# مقایسه دو روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و کشت استاندارد برای تشخیص سالمونلا در شیر خام

مجتبی بنیادیان[1*]، تقی زهرایی‌صالحی[2]، امیر مهربانی[3]

## چکیده

باکتری سالمونلا از جمله باکتری‌های بیماریزا است که می‌تواند در غذا و مواد اولیه حضور پیدا کند. وجود این باکتری در مواد غذایی علاوه بر ایجاد بیماری می‌تواند باعث افت کیفیت تولید و کاهش رشد اقتصادی کشور شود. در این مطالعه، تعداد ۱۵۰ مخزن حمل شیر خام برای شناسایی و جداسازی باکتری سالمونلا در شیر خام، برای مقایسه روش‌های واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و کشت مورد آزمایش قرار گرفت. در این روش ابتدا شیر خام به روش استاندارد مورد کشت و آزمایش قرار گرفت و سپس مراحل تکمیلی و شناسایی برای جداسازی باکتری سالمونلا انجام شد. با استفاده از روش کشت، ٦ نمونه کشت باکتری مشکوک، برای انجام آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) انتخاب شد که پس از آزمایش PCR و استفاده از شناساگر ژن invA نتایج آزمایش منفی شد. سپس آزمون PCR مستقیم بر روی شیرخام با استفاده از شناساگر ژن invA انجام شد. در این روش تعداد ۳ نمونه از ۱۵۰ نمونه مورد آزمایش مثبت گردید. در مجموع در ۲٪ از کل نمونه‌ها، آلودگی به باکتری سالمونلا وجود داشت. نتایج این مطالعه نشان داد که روش PCR نسبت به روشهای سنتی در شناسایی باکتری سالمونلا در شیر خام از توانایی بیشتری برخوردار است.

**واژگان کلیدی:** سالمونلا، شیر خام، کشت استاندارد، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز.

تاریخ دریافت: ۹۳/۹/۷ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۲/۱

## مقدمه

یکی از مشکلات مهم در جوامع بشری، آلودگی مواد غذایی می‌باشد که این مشکلات با افزایش جمعیت جهان بسیار گسترده‌تر می‌گردد(۱۷). مسأله مهم دیگر در تولیدات مواد غذایی، رشد متناسب تولید با عرضه و تقاضا می‌باشد که این عرضه و تقاضا باید هم بهداشتی و هم دارای کیفیت بالایی باشد. آلودگی مواد غذایی دلایل متعددی د که می‌تواند ناشی از سودجویی‌ها، عدم رعایت بهداشت، سهل انگاری و کمبود اطلاعـات بهداشتی و تغذیه‌ای باشد. یکی از علل آلودگی مـواد غذایی وجود باکتری‌ها و یا سم حاصل از آنها در مواد اولیه تولیدات غذایی و یا تولیدات غذایی می‌باشد که باعث آلودگی و غیرقابل مصرف شدن غذا می‌گردد. وجود باکتری‌های بیماریزای واقعی نظیر سالمونلا، یرسینیا، ویبریو و غیره می‌تواند اثرات بسیار مخربی بر روی سلامت و اقتصاد کشورها داشته باشد که با بررسی‌های مداوم و جستجوی متداوم می‌توان تا حد زیادی از این خطرها جلوگیری نمود. مصرف شیر خام در صورت آلودگی می‌تواند مشکلات بسیار فراوانی را بوجود بیاورد، لذا در این تحقیق سعی بر این شده است که آلودگی شیر خام به باکتری سالمونلا (Salmonella) با روش کشت استاندارد و هم با استفاده از روش PCR مورد بررسی قرار گیرد. سالمونلا یک باکتری میله‌ای شکل گرم منفی است که در خانواده انتروباکتریاسه (Entrobacteriacea) طبقه‌بندی می‌شود (۱۷و۱). زیرشاخه‌های سالمونلا به عنوان یکی از عوامل بیماریزای ناشی از مواد غذایی در سراسر جهان در نظر گرفته شده است. منابع غذایی حاصل از حیوانات مانند گوشت گاو، گوشت مرغ، تخم مرغ و شیر به عنوان حامل این باکتری به اثبات رسیده‌اند(۹). حضور باکتری‌های مشترک بین انسان و دام مانند گونه‌های سالمونلا در گاوداری‌ها و مدفوع گاو به خوبی اثبات شده است(۱۰). گاوهای شیری از مخازن طبیعی برای سالمونلا به حساب می‌آیند که این مسأله می‌تواند ایجاد کننده بیماری در انسان باشد(۵). علاوه بر این مسأله، فراوانی بسیاری از گونه‌های باکتریایی منجر به آلودگی محیط زیست می‌شود که محیط اطراف مزارع نیز از این امر مستثنی نمی‌باشند. گاوهـا

*۱- دانشیار، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، پژوهشکده بیماری‌های مشـترک انسـان و دام، دانشـکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران. boniadian@vet.sku.ac.ir

۲- استاد گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

۳- دانش‌آموخته دوره کارشناسی ارشد بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

می‌توانند از طریق آلودگی جایگاه و بستر خود، در معرض آلودگی قرار گیرند (آب، خوراک، تماس با محیط اطراف)(۱۹). با وجود تلاش‌های قابل توجهی که برای بهداشت سیستم‌های شیردوشی اتخاذ شده است، آلودگی مدفوعی شیر اجتناب ناپذیر می‌باشد .به همین دلیل، اکثر مصرف کنندگان در معرض قرار گرفتن آلودگی ناشی از مصرف شیر می‌باشند(۱۹). در حال حاضر مصرف شیر خام و فراورده‌های آن هنوز هم مورد استفاده بخش بزرگی از جوامع انسانی اعم از خانواده‌های شهری، روستایی و کارگران مزارع دامپروری می‌باشد. دلیل آن هم این است که بخش زیادی از عموم مردم بر این باور اشتباه می‌باشند که شیر یا فراورده‌های خام آن نه تنها ایمن است بلکه اثرات سودمندی بر سلامتی مردم دارد که توسط پاستوریزاسیون نابود می‌شود. بنابراین مصرف شیر خام و فرآورده‌های آن بارها با بیماری‌های منتقله از راه غذا به ویژه سالمونلا مرتبط شده است(۱۹). سالمونلوز (Salmonellosis) مسئول تعداد زیادی از عفونت‌ها در انسان و حیوانات می‌باشد (۱۹و۸). سالمونلوز بطور معمول در سال در حدود ۲ تا ٤ میلیون نفر را در ایالات متحده درگیر می‌کند(۱۷و۸). محققین بر این باورند که این بیماری دومین بیماری مشترک بین انسان و حیوان می‌باشد که از طریق غذا منتقل می‌شود(۱۸). طبق بررسی‌های انجام شده، در ایالات متحده آمریکا، سالانه در حدود ۱ تا ۱۲/۲ میلیون دلار برای درمان بیماران مبتلا به سالمونلوزیس هزینه می‌شود(۱۷). شیر خام و فراورده‌های حاصل از شیر خام از دلایل ابتلا به سالمونلوزیس در بسیاری از کشورها به خصوص کشورهای در حال توسعه می‌باشد(٦). در مطالعه‌ای که سازمان بهداشت جهانی در سال ۲۰۰۰ در آلمان انجام داده است مشخص شد که ۸۵/۵٪ از علل شیوع مسمومیت‌های غذایی در سال‌های ۱۹۹۳ تا ۱۹۹۸ در این کشور سالمونلا می‌باشد. شیوع سالمونلوزیس در محل پرورش حیوانات باعث از دست رفتن تولیدات دامی، مرگ و میر و ضررهای اقتصادی می‌باشد. این مسأله نشان دهنده اهمیت بررسی موضوع در کشور درحال توسعه ما، ایران که صنعت دامپروری در آن گسترده است، می‌باشد. یکی از روش‌هایی که برای تشخیص وجود باکتری‌ها در مواد غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرد، روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (Polymerase chain reaction) می‌باشد. برای پی بردن به وجود باکتری سالمونلا در شیر خام از ژنهای موجود و مطرح باکتری استفاده می‌شود. بر این اساس با توجه به اینکه تاکنون مطالعه جامعی در برخی از مناطق کشور بر روی میزان آلودگی شیرهای خام تولید شده، به باکتری سالمونلا انجام نشده است، لذا مطالعه حاضر طرحی است تا با روش PCR و روش کشت استاندارد میزان آلودگی شیرهای خام به باکتری سالمونلا مورد بررسی قرار گیرد.

## مواد و روش کار

نمونه‌گیری از مخازن حمل کننده شیر خام به دو شرکت تولید شیر پاستوریزه شماره ۱ و شماره ۲ در طی مدت زمان یک ماه و نیم از اواخر اردیبهشت تا اواسط تیر ماه و در سال ۱۳۹۳ انجام شد. تعداد نمونه‌ها یکصد و پنجاه عدد شد که در ساعات اولیه روز اخذ شدند. مقدار نمونه اخذ شده از هر مخزن شیر در حدود ۳۰ میلی لیتر و با استفاده از ظرف نمونه برداری بود که در ظروف استریل جمع آوری شد. نمونه‌های مورد نظر در کنار ژل یخ و در دمایی در حدود ٤ تا ٦°C و در ظروف مخصوص (کول باکس) (Coolbox) به آزمایشگاه منتقل شد(۱۵).

پس از انتقال نمونه‌ها در شرایط دمایی مناسب به آزمایشگاه، ابتدا از مایع پیش غنی کننده استفاده شد. محیط غنی کننده غیر انتخابی مورد استفاده، آب پپتونه بافری (مرک آلمان با شماره کاتالوگ ۱/۰۷۲۲۸/۰۵۰۰) بود. ابتدا نمونه شیر مورد نظر با شیکر مخلوط شد و پس از یکدست شدن ۲۵ میلی لیتر از نمونه مورد نظر با ۲۲۵ میلی لیتر مایع پیش غنی کننده آب پپتونه بافری مخلوط شد و به مدت ٢٤ ساعت در گرمخانه با دمای ۳۷°C نگهداری شد. مرحله بعدی، مرحله

غنی سازی انتخابی بود. در این مرحله از ۳ محیط آبگوشت تتراتیونات، آبگوشت سلنیت سیستین و محیط راپاپورت واسیلیادیس (Rappaport Vasiliadis) (مرک آلمان) استفاده شد.۱ میلی‌لیتر از نمونه شیر پیش غنی شده به محیط‌های آبگوشت تتراتیونات، راپاپورت واسیلیادیس اضافه شد و در گرمخانه ۴۳°C به مدت ۱۸ تا ۲٤ ساعت نگهداری شد. ۱ میلی‌لیتر از محلول پیش غنی شده با ۹ میلی‌لیتر سلنیت سیستین مخلوط شد و به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷°C در گرمخانه نگهداری شد. مرحله بعد مرحله انتقال به محیط کشت انتخابی است که از محیط‌هایی شامل سالمونلا شیگلا آگار (مرک آلمان با شماره کاتالوگ ۱/۰۷٦٦۷/۰۵۰۰) ، زایلوز لیزین دأکسی کلات آگار (مرک آلمان با شماره کاتالوگ ۱/۰۵۲۸۷/۰۵۰۰) استفاده شد. برای کشت و شناسایی باکتری، یک حلقه از کشت بدست آمده از لوله‌های حاوی سلنیت سیستین، راپاپورت واسیلیادیس و تتراتیونات بطور جداگانه و از کنار بر روی سطح پلیت‌های حاوی محیط سالمونلا شیگلا آگار و XLD آگار (Xylose lysine deoxycholate agar) کشت داده شد. از یک حلقه بر روی دو پلیت استفاده شد. پلیت ها در دمای ۳۷°C به مدت ۲۰ تا ۲٤ ساعت گرمخانه گذاری شد. در محیط سالمونلا شیگلا آگار کلنی‌های سیاه رنگ برای مرحله افتراقی انتخاب شد. در محیط XLD نیز کلنی‌های سیاه رنگ برای مرحله افتراقی انتخاب شد. در مرحله افتراقی از محیط‌هایی همچون سه قندی آهن دار، اوره آگار، لیزین دکربوکسیله شونده و سیمون سیترات استفاده شد. باکتری مشکوک به وسیله آنس نوک تیز هم در عمق و هم در سطح لوله کشت داده شد و به مدت ۲٤ ساعت در گرمخانه با دمای ۳۷°C نگهداری شد. در ادامه از باکتری‌های مشکوک برای جستجوی آنتی‌ژن‌های O، Vi، H (بهار افشان، ایران)، سالمونلا به وسیله آگلوتیناسیون روی لام با استفاده از سرم مناسب بر روی کلنی‌های خاص انجام شد. پس از طی مراحل فوق، از روش جداسازی و شناسایی با استفاده از روش PCR، استفاده گردید.

انجام آزمون PCR: در ادامه از روش PCR برای شناسایی کلنی‌های مشکوک استفاده شد. برای این منظور ابتدا کلنی-های مشکوک از محیط سه قندی انتخاب و در محیط کشت لوریا برتانی آگار (Luria Bertani Agar) کشت داده شد. پس از کشت باکتری برای استخراج DNA، از روش Boiling یا جوشاندن استفاده شد(۲۰). در این روش ابتدا ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر را با مقداری از کلنی رشد کرده در آگار، در میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری مخلوط کرده بطوری که کدورتی معادل کدورت استاندارد نیم مک فارلند (McFarland turbidity standard) ایجاد شد. پس از این مرحله میکروتیوب به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه و در دمای ۱۰۰°C قرار گرفت. پس از آن به مدت ۵ دقیقه با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد و مایع بالایی آن برداشته شد و در فریزر ۲۰- نگهداری شد. پس از استخراج DNA، مرحله شناسایی توسط PCR انجام شد. در این مرحله به موادی مانند بافر TBE، آگارز، کیت PCR، آب دیونایز و پرایمر invA نیاز بود. (جدول ۱)

جدول۱ـ پرایمر invA مورد استفاده برای شناسایی باکتری سالمونلا

| ژن هدف | توالی اولیگونوکلئوتید (5'-3') | قطعه ژن (bp) | جفت باز | دمای اتصال ژن |
|---|---|---|---|---|
| invA | 5'-GTGAAATTATCGCCACGTTCGGGCAA -3'<br>5'-TCATCGCACCGTCAAAGGAACC -3' | ۲۸٤ | | ٦٤°C |

برای انجام آزمایش PCR از کیت مستر میکس ( Cinagen PCR Master Kit,PR8250C) استفاده شد. در این روش ۱۲/۵ میکـرولیتـر از مستـر میکس را بـا ۲ میکرولیتر پرایمر (۱ میکرولیتر پرایمر فوروارد و ۱ میکرولیتر پرایمر ریورس) و ۳ میکرولیتر DNA استخراج شده و ۷/۵ میکرولیتر آب دیونایز استریل مخلوط کرده (مجموع آن ۲۵ میکرولیتر گردید) و در دستگاه ترموسایکلر (Biorad, USA) قرار داده شد. وضعیت سیکل ایجاد شده بدین صورت بود که ابتدا واسرشته سازی اولیه در ۹٤°C به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد، سپس ۳۵ بار سیکل به ترتیب واسرشته سازی در ۹٤°C به مدت ٦۰ ثانیه، چسباندن در ٦٤°C به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله بسط در ۷۲°C به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله بسط نهایی در ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد (١٤). پس از آماده‌سازی محصول، ۵ میکرولیتر از محصول با ۱ میکرولیتر بافر بار گذاری مخلوط شد و درون چاهک‌های ژل آگارز ۱/۲٪ وارد گردید و با ولتاژ ۱۰۰، به مدت ۲۵ تا ۳۰ دقیقه جریان الکتروفورز برقرار گردید. پس از این مرحله ژل توسط ژل رد رنگ‌آمیزی گردید و توسط دستگاه ژل داک عکسبرداری شد.

روش استخراج DNA از شیرخام:

در این روش ابتدا ۱۰ میلی‌لیتر شیر خام با ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد و مایع رویی آن که چربی بود دور ریخته شد و از رسوب آن ۵۰۰ میکرولیتر برداشت کرده و به یک میکروتیوپ استریل انتقال یافت. استخراج دأکسی نوکلئیک اسید با استفاده از کیت (DNA extraction kit, MBST,Iran) انجام گرفت.

دأکسی نوکلئیک اسید استخراج شده از هر نمونه به حجم تقریبی ۱۰۰ میکرولیتر بود. روش PCR مطابق روش قبل انجام شد (۲۰).

## نتایج

نتایج کشت استاندارد از شیر خام

پس از بررسی کشت میکروبی، تعداد نمونه ٦ جدایه با توجه به آزمایش‌های ذیل مشکوک به سالمونلا تشخیص داده شد. (جدول ۲)

جدول ۲ـ نتایج آزمون‌های تفریقی بر روی جدایه‌های مشکوک به سالمونلا

| محیط آهن سه قندی | محیط اوره آگار | محیط سیمون سیترات | آگار لیزین آهن دار |
|---|---|---|---|
| قلیایی/ اسیدی | منفی | مثبت | مثبت |
| گاز/ سولفید هیدروژن | | | |

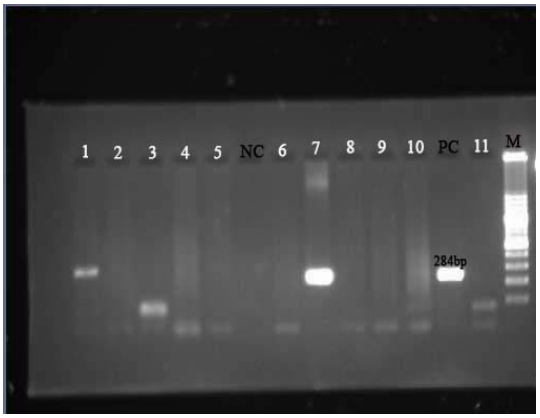
همچنـین در نتـایج سـروتایپینگ، آگلوتیناسـیون توسـط سوسپانسیون تهیه شده از باکتری‌های مشکوک بدست نیامد. جهت تأیید نتایج کشت و بیوشیمیایی و وجود یا عدم وجود سالمونلا در نمونه‌های کشت داده شده از شیر خام، آزمون PCR با یک جفت آغاز گرشامل (invA (۲۸٤ bp انجام گردید. هر ٦ نمونه مشکوک در آزمایش PCR نتوانستند باندی به اندازه مورد انتظار تولید نمایند.

نتایج آزمایشات PCR از شیر خام

در بررسی مستقیم از نمونه‌های شیر خام به روش PCR، از ۱۵۰ نمونه اخذ شده از مخازن حمل شیر خام ۳ نمونه مثبت شد. در این روش بر اساس استخراج مستقیم DNA از شیر خام به بررسی وجود یا عدم وجود باکتری سالمونلا در شیر خام پرداخته شد. در نگاره ۱ نتیجه مثبت با استفاده از روش PCR مشخص شد. در مجموع تعداد ۳ نمونه مثبت گردید که نشان دهنده ۲٪ آلودگی در ۱۵۰ نمونه اخذ شده می‌باشد. (جدول ۳)

جدول ۳: نتایج آزمون‌های کشت و PCR برای شناسایی باکتری سالمونلا در شیر خام.

| روش آزمون | تعداد نمونه | مشکوک به سالمونلا | سالمونلا |
|---|---|---|---|
| کشت | ۱۵۰ | ٦ | ۰ |
| PCR | ۱۵۰ | – | ۳ (٪۲) |




نگاره ۱: شناسایی باکتری سالمونلا در بررسی مستقیم از نمونه‌های شیر خام حمل شده توسط تانک حمل شیر به روش PCR. شماره ۱ و ۷ نمونه‌های مثبت شده، PC: شاهد مثبت ( *سالمونلا تیفی موریوم*). NC: شاهد منفی ( *اشریشیا کلی* ). M: مارکر bp ۱۰۰.

## بحث

میکروب‌هایی مانند استافیلوکوک‌ها، کلی‌فرم‌ها و باکتری‌های اسپوردار و سایر باکتری‌های گرم منفی از سطح خارجی پستان و نوک آن و از وسایل و محیط و بستر و آب می‌توانند وارد شیر خام شوند(۱۳). همچنین ورود مدفوع در شیر نیز می‌تواند از علل مهم آلودگی شیر به باکتری سالمونلا باشد. در نمونه‌های اخذ شده از مخازن حمل شیر توسط انجمن ملی کنترل سلامت حیوانات ایالات متحده بررسی‌هایی روی شیرهای خام هم بصورت کلی و هم بررسی وجود یا عدم وجود سالمونلا انجام گردیده است(٤) همچنین Van Kessel و همکاران در سال ۲۰۰٤ نیز به همین موضوع پرداخته‌اند که نتایج آن در بررسی‌های شمارش کلی نشان دهنده وجود باکتری‌های مختلف بود. در جدا سازی سالمونلا به وسیله تکنیک کشت در نتایج اولیه نشان داده شد که ۲/٦٪ آلودگی به سالمونلا داشتند(۱۸). در این مطالعات ۲۰ نمونه از ۸٦۱ نمونه شیر کشت داده شده دارای آلودگی به سالمونلا بودند پس از غنی سازی زنده بودند و روی محیط کشت رشد نمودند. اما از کشت مستقیم باکتری روی محیط‌های انتخابی و اختصاصی مثل محیط $XLT_4$ (Xylose Lysine Tergitol-4) تنها ۲ نمونه مثبت شد که این امر نشان دهنده اهمیت بالای استفاده از مراحل پیش غنی‌سازی و غنی سازی است. در این تحقیق با استفاده از روش PCR مستقیم از شیر خام، مشخص گردید که ۳/۳٪ از نمونه‌های شیر دارای باکتری سالمونلا می‌باشند که تفاوت تشخیص با روش کشت و روش PCR با این تحقیق مطابقت دارد. شیر خام اولیه، شمارش کلی بالایی دارد، در کشور ما رساندن شیر به ایستگاه های جمع آوری چندین ساعت طول می‌کشد و در ایستگاه جمع آوری نیز اعمال توزین، نمونه برداری و تحویل طولانی می‌باشد و ساعت‌ها به طول می‌انجامد که دمای شیر به کمتر از $10^{o}C$ برسد و در همین دما هم ساعت‌های زیادی نگهداری می‌شود تا بعداً با مخازن حمل به نقاط دوردست حمل شود و در این مدت است که بار میکروبی شیر بالا می‌رود بخصوص باکتری‌های سرمادوست مثل پزودوموناس‌ها، کلی فرم‌ها و لاکتوباسیل‌ها. در این حالت عمل خنک کردن شیر هم کارایی خود را از دست می‌دهد. بررسی‌های Sanjuan و همکاران در سال ۲۰۰۳ نشان داد که در دمای $٦^{o}C$، سودوموناس‌ها، کلی فرم‌ها و لاکتوباسیل‌ها رشد معنی‌داری دارند(۱۵). این تحقیقات نشان می‌دهد که مخازن حمل شیر می‌تواند شامل بسیاری دیگر از میکروارگانیسم‌ها باشد که در محیط‌های غنی کننده با سالمونلا رقابت می‌کنند، که این امر باعث محدود بودن رشد سالمونلا ها در محیط کشت می‌گردد. Van Kessel و همکاران در سال ۲۰۰٤ نشان دادند که در بسیاری از نمونه‌های اخذ شده از مخازن حمل شیر، تعداد باکتری سالمونلا بسیار کم بوده و از طریق کشت باکتری سالمونلا بسیار کم جدا گردیده است. در بررسی مطالعات گذشته مشخص گردید که میزان گسترده‌ای از شیوع سالمونلا

در مخازن حمل شیر تخمین زده می‌شده است ولی در سال ۱۹۹۷ در اونتاریو کانادا تنها ۰/۱۷٪ از نمونه‌های مخازن حمل شیر آلوده به سالمونلا بودند(۱٦). Murinda و همکاران در سال ۲۰۰۲ در ایالت تنسی آمریکا در بین ماه‌های سپتامبر تا دسامبر از مخازن حمل شیر ۳۰ مزرعه نمونه‌گیری انجام دادند که با استفاده از روش PCR، ۲/۲٤٪ از آنها آلوده به باکتری سالمونلا تشخیص داده شد(۱۰). Jayarao و همکاران در سال ۲۰۰۱ ، از ۱۳۱ مزرعه در شرق و جنوب ایالت داکوتا و غرب ایالت مینه سوتا در ایالات متحده، نمونه گیری انجام دادند که ٦/۱٪ از آنها آلوده به باکتری سالمونلا بودند(۷). این تحقیق بیانگر این موضوع می‌باشد که نمونه گیری مستقیم از مزارع، احتمال جداسازی سالمونلا را نسبت به مخازن حمل شیر افزایش می‌دهد. Giacometti و همکاران در سال ۲۰۱۱ روی شیر تولید شده در ۳۳ مزرعه مطالعه و بررسی نمودند که از ۲۱۱ مخزن حمل شیر نمونه گیری نمودند و هم با روش کشت و هم با استفاده از روش PCR آنها را مورد مطالعه قرار دادند. در این تحقیق با استفاده از روش کشت، نمونه‌ای یافت نگردید ولی با استفاده از روش PCR تنها یک نمونه مثبت گردید که در کل ۱/۰۱٪ از نمونه ها آلوده به باکتری سالمونلا بودند(٦). Oliver و همکاران در سال ۲۰۰۵ روی پاتوژن‌های غذازاد در شیر مطالعه نمودند و نتایج مطالعات آنها بیانگر این موضوع بود که میزان شیوع باکتری سالمونلا در شیر خام، بخش کوچکی از بیماریهای ناشی از آلودگی مواد غذایی را شامل می‌شود(۱۱). هرچند آلودگی شیر خام و محصولات آن دارای درصد کوچکی از آلودگی‌های باکتری‌های بیماریزای غذا می‌باشد ولی این آلودگی‌ها می‌توانند خطرات بالقوه‌ای را برای مصرف کنندگان محصولات خام ایجاد نمایند. درک و استنباط عموم از کیفیت غذا در بازاریابی محصولات غذایی بسیار بحرانی می‌باشد، بنابراین استفاده از روش‌های پاستوریزاسیون یک روش مؤثر برای کنترل باکتری‌های پاتوژن می‌باشد. اگرچه پاستوریزاسیون مناسب می‌تواند این خطرات را کاهش دهد ولی بخشی از عموم مردم شیر یا محصولات غیر پاستوریزه را مصرف می‌کنند که این امر ناشی از فرهنگ عمومی و یا عادت فردی است که از دلایل عمده آن تفکر اشتباه مبنی بر مفید بودن محصولات خام لبنی برای سلامتی می‌باشد. اگرچه میزان باکتری سالمونلا در نمونه‌های شیر آزمایش شده بسیار پایین است ولی عفونت ایجاد شده توسط این باکتری می‌تواند بسیار خطرناک باشد. ارگانیسم در شرایط نگهداری نامناسب شیر خام و محصولات حاصل از آن، دارای پتانسیل بالای رشد می‌باشد و خطر بسیاری برای سلامت عمومی جامعه دارد. Cerva و همکاران در سال ۲۰۱٤ در جنوب برزیل به بررسی DNA باکتری‌های بیماریزای موجود در شیر خام با استفاده از روش PCR پرداختند که تعداد این نمونه‌ها ٥٤۸ نمونه از ۱۲٥ مزرعه بودند. در این تحقیق ۲۰٪ از نمونه‌ها دارای DNA باکتری سالمونلا بودند(۲). دلیل بالا بودن نمونه‌های مثبت می‌تواند به دلیل عدم رعایت بهداشت فردی در منطقه، گرم و استوایی بودن منطقه و فصل نمونه گیری باشد. Pangloli و همکاران در سال ۲۰۰۸ در ایالت تنسی کشور آمریکا به بررسی میزان شیوع سالمونلا در شیر خام حمل شده در مخازن حمل در فصول مختلف پرداختند. آنها به این نتیجه رسیدند که میزان شیوع سالمونلا در مخازن حمل شیر، در فصل تابستان به بالاترین میزان خود رسیده و در فصل زمستان کمترین میزان شیوع را دارا می‌باشد(۱۲). از این تحقیق می‌توان اینگونه استنباط نمود که عامل فصل یک عامل بسیار مهم در میزان شیوع باکتری می‌باشد. D'Amico و همکاران در سال ۲۰۰۸ با بررسی بر میزان شیوع باکتری‌های غذازاد شیر خام استفاده شده در تهیه پنیر استاندارد، باکتری سالمونلا، با استفاده از روش کشت از ۱۳۳ نمونه شیر خام، یافت نشد(۳). نتایج این مقاله با نتایج بدست آمده این تحقیق از نظر بررسی کشت مطابقت دارد. وجود باکتری‌های دیگر به غیر از سالمونلا می‌تواند دلایل متعددی داشته باشد که باعث بیماری‌های متعددی در انسان و حیوانات می‌شوند. وجود آلودگی‌های مختلف در بستر و محیط

نگهداری حیوانات شیری می‌تواند باعث ورم پستان‌های گوناگون گردد. با توجه به نتایج بدست آمده از این مطالعه، می‌توان این‌گونه نتیجه‌گیری نمود که احتمال شناسایی باکتری سالمونلا با روش PCR، به دلیل حساسیت بالای آزمایش، نسبت به روش کشت استاندارد، بیشتر می‌باشد. همچنین دستیابی به نتایج، در زمان بسیار کوتاه از مزایای استفاده از روش PCR می‌باشد. هرچند احتمال جداسازی باکتری مرده در این روش زیاد است ولی می‌توان این‌گونه نتیجه‌گیری نمود که این روش حضور یا عدم حضور باکتری در شیر را بیان می‌نماید.

## فهرست منابع


۱. زهرایی صالحی، ت.(۱۳۷۳): سالمونلا، چاپ اول، تهران، انتشارات دانشگاه تهران، تهران، ایران، ۳۸-۲٤.

2. Cerva, C., Bremm, C., dos Reis, E. M. (2014): Food safety in raw milk production: risk factors associated to bacterial DNA contamination. Trop. Am. H. Prod.46 (5): 877-882.
3. D'Amico, D. J., Groves, E., Donnelly, C. W. (2008): Low incidence of foodborne pathogens of concern in raw milk utilized for farmstead cheese production. J. F. Prot. 71 (8): 1580-1589.
4. Draughon, F., Davidson, P., Oliver, S. (1992): Prevalence of Listeria monocytogenes, Campylobacter jejuni, Yersinia enterocolitica, and Salmonella in bulk tank milk: risk factors and risk of human exposure. J. F. Prot. 55 (2): 93-97.
5. El-Gazzar, F. E., Marth, E. H. (1992): Salmonellae, salmonellosis, and dairy foods: a review. J. D. Sci. 75 (9): 2327-2343.
6. Giacometti, F., Serraino, A., Finazzi, G. (2012): Sale of raw milk in Northern Italy: Food safety implications and comparison of different analytical methodologies for detection of foodborne pathogens. F. Path. Dis. 9 (4): 293-297.
7. Jayarao, B., Henning, D. (2001): Prevalence of foodborne pathogens in bulk tank milk. J. D. sci. 84 (10): 2157-2162.
8. Karns, J., Van Kessel, J., McCluskey, B. (2005): Prevalence of Salmonella enterica in Bulk Tank Milk from US Dairies as Determined by Polymerase Chain Reaction. J. D. Sci. 88 (10): 3475-3479.
9. Mazurek, J., Salehi, E., Propes, D. (2004): A multistate outbreak of Salmonella enterica serotype typhimurium infection linked to raw milk consumption—Ohio, J. F. Prot. 67 (10): 2165-2170.
10. Murinda, S., Nguyen, L., Ivey, S. (2002): Molecular characterization of Salmonella spp. isolated from bulk tank milk and cull dairy cow fecal samples. J. F. Prot. 65 (7): 1100-1105.
11. Oliver, S. P., Jayarao, B. M., Almeida, R. A. (2005): Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: food safety and public health implications. F. Path. Dis. 2 (2): 115-129.
12. Pangloli, P., Dje, Y., Ahmed, O. (2008): Seasonal incidence and molecular characterization of Salmonella from dairy cows, calves, and farm environment. F. path. Dis. 5 (1): 87-96.
13. Perkins, N., Kelton, D., Hand, K. (2009): An analysis of the relationship between bulk tank milk quality and wash water quality on dairy farms in Ontario, Canada. J. D. Sci. 92 (8): 3714-3722.
14. Rahn, K., De Grandis, S., Clarke, R. (1992): Amplification of an invA gene sequence of Salmonella typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of Salmonella. Mol. Cell. Pro. 6 (4): 271-279.
15. Sanjuan, S., Rúa, J., García□Armesto, M. R. (2003): Microbial flora of technological interest in raw ovine milk during 6 C storage. Int. J. D. Tec. 56 (3): 143-148.
16. Steele, M. L., McNab, W. B., Poppe, C. (1997): Survey of Ontario bulk tank raw milk for food-borne pathogens. J. F. Prot. 60 (11): 1341-1346.
17. Van Kessel, J., Karns, J., Perdue, M. (2003): Using a portable real-time PCR assay to detect Salmonella in raw milk. J. F. Prot. 66 (10): 1762-1767.

18. Van Kessel, J., Karns, J., Gorski, L. (2004): Prevalence of Salmonellae, Listeria monocytogenes, and Fecal Coliforms in Bulk Tank Milk on US Dairies. J. D. Sci. 87 (9): 2822-2830.
19. Van Kessel, J. A. S., Karns, J. S., Lombard, J. E. (2011): Prevalence of Salmonella enterica, Listeria monocytogenes, and Escherichia coli virulence factors in bulk tank milk and in-line filters from US dairies. J. F. Prot. 74 (5): 759-768.
20. Zahraei Salehi, T., Tadjbakhsh, H., Atashparvar, N. (2007): Detection and identification of Salmonella Typhimurium in bovine diarrhoeic fecal samples by immunomagnetic separation and multiplex PCR assay. Zoonos. Pub. H. 54 (6): 231-236.