف قرمز رنگ یا هاله قرمز-صورتی اطراف کلنی روی محیط‌های غیرانتخابی مثل پلیت‌های نوترینت برای تایید شیمیایی و سروتایپینگ *سالمونلا* کشت داده شد و سروتایپینگ با استفاده از آنتی‌سرم‌های تجاری ساخت شرکت Mast انجام گردید و در ادامه هم‌زمان با روش کشت سنتی، ردیابی جنس *سالمونلا* و گونه *سالمونلا* تایفی موریوم به روش مولکولی *Real-time PCR* نیز از نمونه‌های اخذ شده صورت گرفت.

استخراج DNA

نمونه‌ها پیش از استخراج به مدت یک شبانه‌روز در محیط پیش‌غنی‌کننده کشت داده شدند. بدین منظور، مشابه کشت میکروبی ۲۵ گرم از مرغ را وزن کرده و در شیشه استریل ریخته و به آن ۲۲۵ میلی‌لیتر پپتون واتر اضافه شد. برای اطمینان از درستی استخراج و عدم بروز آلودگی در حین کار، عمل استخراج روی یک نمونه منفی (آب تزریقی به عنوان T_0) هم انجام شد. به تعداد نمونه‌هایی که می‌بایست استخراج شوند، میکروتیوب ۲ میلی‌لیتری سترون در راک گذاشته و به هر میکروتیوب مقدار ۲۰۰ تا ۲۵۰ میکرولیتر از نمونه‌ی آماده شده برای استخراج منتقل و مشخصات هر نمونه بر روی آن‌ها ثبت شد. در این تحقیق از کیت *High Pure PCR Template Preparation Kit* شرکت Roch با شماره کاتالوگ: ۱۱۷۹۶۸۲۸۰۰۱ استفاده شد و پس از استخراج *DNA* به منظور تشخیص کیفیت و کمیت آن، یک میکرولیتر از نمونه در دستگاه نانودراپ (Canada smart tech inc, Toronto) قرار داده و با استفاده از نرم افزار مخصوص، مقدار *DNA* در دو طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ بررسی گردید.

واکنش Real time PCR

در این تحقیق از ترمال سایکلر RotorGene Q (Qiagene, Germany) و کیت QIAGEN OneStep RT-PCR Kit استفاده شد. همچنین جهت بررسی عدم وجود آلودگی و تشکیل پرایمر دایمر از میکروتیوب فاقد نمونه به عنوان کنترل منفی استفاده شد. از سوش استاندارد باکتری *سالمونلا* تیفی موریوم ATCC 14028 به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. برای ساخت مسترمیکس در آزمایش، مقدار ۱۳/۲ میکرولیتر آب مقطر

عاری از DNA)، ۲/۵ میکرولیتر بافر 10X، یک میکرولیتر رنگ SYBR Green، یک میکرولیتر dNTP و یک میکرولیتر $MgCl_2$ ۱/۵، ۱۰ μM و ۰/۳ میکرولیتر Taq به میکروتیوب اضافه شده و به آرامی ورتکس شد تا خوب مخلوط شوند. در مرحله بعد، ۳ میکرولیتر از ژنوم مورد آزمایش ریخته شد. شرایط انجام واکنش‌های Real-time PCR مطابق جدول ۱ است.

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه (So Youn, 2017)

اندازه قطعه محصول (bp)	شماره ثبت در بانک ژن	توالی های الیگونیوکلوئیدی (۵' به ۳')	نام پرایمر	ژن هدف
96	YP-005237010	CCTCATCTATTCAGCGGAAAT	Forward primer	S. Typhimurium
		CGGACACCCTTCATGGTTAATA	Reverse primer	
123	YP-005237010	AGCGTACTGGAAAGGGAAAG	Forward primer	Genus Salmonella

آلوده تشخیص داده شد (۱۲/۳ درصد از کل نمونه) و از تعداد ۹ نمونه مثبت، تعداد ۴ نمونه درآزمون Real Time PCR با پرایمرهای اختصاصی *Salmonella Typhimurium* تشخیص داده شد (۵/۴ درصد از کل نمونه) (نمودار ۱).

بعد از اتمام مراحل فوق برای اطمینان از فرآیند کار و نتیجه آزمون Real Time PCR، ۹ نمونه مثبت جنس *سالمونلا* و چهار نمونه مثبت *سالمونلا تیفی موریوم* در آزمون Real time PCR همراه یک نمونه کنترل مثبت (*سالمونلا تیفی موریوم* ATCC14028) و یک نمونه کنترل منفی بر روی ژل آگارز ۲ درصد با ولتاژ ۱۱۰ بمدت ۵۰ تا ۶۰ دقیقه ران شد (شکل ۱) که مشاهده باند در محدوده ۱۲۳ bp و ۹۶ bp به ترتیب مربوط به جنس *سالمونلا* و گونه تایفی موریوم نشان از صحت و دقت آزمون Real time PCR داشت.

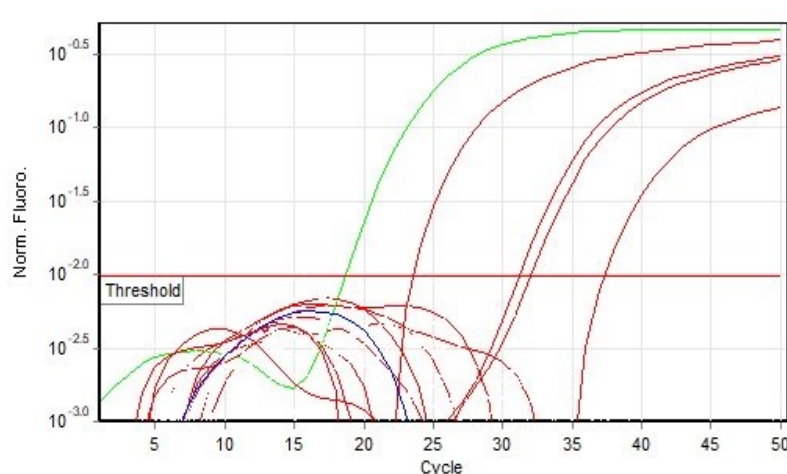
تعیین بازده تکثیر

جهت بررسی بازده واکنش، نمودار استاندارد رسم گردید. برای این کار رقت‌های مختلف از DNA تهیه کرده و سپس برای آن‌ها تست Real time انجام شد و از CT های حاصل و غلظت موجود برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد. بازده تکثیر توسط دستگاه محاسبه گردید.

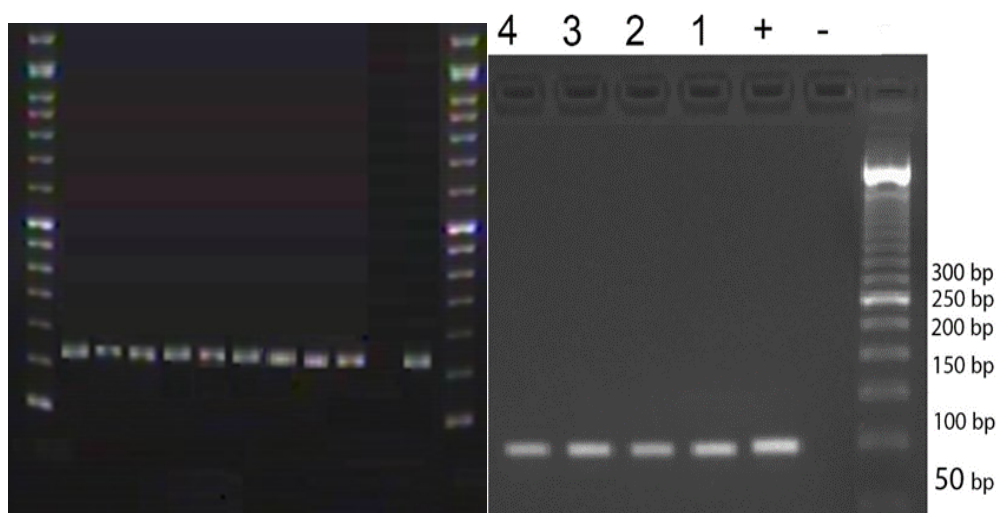
نتایج

نتایج کشت میکروبی

از ۷۳ نمونه مرغ منجمد وارداتی درآزمون‌های کشت میکروبی (جستجوی *سالمونلا*)، تعداد ۵ نمونه آلوده به *Salmonella spp* تشخیص داده شد (۶/۸ درصد از کل نمونه) و از این تعداد نمونه *سالمونلا* مثبت درروش کشت، تعداد ۲ نمونه *Salmonella Typhimurium* درآزمون آنتی‌سرم تشخیص داده شد (۲/۷ درصد از کل نمونه). از تعداد ۷۳ نمونه مرغ منجمد وارداتی درآزمون Real Time PCR با پرایمرهای اختصاصی جنس *سالمونلا*، ۹ نمونه



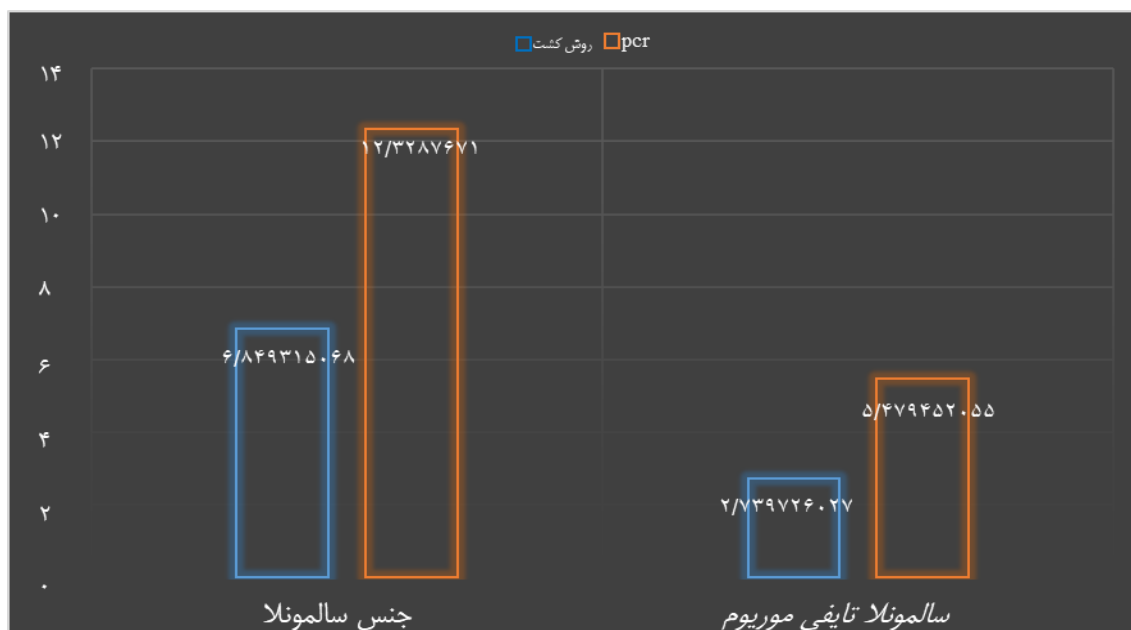
نمودار ۱- نمودار تکثیر مربوط به ژن سالمونلا تایفی موریوم (*Salmonella Typhimorium*) در نمونه‌ها



شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR باند ۹۶bp مربوط به *سالمونلا تیفی موریوم* (A) و باند ۱۲۳bp مربوط به جنس *سالمونلا* (B)

در ادامه این مطالعه، ارقام حاصله در تشخیص نوع گونه *سالمونلا* در روش Real Time PCR به میزان دو برابر روش آنتی-سرم بوده است و یافته‌های این تحقیق که در آن عدد حاصل از روش Real Time PCR، ۵/۷ درصد و در روش کشت، ۲/۷ درصد بوده است، مبین ادعای فوق می-باشد.

با توجه به نتایج حاصل از انجام این بررسی و مطالعه مقایسه‌ای بین روش آزمون‌ها و ارقام حاصله در ردیابی جنس *سالمونلا* معین گردید، در روش Real Time PCR، ۱/۸ برابر (حدود ۲ برابر) نسبت به روش کشت برتری وجود داشته است، که این ادعا را می‌توان با اعداد بدست آمده که به ترتیب ۱۲/۳ به روش Real Time PCR و ۶/۸ به روش کشت است، بیان کرد (نمودار ۲).



نمودار ۲- نمودار مقایسه‌ای روش کشت و روش مولکولی

بحث

اهمیت جستجوی سالمونلا در مواد غذایی

به گزارش سازمان جهانی بهداشت، ۱۶ تا ۳۳ میلیون مورد بیمار و ۵۰۰ تا ۶۰۰ هزار مرگ سالیانه در اثر این باکتری، یک معضل بزرگ در جهان می‌باشد (Eng et al., 2015). حدود ۴۰ درصد از کل مسمومیت‌های غذایی را جنس سالمونلا ایجاد می‌نماید. عمده‌ترین مواد غذایی مسئول در انتقال سالمونلا در کشور ایران تخم‌مرغ و گوشت مرغ می‌باشند. گزارش سازمان بهداشت جهانی نشان می‌دهد که در کشورهای در حال توسعه، هر سال از هر ۱۰۰۰ نفر، ۵ مورد مبتلا به سالمونلا دیده می‌شود.

(Azizpour, 2020). از این رو، تشخیص به موقع و

درست این باکتری در مواد غذایی و افراد مشکوک به آلودگی ضروری به نظر می‌رسد. در جدول ۲، دستورالعمل اجرایی کنترل و نظارت بهداشتی فرآورده‌های خام دامی سازمان دامپزشکی کشور آورده شده است (IVO, 2021). مطابق این دستورالعمل، ملاک و قضاوت را براساس جستجو و تشخیص سالمونلا قراردادده که این اهمیت موضوع را نشان داده و قضاوت درمورد نمونه‌های وارداتی هم به همین صورت، سختگیرانه است. براین اساس، سروتیپ‌های سالمونلا به عنوان یکی از مهم‌ترین پاتوژن‌های غذازاد در سراسر دنیا در نظر گرفته شده اند.

جدول ۲- دستورالعمل اجرایی کنترل و نظارت بهداشتی فرآورده‌های خام دامی سازمان دامپزشکی کشور (IVO, 2021).

فرآورده	آزمون	تعداد نمونه (n)	c	m	M
لانشه کامل مرغ (تازه/ منجمد)	شمارش کامل میکروارگانیسم‌ها (در یک گرم)	۵	۲	۱.۵	۱.۶
	سالمونلا (در ۲۵ گرم)	۵	۰	منفی	
گوشت مرغ قطعه‌بندی / بسته‌بندی (با یا بدون استخوان)	شمارش کامل میکروارگانیسم‌ها (در یک گرم)	۵	۳	۱.۵	۱.۶
	استافیلوکوکوس / ارتوس کواگولاز مثبت (در یک گرم)	۵	۲	۱.۲	۱.۲
	سالمونلا (در ۲۵ گرم)	۵	۰	منفی	-
تازه/منجمد	اشریشیا کلی (در یک گرم)	۵	۲	۵۰	۵۰۰

* در مواردی که فقط یک نمونه به آزمایشگاه ارسال می‌شود (نمونه منفرد)، ویژگی‌های میکروبی نمونه با حد m سنجیده می‌شوند.

هر بهر براساس شرایط زیر، قابل مصرف یا غیرقابل مصرف تشخیص داده می‌شود:

۱- در مواردی که تمام نمونه‌ها m باشد، بهر قابل قبول است.

۲- در مواردی که تعداد $C \geq n$ از نمونه، بین $m < M$ باشد، بهر قابل قبول است.

۳- در مواردی که هریک از نمونه‌ها $M < M$ باشد، بهر غیر قابل قبول است.

۴- در مواردی که تعداد $C < n$ از نمونه، بین $m < M$ و $M \geq m$ باشد، بهر غیر قابل قبول است.

استفاده از روش‌های مولکولی به عنوان تست‌های تاییدی و رفع مشکلات مربوط به آزمون‌های سرولوژیکی به دلیل ایجاد واکنش‌های متقاطع با سایر میکروارگانیسم‌ها و نبود الگوهای مناسب جهت تفسیر تیتراهای آنتی‌بادی در مناطق اندمیک، ارجحیت یافته است (Hurely et al., 2014). یکی از مشتقات PCR، تکنیک Real Time PCR می‌باشد که علاوه بر شناسایی، با حذف بسیاری از فرایندهای وقت‌گیر، امکان بررسی تولید محصول را در حین انجام واکنش در نمونه‌ها را میسر ساخته است (Fahimi et al., 2017).

Park, Hee-Jin و همکاران در سال ۲۰۰۹ بیان داشتند که برای بررسی quantitative PCR سالمونلا سروار تیفی موریوم^۱ در نمونه‌های مواد غذایی، یک روش Real-time PCR براساس معادل ژنوم DNA ایجاد شد. در این روش، تعیین مقدار کمی با استفاده از مقدار چرخه آستانه CT و مقایسه با یک منحنی استاندارد کمی بدست می‌آید. این روش مناسب و کاربردی جهت تعیین و کمی‌سازی سالمونلا تیفی موریوم در نمونه‌های مواد غذایی است.

Cortez و همکاران در سال ۲۰۰۶ در تحقیقی که بدلیل گزارش وقوع گونه‌های سالمونلا، جستجوی سالمونلا/انتریتیدیس و تیفی موریوم در کشتارگاه‌های مرغ انجام شد، نشان دادند که باکتری‌های جداشده سالمونلا با استفاده از مالتی پلکس PCR با استفاده از سه مجموعه پرایمر که توالی‌های ژن *pefA*، *invA* و *sefA* را از سالمونلا تیفی موریوم و سالمونلا/انتریتیدیس هدف قرار می‌دهند، شناسایی شدند. ۱۰ درصد نمونه‌ها آلوده به سالمونلا بودند. از این میان، بیشترین درصد به انتریتیدیس و بعد تیفی موریوم بودند. حسین پور و همکاران در سال ۱۳۹۲ در یک پژوهش مقطعی و توصیفی بعد از نمونه‌گیری ۶۰ جوجه کباب از سطح فروشگاه‌های تهران و انجام تست های PCR و الایزا و کشت جهت تشخیص سالمونلا، اظهار داشتند که روش PCR کفایت و حساسیت لازم به منظور پایش سریع سالمونلا را دارد که با نتایج این پژوهش همخوانی داشت.

در مطالعه حاضر، از ۷۳ نمونه مرغ منجمد وارداتی درآزمون‌های کشت میکروبی (جستجوی سالمونلا)، تعداد ۵ نمونه آلوده به جنس سالمونلا تشخیص داده شد (۶/۸ درصد از کل نمونه). از تعداد ۵ نمونه سالمونلای مثبت درروش کشت، تعداد ۲ نمونه سالمونلا تیفی موریوم درآزمون آنتی‌سرم تشخیص داده شد (۲/۷ درصد از کل نمونه). درحالی‌که از تعداد ۷۳ نمونه مرغ منجمد وارداتی درآزمون QPCR با پرایمرهای اختصاصی جنس سالمونلا، ۹ نمونه آلوده تشخیص داده شد (۱۲/۳ درصد از کل نمونه). از این تعداد نمونه مثبت، تعداد ۴ نمونه درآزمون QPCR با پرایمرهای اختصاصی سالمونلا تیفی موریوم مثبت تشخیص داده شد (۵/۴ درصد از کل نمونه).

با استفاده از روش‌های کشت و بیوشیمیایی در آزمایشگاه‌های استاندارد فعلی، حداقل ۷ روز زمان برای تشخیص آلودگی لازم است. محیط‌سازی پی‌درپی، افزایش خطای فردی و ابزار، متغیر شدن درجه حرارت انکوباسیون به دلیل باز و بسته شدن درب دستگاه و غیره از جمله علل افزایش میزان خطا در تشخیص آلودگی با استفاده از روش‌های کشت و بیوشیمیایی است (Dogan et al., 2014). روش‌های ایمونولوژیک و سرولوژیک نیز استفاده می‌شود اما هنوز مشکلات بسیاری در رابطه با حساسیت و اختصاصیت این روش‌ها وجود دارد و به علت مشکلات تکنیکی، سختی کار و زمان زیاد جهت تشخیص این روش‌ها عمومیت زیادی نیافته‌اند (Heymans et al., 2018). در مطالعه‌ای که جداسازی سالمونلا به روش کشت مشهود انجام گرفته بود، از تعداد ۷۰ نمونه مرغ تازه ۱۲ نمونه یا بعبارتی ۸/۶ درصد آلودگی به سالمونلا تشخیص داده شد. میزان آلودگی در مرغ‌های تازه به مراتب بیشتر از مرغ‌های منجمد می‌باشد. شایع‌ترین سالمونلاهای جدا شده از نوع سالمونلا تیفی موریوم و سالمونلا/انتریتیدیس بود (Rasouli, 2001). از سه روش رایج به تشخیص باکتری سالمونلا و سروارهای آن روش مولکولی دقیق‌ترین روش می‌باشد.

بررسی روش SYBR Green Real-time PCR و مزایای آن نسبت به سایر روش‌ها

^۱ *Salmonella enterica* serovar Typhimurium

۱/۸ برابر (حدود ۲ برابر) در شناسایی موارد آلودگی نسبت به روش کشت برتری وجود داشته است، در ادامه این مطالعه، ارقام حاصله در تشخیص نوع گونه نیز در روش Real Time PCR به میزان دو برابر روش آنتی-سرم بوده است. از این رو، استفاده از روش‌های مولکولی با دقت بالا از جمله Real-time PCR در بحث تصمیم‌گیری سریع این ارقام غذایی وارداتی و حفظ کیفیت بهداشتی این محصولات بسیار کارآمد و ضروری می‌باشد و بر اهمیت استفاده از تکنیک‌های تشخیصی پیشرفته برای افزایش اقدامات ایمنی غذا در صنعت طیور تأکید می‌کند.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه سمنان مربوط به طرح پایان‌نامه دانشجویی به شماره ثبت ۵۹ نهایت تشکر و قدردانی را ابراز می‌دارند.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌نمایند که در این پژوهش هیچگونه تعارض منافی ندارند.

مشارکت‌های نویسندگان

م.پ و ش.م. در طراحی و اجرای آزمایش نقش داشتند. ش.م. نمونه برداری و آنالیز آزمایش را انجام داد. ح.ا. تجزیه و تحلیل داده‌ها را انجام داد. ا.ج.ج. در طراحی آزمایش و استاندارد سازی مطالعه مشارکت داشتند و م.پ. ح.ا. در تهیه مقاله و آماده سازی جهت انتشار مشارکت داشتند.

منابع مالی

این پژوهش مربوط به پایان‌نامه دانشجویی بوده و توسط دانشگاه سمنان حمایت مالی شده است.

بیانیه اخلاقی

این پژوهش بر روی نمونه‌های مرغ منجمد وارداتی موجود در بازار انجام شده و هیچگونه مداخله‌ای بر روی انسان یا حیوان زنده صورت نگرفته است. بنابراین، بر اساس دستورالعمل‌های اخلاق در پژوهش، اخذ رضایت‌نامه آگاهانه و تأییدیه کمیته اخلاق برای این مطالعه الزامی نبوده است. کلیه مراحل نمونه‌برداری، انجام آزمایش‌ها، ثبت و گزارش نتایج با رعایت اصول امانت‌داری علمی، صداقت در پژوهش و حفظ محرمانگی اطلاعات مربوط به محل تهیه نمونه‌ها انجام شده است.

تاجیک و همکاران در سال ۱۳۹۸، با بررسی ۱۵ نمونه گوشت مرغ از فروشگاه‌های مختلف به روش PCR، نشان داد که ۱۴ نمونه آلودگی *سالمونلا* تایفی موریوم داشتند و به این نتیجه رسیدند که روش‌های مولکولی از جمله PCR با دقت و سرعت بالایی آلودگی‌های مواد غذایی را شناسایی می‌کند در نتیجه می‌توان با بکارگیری روش‌های موثر از گسترش بیماری در طیور جلوگیری کرد. مطابق با نتایج این مطالعه، Saeed و همکاران در سال ۲۰۱۳ در مطالعه‌ای به منظور تعیین شیوع آلودگی *سالمونلا* در مرغ‌های وارداتی از مبداهای مختلف به بازارهای محلی جنوب عراق (دیوانیه)، نشان دادند که از ۱۰۰ نمونه، ۲۲ نمونه *سالمونلا* توسط واکنش PCR شناسایی شد. هفت نمونه از ۲۲ جدایه به - عنوان *سالمونلا* تایفی موریوم شناسایی شد که بالاترین درصد را داشت. Heymans و همکاران در سال ۲۰۱۸ با استفاده از multiplex quantitative PCR (qPCR) که برای تشخیص همزمان جنس و گونه‌های *سالمونلا*، *سروروار* تایفی موریوم و *انتریتیدیس* در نمونه‌های مختلف (موادغذایی) آزمون و ارزیابی انجام دادند. با آزمایش ۲۲۵ نمونه *سالمونلا* و ۳۴ نمونه *غیرسالمونلا* از منابع مختلف، اختصاصی بودن این تست را مشخص کردند. اختصاصیت آزمون QPCR مالی پلکس برای ردیابی همه ایزوله‌های *سالمونلا*، از جمله ۷۲ نمونه *سالمونلا* تایفی موریوم، و ۵۳ نمونه *سالمونلا* *انتریتیدیس*، ۱۰۰ درصد بود.

نتیجه‌گیری

محصولات خام دامی بخصوص محصولات وابسته به طیور از جمله مرغ‌های وارداتی از مهم‌ترین منابع باکتری *سالمونلا* و بویژه *سالمونلا* تایفی موریوم می‌باشند. بنابراین باتوجه به واردات زیاد موادخام دامی از خارج کشور، نیاز به نظارت دقیق بهداشتی از مبدا تا مقصد و پایش میکروبی منظم این محصولات در دستورکار ارگان‌های نظارتی در کوتاه‌ترین زمان قرارگیرد. در مجموع، اگرچه روش کشت به عنوان روش استاندارد برای ردیابی *سالمونلا* در مواد غذایی مطرح است، اما این روش به ۴-۷ روز زمان نیاز داشته و عوامل انسانی، مواد و تجهیزات سبب خطای قابل توجهی در نتایج حاصل از آن می‌گردد. درحالیکه، روش PCR به ویژه Real Time PCR از سرعت، ویژگی و دقت بالایی جهت شناسایی *سالمونلا* برخوردار است. در این مطالعه با توجه به نتایج حاصله و مطالعه مقایسه‌ای بین روش آزمون‌ها مشخص گردید، که روش Real Time PCR،

References

- Agirdemir, O., Yurdakul, O., Keyvan, E., & Sen, E. (2020). Effects of various chemical decontaminants on Salmonella Typhimurium survival in chicken carcasses. *Food Science and Technology*, 41, 335-342.
- Azizpour, A. (2020). A Study of Salmonella Spp. Contamination Rate of Eggs and Assessment of their Antibiotic Resistance Pattern in Ardabil, Iran. *Qum University of Medical Sciences Journal*, 14(1), 38-50 (In Persian).
- Abdel-Aziz, N. M. (2016). Detection of Salmonella species in chicken carcasses using genus specific primer belong to invA gene in Sohag city, Egypt. *Veterinary World*, 9(10), 1125.
- Saeed, A. A., Hasoon, M. F., & Mohammed, M.H. (2013). Isolation and Molecular Identification of Salmonella typhimurium from Chicken Meat in Iraq. *Journal of World's Poultry Research*, 3(2): 63-67.
- Cortez, A. Cavalho, A. C. F. B., Ikuno, A. A., Burger, K. P., & Vidal-Martins, A. M.C. (2006). Identification of salmonella spp. Isolates from chicken abattoirs by multiplex-PCR. *Research in Veterinary Science*, 81(3), 340-344.
- de Freitas, C. G., Santana, A. P., da Silva, P. H. C., Gonçalves, V. S. P., Barros, M. D. A. F., Torres, F. A. G., & Perecmanis, S. (2010). PCR multiplex for detection of Salmonella Enteritidis, Typhi and Typhimurium and occurrence in poultry meat. *International journal of food microbiology*, 139(1-2), 15-22.
- Dougan, G., & Baker, S. (2014). Salmonella enterica serovar Typhi and the pathogenesis of typhoid fever. *Annual review of microbiology*, 68, 317-336.
- Dousandeh, S., Asaadi Tehrani G., Amini B., & Maziri, P. (2016). Simultaneous Detection of invA, STM4497, and fliC183 Genes in Salmonella typhimurium by Multiplex PCR Method in Poultry Meat Samples in Zanjan, Iran. *Infection Epidemiology and Medicine*, 2(4), 20 -23.
- European Food Safety Authority, & European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). (2015). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. *EFSA Journal*, 13(12), 4329.
- Eng, S. K., Pusparajah, P., Ab Mutalib, N. S., Ser, H. L., Chan, K. G., & Lee, L. H. (2015). Salmonella: a review on pathogenesis, epidemiology, and antibiotic resistance. *Frontiers in Life Science*, 8(3), 284-293.
- Executive Instructions on "Health Surveillance, Risk Assessment and Management of Domestically Produced Poultry Meat". National Veterinary Regulations. FS/400/01/IVO. May 2021.WWW.IVO.IR
- Fahimi S., Ahari, H., & Sheikhi, N. (2017). Designing of Real-time PCR Method and HRM Analysis in Separation and Recognition Salmonella typhimurium and salmonella enteritidis in raw egg. International Conference on Agricultural Engineering and Natural Resources, 3.
- Ghoddusi, A., Fasaai, B. N., Karimi, V., Tamai, I. A., Moulana, Z., & Salehi, T. Z. (2015). Molecular identification of Salmonella Infantis isolated from backyard chickens and detection of their resistance genes by PCR. *Iranian journal of veterinary research*, 16(3), 293.
- Heymans, R., Vila, A., Van Heerwaarden, C. A., Jansen, C. C., Castelij, G. A., van der Voort, M., & Biesta-Peters, E. G. (2018). Rapid detection and differentiation of Salmonella species, Salmonella Typhimurium and Salmonella Enteritidis by multiplex quantitative PCR. *PLOS One*, 13(10), e0206316.
- Hosseinpour, M., Azar Sabokbar, A., Amir Bakhtiari, A., & Parsa, S.(2013). Comparison of bacterial culture, ELISA, and PCR techniques for detection of salmonella in poultry meat samples collected from Tehran. *Journal of microbial world*, 6 (1). 61-72.
- Hurley, D., McCusker, M. P., Fanning, S., & Martins, M. (2014). Salmonella–host interactions–modulation of the host innate immune system. *Frontiers in immunology*, 5, 481.
- Jamshidi, A. E., Basami, M., & Afshari, N. S. (2009). Identification of Salmonella spp. and Salmonella typhimurium by a multiplex PCR-based assay from poultry carcasses in Mashhad-Iran. *International Journal of Veterinary Research*, 3(1), 43-48.
- Lamichhane, B., Mawad, A.M.M., Saleh, M., Kelley, W.G., Harrington, P.J., Lovestad, C.W., Amezcua, J., Sarhan, M.M., El Zowalaty, M.E., Ramadan, H., Morgan, M., & Helmy, Y.A. (2024). Salmonellosis: An Overview of Epidemiology, Pathogenesis, and Innovative Approaches to Mitigate the Antimicrobial Resistant Infections. *Antibiotics*, 13(76). <https://doi.org/10.3390/antibiotics13010076>

- Nhung, N. T., Van, N. T. B., Van Cuong, N., Duong, T. T. Q., Nhat, T. T., Hang, T. T. T., & Carrique-Mas, J. (2018). Antimicrobial residues and resistance against critically important antimicrobials in non-typhoidal *Salmonella* from meat sold at wet markets and supermarkets in Vietnam. *International Journal of Food Microbiology*, 266, 301-309.
- Park, H. J., Kim, H. J., Park, S.H., Kim, J. H., & Kim, H. Y. (2009). Direct and Quantitative Analysis of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Using Real-Time PCR from Artificially Contaminated Chicken Meat. *J. Food Microbiol.* 18 (8), 1453-1458.
- Rahman, H. S., Mahmoud, B. M., Othman, H. H., & Amin, K. (2018). A review of history, definition, classification, source, transmission, and pathogenesis of salmonella: a model for human infection. *Journal of Zankoy Sulaimani*, 20(3-4), 11-19.
- Safi, M., AlBalaa, B., Qasem, S., Al Hallab, L., & Al-Mariri Avicenna A. (2022). Isolation and identification of *Salmonella* Typhimurium in Retail Meat Sources by Multiplex Polymerase Chain Reaction. *Journal of clinical micrpbiology*, 9(4), doi: 10.34172/ ajcmi. 2022.3042.
- Shji, S., Selvaraj, R. K., Shanmugasudaram, R. (2023). *Salmonella* infection in poultry: a review on the pathogen and control strategies. *Microorganisms*, 11(11): 2814. doi: 10.3390/microorganisms11112814
- Tajic, K., Edalatian Dovom, M.R., Mortazavi, A., Javadmanesh A. (2019). Identification of *Salmonella* Typhimurium bacteria in chicken meat by the PCR method. National Conference on Sustainable Development with the Opportunity and Investment Challenges Approach in the Terrible Area-Kashmar-<https://civilica.com/doc/905067>(In persian).
- Tajik Toughan, K., Edalatian Dowom, M.R., Mortazavi, S.A., Javadmanesh, A. (2022). Detection of *Salmonella* spp. in raw chicken products using specific primer-probe set by Real time-PCR method. *Iranian Food Science and Technology*. 18(5), 589-601(In persian).
- Youn, S. Y., Jeong, O. M., Choi, B. K., Jung, S. C., & Kang, M. S. (2017). Development of a Real-Time Multiplex PCR Assay with Propidium Monoazide Treatment for Simultaneous Detection of Live *Salmonella*, and *Salmonella* Enteritidis, S. Typhimurium, S. Pullorum, and S. Gallinarum, in Rinse Water of Chicken Carcasses. *Food Analytical Methods*, 10(6), 1681-1689.
- Yousefi Mashauf R. (2001). Investigation of the prevalence of salmonella infection in chickens offered for consumption in Hamedan. *Journal of advances in medical and biomedical Research*, 33, 47.