بسم الله الرحمن الرحيم

شماره ثبت ۳۳۵

دانشگاه فردوسی مشهد دانشکده دامپزشکی

پایان نامه جهت اخذ درجه دکترای عمومی

دامپزشکی(DVM)

بررسی مقدماتی میزان آلودگی لاشه های طیور به باکتری سالمونلا انتریتیدیس در یکی از کشتارگاههای صنعتی طیور مشهد

به کوشش:

احمد برات پور

استاد راهنما:

دکتر عبدا... جمشیدی

استاد مشاور:

دکتر سعید خانزادی

آذرماه ۱۳۸۹

اظهارنامه

اینجانب احمد برات پور دانشجوی دوره دکتری رشته دامپزشکی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد نویسنده پایان نامه بررسی مقدماتی میزان آلودگی لاشه های طیور به باکتری سالمونلا انتریتیدیس در یکی از کشتارگاه های صنعتی مشهد تحت راهنمایی جناب آقای دکتر جمشیدی متعهد می شوم:

- تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است.
- در استفاده از نتایج پژوهشهای محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است.
- مطالب مندرج در پایان نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است.
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه فردوسی مشهد می باشد و مقالات مستخرج با نام« دانشگاه فردوسی مشهد»و یا «Ferdowsi University of Mashhad » به چاپ خواهد رسید.
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تأثیرگذار بوده اند در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت شده است.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که از موجود زنده(یا بافتهای آنها) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است، اصل رازداری، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است.

تاریخ **امضای دانشجو**

مالکیت نتایج و حق نشر

- کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن(مقالات مستخرج، کتاب، برنامه های رایانه ای، نرم افزارها و تجهیزات ساخته شده) متعلق به دانشگاه فردوسی مشهد می باشد .این مطلب باید به نحو مقتضی درتولیدات علمی مربوطه ذکر شود.
- استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی باشد.

به نام خدا

بررسی مقدماتی میزان آلودگی لاشه های طیور به باکتری سالمونلا انتریتیدیس در یکی از کشتارگاههای صنعتی طیور مشهد

به کوشش

احمد برات پور

پایان نامه

ارائه شده به تحصیلات تکمیلی دانشگاه فردوسی مشهد به عنوان بخشی از

فعالیت های تحصیلی لازم برای اخذ درجه دکترای حرفه ای

در رشته

دکترای حرفه ی دامپزشکی

از دانشگاه فردوسی مشهد

جمهوری اسلامی ایران

ارزیابی کمیته پایان نامه: این پایان نامه در مورخ ۸۹/۹/۲۳ با درجه ممتاز(۱۹/۴۵ نوزده و چهل و پنج صدم) به تصویب هیات محترم داوران رسید.

استاد راهنما: جناب آقای دکتر جمشیدی دانشیار بخش بهداشت و مواد غذایی

استاد مشاور: جناب آقای دکتر خانزادی استادیار بخش بهداشت و مواد غذایی

استاد داور: جتاب آقای دکتر محسن زاده دانشیار بخش بهداشت و مواد غذایی

استاد داور: سرکار خانم دکتر راد استادیار بخش میکروبیولوژی

پروردگارا

سپاست می گویم که بر من منت نهادی و خلعت تحصیل

پوشاندی

مرا بر نعمات بی کرانت توان شکر نیست

الهی مدد کن که دانش اندکم، نه نردبانی باشد

برای فزونی تکبر و غرور، نه حلقه ای برای اسارت

از درگاه لطفت خواستارم که

بر اندیشه ام پاکی

بر بازوانم توان

درقلبم ایمان

و بر راهم استواری بخشی

خدای را سپاس که مرا توفیقی جهت کسب تحصیل و

معرفت در جوار

هشتمین کوثر باغ معرفت

حضرت علی ابن موسی الرضا(ع)

را عطا نمود و مرا به درک چنین لحظه پر افتخاری

رساند.

تقدیم به بارگاه ملکوتی

علی ابن موسی الرضا(ع)

تکیه گاه امیدم در اوج ناامیدی

وهزاران بار تقدیم به **پدر و مادرم**

دو فرشته مهربان زندگیم

پدرم

از تو گفتن دشوار است ،چرا که در کلام نمی گنجی و عظمتت را واژه ها توان گفتن ندارند، اما سکوت نیز کاری است دشوار، وقتی سخن از عشق می آید تو بهترین مثال و نمونه ایی، زمانی که از استواری و پایمردی سخن می گویند تو بهترین الگویی، هرگاه به ایثار و حماسه آفرینی می اندیشم تو را در قله بلند آن می یابم ،چگونه از تو نگویم و اندیشه ام را با خاطراتت زینت ندهم،تقدیم به تو که بهترینی

مادرم

این صفحات را پیشکش کدامین محبت تو کنم

که اینها نه نشان پایان تحصیل من بلکه گواه زحمات بی دریغ توست

تنها تویی که ژرفای نام مقدس مادر را برایم نمایان ساختی

بر دستان پر مهرت بوسه میزنم

تقدیم به عزیزترین عزیز زندگی ام مادر

آنکه قلب مهربانش پناه من است

او که زیبایی شعر را از چشمانش آموختم و وجودش برایم سرشار از عشق

و آرامش است .

به لطف سالها زحمت و لطف بی پایانش

وتقدیم به **برادران** و **خواهران** مهربانم و **خانواده** عزیزشان

به خاطر محبت و صفای وجودشان

آنان که حضورشان ترنم خوش شادی

و محبتشان همواره مایه ی دلگرمی من است

آنان که وجودشان شادی بخش دلم و سعادتمندیشان نهایت

آرزوی من است

با سپاس فراوان از استاد بزرگوارم

جناب آقای **دکتر عبد ا... جمشیدی** که در تمام مراحل انجام این تحقیق مرا یاری نمودند و در زمینه اخلاق الگویم بودند.

با تشکر از استاد مشاورم جناب آقای **دکتر سعید خانزادی** که همواره پاسخگوی سوالات علمی ام بودند.

با تشکر از اساتید محترم داور جناب آقای **دکتر محمد محسن زاده** و سرکار خانم **دکتر مهرناز راد** که داوری این پایان نامه را پذیرفتند.

سپاس فراوان از تمامی اساتید ارجمند و بزرگوارم که در طول این شش سال از تجارب علمی ایشان بهره مند شدم.

در پایان از تمامی کارکنان بخش های مختلف دانشکده به خصوص آموزش، بخش رایانه، کتابخانه، آزمایشگاهها، کلینیک و تایپ و تکثیر کمال تشکر و سپاس را دارم.

و از خداوند متعال توفیق روز افزونشان را خواستارم

شاخه گلی تقدیم به تمامی دوستانم در ورودی ۸۳

که سالهای زیبایی از زندگی ام را در کنارشان هم چون

رویایی زیبا گذراندم و آرزومند سلامتی و سعادتمندی آنها

در تمامی مراحل زندگی شان هستم

چکیده

بررسی مقدماتی میزان آلودگی لاشه های طیور به باکتری سالمونلا انتریتیدیس در یکی از کشتارگاههای صنعتی طیور مشهد

به کوشش:

احمد برات پور

گوشت طیور یکی از مهمترین عوامل انتقال عفونت سالمونلایی در انسان می باشد. کشت و جداسازی سالمونلا از نمونه ماده غذایی از طریق کشت باکتریولوزیک و سنتی مستلزم صرف ۴-۶ روز می باشد. روش PCR به علت دقت و سرعت بالای آن یک روش جایگزین مناسب برای تشخیص های میکروبیولوژیکی شناخته شده است. در این مطالعه مقدماتی میزان آلودگی لاشه طیور گوشتی به باکتری جنس سالمونلا و گونه انتریتیدیس مورد ارزیابی قرار گرفت. تعداد ۱۰۰ نمونه بصورت تست شستشو از لاشه طیور، قبل از مرحله بسته بندی در یکی از کشتارگاههای صنعتی طیوردراطراف شهرستان مشهد برداشت گردید. نمونه گیری بصورت خوشه ای انجام گردید. در آزمایشگاه ابتدا مراحل پیش غنی سازی و غنی سازی صورت گرفت، سپس مرحله استخراج DNA انجام گردید. جهت انجام تست M-PCR از پرایمرهائی که ژن *invA* را تکثیر میکنند و مشخص کننده باکتری جنس سالمونلا می باشد و پرایمر هائی که ژن *Prot6e* را تکثیر کرده و مشخص کننده گونه انتریتیدیس می باشند مورد استفاده قرار گرفت. در این مطالعه مقدماتی میزان آلودگی لاشه طیور به جنس سالمونلا ۱۴ درصد و میزان آلودگی به گونه انتریتیدیس ۶ درصد تعیین گردید. جهت مشخص نمودن دقیق میزان آلودگی لاشه طیور به باکتری سالمونلا و گونه سالمونلا انتریتیدیس، استفاده از روش M-PCR توصیه می گردد که می تواند جایگزین مناسبی برای کشت مرسوم باشد.

واژه های کلیدی:

سالمونلا- سالمونلا انتریتیدیس- لاشه طیور- M- PCR

فهرست مطالب

عنوان.....شماره صفحه

فهرست جداول وتصاویر.....غ

فصل اول.....۱

مقدمه.....۲

فصل دوم ۶

مبانی نظری تحقیق.....۷

۲-۱- معرفی سالمونلا.....۷

۲-۱- تاریخچه.....۷

۲-۲- طبقه بندی.....۷

۲-۲-۱- خصوصیات بیوشیمیایی.....۸

۲- ۲-۲- روش های طبقه بندی.....۸

۲-۲-۳- طرح کافمن – وایت ۹

۲-۲-۴- طبقه بندی عددی.....۹

۲-۳- شرایط رشد.....۱۰

۲-۴- قدرت بقا.....۱۱

۲-۵- پراکندگی باکتری در محیط.....۱۲

۲-۶- آلودگی در انسان.....۱۳

۲-۶-۱- میزان شیوع.....۱۳

عنوان.....شماره صفحه

۲-۶-۲- علائم بیماری و درمان.....۱۳

۲-۶-۳- دوز آلوده کننده.....۱۵

۲-۷- آلودگی درطیور.....۱۵

۲-۷-۱- میزان شیوع بیماری.....۱۵

۲-۷-۲- علائم بیماری.....۱۶

۲-۷-۳- نشانه های کالبد گشایی.....۱۶

۲-۷-۴- بررسی گله از نظر سالمونلا.....۱۶

۲-۷ -۵- منشاآلودگی ۱۷

۲-۷-۵ -۱- انسان.....۱۷

۲-۷-۵ -۲- جوندگان ،پرندگان وحشی ،حشرات وآب.....۱۷

۲-۷-۵ -۳- نقش مواد غذایی.....۱۷

۲-۸- بیماری زایی.....۱۸

۲-۸-۱- چسبیدن وتهاجم.....۱۸

۲-۸-۲- ژن های مسئول حدت ۱۹

۲-۸-۳- سایر فاکتورهای حدت.....۲۰

۲-۸-۴- پلاسمیدهای حدت.....۲۰

۲-۹- روش های تشخیص سالمونلا.....۲۱

۲-۹-۱- روش سنتی کشت وجداسازی.....۲۱

۲-۹-۲-روش های کشت سریع سالمونلا.....۲۲

۲-۹-۲-۱- روش OSRT..... ۲۲

۲-۹-۲-۱- روش توقف ایمونولوژیک حرکت.....۲۳

۲-۹-۳-روش باز یابی سریع سالمونلا.....۲۳

۲-۹-۳-۱- روش امپیدیومتریک.....۲۳

۲-۹-۴- روش سرولوژیک.....۲۳

عنوان.....شماره صفحه

۲-۹-۴-۱- روش ELISA ۲۳

۲-۹-۴-۲- روش آگلوتیناسیون به کمک لاتکس.....۲۳

۲-۹-۵- سایر روش های بازیابی سالمونلا.....۲۴

۲-۹-۶- روشPCR.....۲۴

۲-۹-۶-۱- تاریخچه ۲۴

۲-۹-۶-۲- ساختار DNA.....۲۴

۲-۹-۶-۳- روش PCR.....۲۴

۲-۹-۶-۴- شناسایی محصولات PCR.....۲۵

۲-۹-۶-۵- بهبود حساسیت و ویژگی تکثیر PCR.....۲۵

۲-۹-۶-۷- اجزای PCR.....۲۶

فصل سوم.....۲۸

مروری بر تحقیقات انجام شده.....۲۹

فصل چهارم.....۳۳

روش تحقیق.....۳۴

۴-۱- مواد لازم برای نمونه گیری(یک نمونه).....۳۴

۴-۲- روش نمونه گیری.....۳۴

۴-۳- مواد لازم برای مراحل پیش غنی سازی، غنی سازی و کشت در محیط های انتخابی و تفریقی.....۳۵

۴-۴- مراحل انجام کار.....۳۵

۴-۴-۱-کشت در محیط پیش غنی سازی.....۳۵

۴-۴-۲- کشت در محیط غنی سازی.....۳۵

۴-۴-۳- کشت در محیط های انتخابی.....۳۶

۴-۴-۴-کشت در محیط های تفریقی.....۳۶

۴-۵ - استفاده از واکنش های زنجیره ای پلیمراز(PCR).....۳۶

عنوان.....شماره صفحه

۴-۵-۱- استخراج DNA.....۳۷

۴-۵-۲- انجامMultiplex PCR ۳۷

۴-۵-۲-۱- مواد لازم.....۳۷

۴-۵-۲-۲- پرایمر های مورد استفاده.....۳۸

۴-۵-۲-۳- برنامه حرارتی.....۳۹

۴-۵-۳ -رویت DNA در ژل الکتروفورز.....۳۹

۴-۵-۳-۲- مواد لازم جهت تهیه ژل آگاروز.....۳۹

۴-۵-۳-۲- مراحل تهیه ژل الکتروفورز.....۳۹

فصل پنجم.....۴۱

نتایج.....۴۲

بحث، بررسی، تحلیل.....۴۳

فصل ششم:.....۵۲

نتیجه گیری و پیشنهاد ها.....**۵۳**

خلاصه انگلیسی.....۵۴

منابع ۵۵

فهرست جداول

عنوان.....شماره صفحه

جدول ۱-۴.....38
جدول ۲-۴.....38
جدول ۳-۴.....39

فهرست تصاویر

عنوان.....شماره صفحه

شکل ۱-۴.....42
شکل ۲-۴.....43

فصل اول

مقدمه

باکتری های جنس سالمونلا باسیل های گرم منفی و هوازی هستند که به خانواده انتروباکتریاسه تعلق دارند(۲۰).

باکتری سالمونلا در آب، گیاهان و تعداد زیادی از مهره داران خونگرم و خونسرد از قبیل انسان، حیوانات، پرندگان، ماهی ها، جوندگان و حشرات دیده می شود(۵۵). ولی جایگاه اصلی آن روده انسان و حیوانات است(۱۷).

اگر چه اعضای این جنس متحرک هستند و بوسیله تاژک حرکت می کنند ولی سروتیپ پلوروم و گالیناروم غیر متحرک می باشند(۴۷).

باکتری سالمونلا از لحاظ رشد انعطاف پذیر بوده و با شرایط محیطی خود را هماهنگ می کند. بعضی سویه های سالمونلا می توانند در دما های بالای ۵۴رشد کنند و بعضی خاصیت سرما دوستی دارند(۴-۲درجه سانتیگراد). اما بهترین درجه برای آنها ۳۷ درجه است(۲۰). مطالعات نشان داده اند که گونه های گرما دوست مثل بعضی از سرووارهای تایفی موریوم در صورت نگهداری طولانی مدت در استرس گرمایی، قادر به رشد در دمای ۵۴ درجه هستند. سالمونلا می تواند برای مدت طولانی در غذاهای ذخیره شده در دمای انجماد یا دمای اتاق زنده بماند(۴۷).

فاکتورهای زیادی می تواند بقای سالمونلا را در غذاهای منجمد تحت تاثیر قرار دهدکه از جمله آنها می توان به ترکیب ماده غذایی منجمد، فرایند انجماد، شرایط فیزیولوژیکی سالمونلا و پاسخ های اختصاصی سویه اشاره کرد(۴۷).

به دلیل تغییر در ترکیب اسیدهای چرب غشای سلولی سالمونلا در استرس گرمایی میزان زیادی فسفولیپید های غشایی اشباع شده تولید می شود. این عمل سیالیت غشای باکتری را کم می کند و مقاومت باکتری را نسبت به آسیب های گرمایی افزایش می دهد(۴۷).

امکان بقای سالمونلا در درجه حرارت های پایین بیشتر است بنابر این غذاهایی که در شرایط یخچالی، اتمسفر و وکیوم نگهداری می شوند در معرض خطرند(۲۰). ولی در کل باکتری نسبت به حرارت حساس بوده و پاستوریزاسیون منجر به حذف باکتری می گردد(۶۶).

سالمونلا قابلیت رشد درpH ۴/۵ - ۹/۵ را دارند ولی بهترین pH برای آنها ۶/۵-۷/۵ است (۴۷).غلظت نمکی بالا باعث افزایش نیمه عمر مواد غذایی و کاهش بقای سالمونلا می شود(۴۷). بنابراین رشد سالمونلا در غلظت نمکی ۴-۳ درصد مهار می شود(۴۷). سالمونلاها در awکمتر از ۹۳ درصد قادر به رشد نیستند(۱۷).

با افزایش دما مقاومت سالمونلا به نمک افزایش می یابد. غلظت نمک، دما و pH اثرات بسزایی بر رشد گونه های سالمونلا دارند. امروزه معتقدند که افزایش دما قابلیت رشد باکتری را در pH زیر ۵ و غلظت نمک بالای ۲ درصد افزایش می دهد(۴۷).

زیستگاه اصلی سالمونلا لوله گوارش است (۱۶). این باکتری ازطریق بسیاری از مواد غذایی، حیوانات، جوندگان، پرندگان، حشرات و خزندگان بدون اینکه علایمی در آنها دیده شود، انتقال می یابد و از طریق مدفوع باعث آلودگی آب و غذای انسان و حیوان می گردند(۱۶). تعداد زیادی از مواد غذایی آلوده از جمله گوشت قرمز، طیور و ماهی، تخم مرغ،شیر و محصولات لبنی، غذاهای منجمد و... می توانند نقش آلوده کننده برای انسان داشته باشند(۵۵).

بررسی ها نشان می دهد که در انگلستان ۷۵ درصد مسمومیت های غذایی مربوط به سالمونلا بوده که ۴۱ درصد این موارد ناشی از مصرف محصولات طیور الوده بوده است(۵۵). گمان می رود که ۶۰٪ سالمونلوز در اروپا ناشی از سالمونلا انتریتیدیس بوده است(۴۳). با توجه به تحقیقات انجام گرفته سالمونلا انتریتیدیس و تایفی موریوم بیشترین مواردی بوده اند که باعث بیماری انسان شده اند(۴۶). بررسی ها نشان می دهد که گوشت طیور، تخم مرغ و گوشت قرمز از مهمترین منابع آلوده کننده در انسان می باشد.

برخی از سالمونلا ها دارای میزبان اختصاصی هستند، مانند پلوروم و گالیناروم در طیور، ولی بعضی دیگر مثل تایفی موریوم و انتریتیدیس باعث بیماری در میزبان های مختلف می شوند(۷).

سالمونلوز در طیور به سه شکل دیده می شود.: