مقایسه فراوانی همزمان ژن های حدت ((int,inv,spv (vir) در سالمونلا تیفی موریوم و اینفنتیس از موارد بالینی با روش Multiplex PCR

الهام سیاسی *[۱]، بهاره آزادی [۲]، صدیقه مهرابیان [۳]

۱- استادیار، دکترای ژنتیک، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی – واحد تهران شمال ،تهران – ایران.
۲- کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی – واحد تهران شمال ، تهران – ایران.
۳- استاد، دکترای میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی،دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران – ایران.

***نشانی برای مکاتبه:** میدان هروی – خیابان مکران جنوبی – بوستان دهم – دانشکده علوم زیستی - گروه میکروبیولوژی (هیئت علمی تمام وقت).
ایمیل : emi_biotech2006@yahoo.ca

دریافت مقاله: دی نود و هشت پذیرش برای چاپ: بهمن نود و هشت

چکیده

سابقه و هدف: *ژن های حدت در سالمونلا مربوط به ترکیبی از فاکتورهای پلاسمیدی و کروموزومی بوده و یک جایگاه ژنی منفرد مسئول تمام تظاهرات بیولوژیکی در سالمونلا نمی باشد. با توجه به اینکه در سروتیپ های مختلف سالمونلا از نظر ژن‌های حدت تفاوت وجود دارد، هدف از این مطالعه مقایسه حضور ژن های حدت پلاسمیدی و کروموزومی ((int,inv,spv (vir سالمونلا اینفنتیس و تیفی موریوم از موارد بالینی در کودکان و بزرگسالان با روش Multiplex PCR بود.*

روش کار: در این پژوهش ۶۷۶ نمونه مدفوع از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان های امام خمینی و میلاد جمع آوری شد و ۶۰ ایزوله به عنوان سالمونلا شناسایی شد. پس از انجام سروتایپینگ،۳۰ ایزوله به عنوان سالمونلا تیفی موریوم و ۳۰ ایزوله به عنوان سالمونلا اینفنتیس تشخیص داده شد. سپس با استفاده از تکنیک Multiplex PCR شیوع ژن های (int,inv,spv (vir مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: *تمام سروتیپ های مورد بررسی دارای ژن های invA و Int بودند. ۹۳/۳٪ سروتیپ های تیفی موریوم و ۶/۷٪ سروتیپ اینفنتیس دارای ژن SpvC بودند. در ۹۳/۳٪ از سویه های تیفی موریوم و ۶/۷٪ از سویه های اینفنتیس هر سه ژن به صورت همزمان وجود داشت.*

نتیجه گیری: *ژن های حدت، شدت بیماری زایی سویه های سالمونلا اینفنتیس و تیفی موریوم را افزایش می دهند، لذا جداسازی و بررسی مولکولی و ژنتیکی این ژن ها می تواند کمک شایانی به شناخت آنزیم های باکتری های نام برده نموده و به ساخت داروهای موثر برای درمان بیماری های مرتبط منجر شود.*

واژگان کلیدی: *سالمونلا تیفی موریوم، سالمونلا اینفنتیس، Multiplex PCR، ژن های int,inv,spv*

مقدمه

سالمونلاها با ویژگی های عمومی خانواده انتروباکتریاسه، باسیل های گرم منفی، بی هوازی اختیاری، غیر اسید فست و بدون اسپور بوده که گروه بزرگی از باکتری ها به شمار می روند. این باکتری ها مانند سایر اعضای انتروباکتریاسیه، اکسیداز منفی و نیترات مثبت هستند. همچنین گلوکز را تخمیر کرده و گاز تولید می نمایند. معمولاً در محیط *TSI* تولید سولفید هیدروژن (SH_2) می نمایند و لاکتور، سوکروز و *ONPG* منفی همچنین دارای واکنش اندول منفی، اوره منفی، *VP* منفی و متیل رد *(MR)* مثبت می باشند(۱). سالمونلا انتریکا سروار اینتریتیدیس، تیفی موریوم و انفنتیس از مهم ترین عوامل مسمومیت های غذایی در انسان و حیوانات در جهان به شمار می روند. این میکروارگانیسم یکی از شایع‌ترین پاتوژن های قابل انتقال از حیوانات به انسان می‌باشد. گاستروانتریت شایع‌ترین و متداول‌ترین عفونت سالمونلایی است که توسط این سروتیپ ها ایجاد می‌گردد. سالمونلوزیس از دیگر بیماری‌های ناشی باکتری سالمونلاست و از طریق مصرف مواد

غذایی آلوده انتقال می یابد که منجر به افزایش نگرانی در سطح بهداشت عمومی شده است(۲ و ۳).

ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی در سالمونلاها باعث مقاومت آن‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها می گردند. گونه های سالمونلا این توانایی را دارند که از راه های مختلف مقاومت های آنتی بیوتیکی را کسب نمایند. بروز مقاومت آنتی بیوتیکی هم اکنون به مشکلی رو به گسترش در میان گونه های سالمونلا تبدیل شده و سبب ایجاد موانعی در کنترل و درمان عفونت های حاصل از این باکتری شده است. بدین جهت بررسی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در نمونه های بالینی سالمونلا بسیار حائز اهمیت می باشد و آزمایش های سریع و قابل اعتماد درآزمایشگاه های تشخیص پزشکی، دامپزشکی و صنایع غذایی به منظور تشخیص سالمونلاها امری مهم و ضروری می باشد(۴ و ۵).

سالمونلوز از جمله بیماری های عفونی بسیار مهم ومشترک بین انسان و دام است. در حال حاضر بیش از ۲۰۰۰ سروار در جنس سالمونلا وجود دارد(۶). در ایران نیز گزارش های متعددی از اپیدمی های مربوط به سرووارهای اینفنتیس و تیفی موریوم انتشار یافته است. از سوی دیگر وجود حاملین چه در انسان و چه در حیوانات جایگاه ویژه ای در اپیدیمیولوژی این بیماری پیدا کرده است که معمولاً تشخیص و شناسایی آن‌ها با روش معمول آزمایشگاهی مشکل می باشد. در ایران دومین عامل ایجاد کننده اسهال در انسان پس از شیگلا باکتری سالمونلا می باشد. به طوری که، شیوع آن در محل پرورش حیوانات باعث از دست رفتن تولیدات دامی، مرگ و میر، افزایش ضرر های اقتصادی می گردد و جهت جلوگیری از انتشار این عفونت ها می بایست بیماری خیلی سریع تشخیص داده شود. سالمونلا ها، حامل ژن های کروموزومی و پلاسمیدی هستند که در حدت و تهاجم این باکتری نقش عمده و اساسی دارند. از مهم ترین عوامل حدت در سالمونلا ژن های *int,inv,spv (vir)* می باشند(۷ و ۸). تهاجم به مخاط روده مرحله مهم و اساسی در بیماری زایی سالمونلاها می باشد. ژن *invA (Invasive)* ژن موثر در تهاجم سالمونلاها می باشد. این ژن که تقریباً در ۹۹ درصد از سروتیپ های سالمونلا حضور داشته نه تنها برای سالمونلاها اختصاصی می باشد، بلکه در تمام سالمونلاهای بیماری زا وجود دارد(۷ و ۸). این ژن پروتئین های غشای داخلی باکتری سالمونلا را که برای تهاجم به سلول های اپتیلیال روده میزبان لازم است کد می کند (۹). ژن *intI* که آنزیم اینتگراز را کد می‌کند. این اینتگراز متعلق به خانواده تیروزین- ریکامبیناز می باشد و سبب وارد شدن ژن خارجی به ساختار اینتگرون می گردد. پلاسمید حدت حامل اپرون *spv* شامل پنج ژن *spvA*، *spvB*، *spvR*، *spvCR* و *spvD* می‌باشد. نقش این اپرون در ایجاد حدت و مقاومت دارویی، انتشار و مستقر شدن باکتری در بدن میزبان (انسان و حیوان) و اختلال در سلامت جامعه به اثبات رسیده است (۱۰). حضور و یا عدم حضور این پلاسمید می تواند در برنامه های واکسیناسیون، درمان، کنترل و پیشگیری موفقیت های بزرگی را حاصل نماید.

بر این اساس در این تحقیق با استفاده از ۳ جفت آغازگر به روش *PCR* چند گانه به بررسی حضور ژن های حدت پلاسمیدی و کروموزومی (*int,inv,spv (vir)*) سالمونلا اینفنتیس و تیفی موریوم جدا شده از موارد بالینی با روش *Multiplex PCR* بود. در روش *Multiplex PCR* به دلیل استفاده از چند آغاز گر توانایی ازدیاد و شناسایی چندین ژن تواماً و همزمان با هم وجود دارد. صرفه جویی در مواد لازم *PCR* و ویژگی و حساسیت بالا و کاهش زمان بررسی های ژنتیکی و الگوهای مورد نیاز با چند جفت آغازگر به صورت عمومی و اختصاصی و با قابلیت اعتماد از ویژگی های این روش می باشد.

روش کار

در این تحقیق، ۶۷۶ نمونه مدفوعی از بیماران بیمارستان های میلاد و امام خمینی در کودکان جدا گردید و در ظرف استریل و درپوش دار مخصوص در شرایط ۴ درجه سانتی گراد به آزمایشگاه میکروب شناسی منتقل گردید. در آزمایشگاه جهت آماده سازی نمونه ها، نمونه های مدفوعی با محلول فسفات بافرسالین یکنواخت گردید و سپس ذرات جامد موجود در مدفوع، با استفاده از سانتریفوژ با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه رسوب داده شد و مایع فوقانی در ظرف استریل دیگری در ۴ درجه سانتی گراد جهت آزمایشات بعدی نگهداری گردید. جامعه آماری براساس تعیین حجم نمونه (کوکران) تعیین شد.

برای جداسازی سالمونلاها ابتدا نمونه ها برای غنی سازی بر روی محیط آبگوشت راپاپورت واسیلیادیس کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ C^o انکوبه شدند. بعد از اتمام انکوباسیون، از نمونه های کشت داده شده در محیط راپاپورت واسیلیادیس ۱۰۰ میکرولیتر برداشت کرده و در ژلوز مک کانکی و ژلوز سالمونلا – شیگلا به صورت خطی کشت داده شد و به مدت یک شبانه روز در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. سپس برای تهیه کشت خالص از سالمونلا و به دست آوردن تک کلونی از کلنی های رشد کرده در محیط کشت افتراقی، مک کانکی آگار به صورت خطی کشت داده شد. پلیت ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴-۴۸ ساعت گرمادهی شدند. پس از انجام رنگ آمیزی گرم، انجام تست های بیوشیمیایی (با محیط های کشت از شرکت مرک المان) مانند *TSI*، *MRVP*، *SIM* (اندول،H_2S و حرکت)، تخمیر قندها، اوره از، لیزین دکربوکسیلاز، سیمون سیترات انجام گرفت.

پس از تایید جدایه ها به عنوان سالمونلا، کلنی های سالمونلا در محیط کشت مک کانکی آگار کشت مجدد داده شدند و سروتایپینگ سالمونلا های جدا شده با استفاده از آنتی سرم های

پلی والان و مونو والان (شرکت *Mast* انگلستان)، جهت تعیین سروتیپ انجام گردید.

برای شناسایی ژن‌های (*int,inv,spv (vir)*) در سالمونلا اینفنتیس و تیفی موریوم از نمونه های جداسازی شده، استخراج *DNA* انجام شد. سپس با استفاده از روش *Multiplex PCR* حضور همزمان این سه ژن در نمونه ها بررسی شد.

استخراج *DNA* ژنومیک با استفاده از کیت استخراج *DNA* شرکت *Promega* به شماره *Lot: 00002693* انجام شد. سپس برای ارزیابی کیفی و کمی *DNA* استخراج شده از دستگاه فلورومتر مدل *E6150* و الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۱ ٪ استفاده شد. تکثیر ژن های ویرولانس (*int,inv,spv (vir)*) در ایزوله های سالمونلا اینفنتیس و تیفی موریوم با روش *Multiplex PCR* انجام شد. در این تکنیک از چندین جفت پرایمر اختصاصی در یک محلول *PCR* برای تکثیر چندین توالی هدف به طور هم زمان استفاده شد. به منظور تکثیر سه ژن ویرولانس مورد نظر در ایزوله های سالمونلا با استفاده از پرایمرهای ذکر شده در جدول ۱ (سنتز شده با شرکت ژن فناوران)، و مواد مخلوط واکنش *PCR* از شرکت سیناژن (جدول ۲) و با استفاده از سیکل حرارتی دستگاه ترموسایکلر (*Eppendorf*) که در جدول ۳ آورده شده است، انجام شد. در این بررسی از سویه دارای هر سه ژن مورد بررسی، به عنوان کنترل مثبت و از نمونه دارای اب مقطر به جای *DNA* ، به عنوان کنترل منفی استفاده گردید. برای بررسی حضور سه ژن (*int,inv,spv (vir)*) در نمونه ها، مقدار ۵ میکرولیتر از محصول واکنش*Multiplex PCR* بر روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد. برای بررسی آماری نتایج از نرم افزار *SPSS* نسخه ۱۹ و از آزمون آماری *Chi-Square*، استفاده شد. در تمام محاسبات آماری $P < ۰/۰۵$ به عنوان شاخص آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق

نام ژن	توالی پرایمر (*3′→5′*)	محصول PCR	رفرنس
int	F- GCCCTCCCGCACGATGAT R- ATTGGCGGCCTTGCTGTTCTTCTA	۲۶۵	۱۱
invA	F- CGCGGCCCGATTTTCTCTGGA R- AATGCGGGGATCTGGGCGACAAG	۳۲۱	۱۱
spvC	F- GGGGCGGAAATACCATCTACA R- GCGCCCAGGCTAACACG	۳۹۲	۱۱

جدول ۲- مقادیر و موارد به کار رفته جهت تهیه مخلوط واکنش PCR

مواد واکنش PCR	حجم (µl)
Master mix (2X)	۱۰
پرایمر چپ (10 pmol/µl)	۰/۸ (۳)
پرایمر راست (10 pmol/µl)	۰/۸ (۳)
نمونه DNA	٤
اب مقطر دو بار تقطیر شده	٦/۲
حجم کل	۲۵

جدول ۳- شرایط به کار رفته جهت انجام واکنش PCR

مرحله واکنش	دما	زمان	
واسرشت شدن اولیه	۹۵ سانتیگراد	۳ دقیقه	
واسرشت شدن	۹۴ سانتیگراد	۳۰ ثانیه	۳۰ چرخه
اتصال	۵۸/۵ سانتیگراد	۳۰ ثانیه	
طویل شدن	۷۲ سانتیگراد	۶۰ ثانیه	
	۷۲ سانتیگراد	۵ دقیقه	

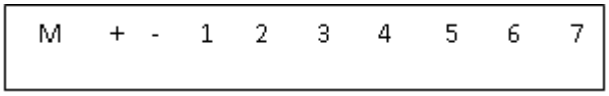
یافته ها

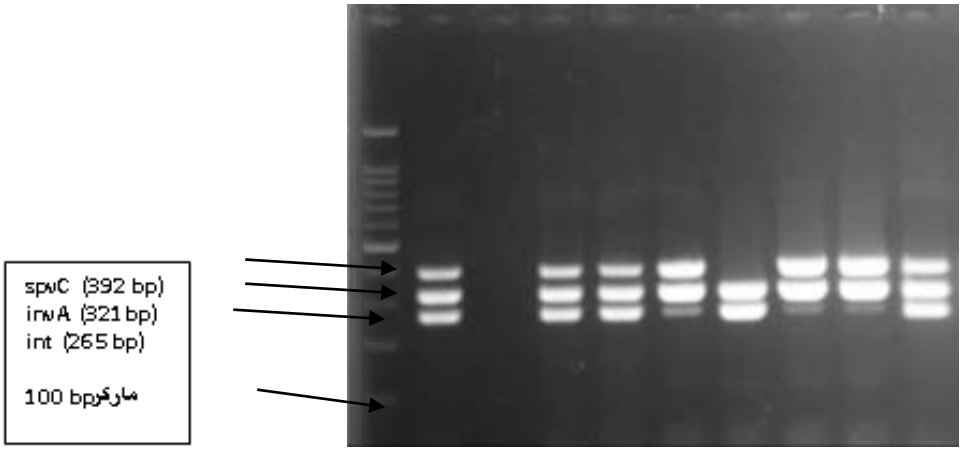
در این پژوهش ۶۷۶ نمونه مدفوعی از بیماران در دو گروه کودکان و بزرگسالان با طیف سنی ۳ تا ۱۳/۵ سال (با میانگین سنی ۸/۵ سال) و بزرگسالان با طیف سنی ۱۴ تا ۴۲ سال (با میانگین سنی ۲۸ سال) جمع‌آوری گردید. پس از انجام تست‌های تشخیصی تعداد ۶۰ نمونه به عنوان سالمونلا شناسایی شد. نتایج رنگ امیزی گرم و ازمون های افتراقی که برای شناسایی سالمونلا تیفی موریوم و سالمونلا اینفنتیس استفاده شده است در جدول ۴ نشان داده شده است. ۶۰ جدایه سالمونلا که با روش‌های بیوشیمیایی شناسایی شده بودند، با آزمایش سروتایپینگ مورد بررسی قرار گرفتند. تعداد ۳۰ ایزوله سروتیپ تیفی موریوم (۵۰ ٪) و تعداد ۳۰ ایزوله سروتیپ اینفنتیس (۵۰ ٪) شناسایی شدند.

۴- نتایج تست های بیوشیمیایی برای شناسایی سالمونلاها

نام تست	سالمونلا تیفی موریوم	سالمونلا اینفنتیس
رنگ امیزی گرم	گرم منفی	گرم منفی
مک کانکی اگار	+	+
حرکت	+	+
تولید H2S	+	+
تست TSI	+	+
لیزین دکربوکسیلاز	+	+
اوره از	-	-
تست MR	+	+
تست VP	-	-
تخمیر گلوکز	+	+
تخمیر لاکتوز	-	-
سیمون سیترات	+	+

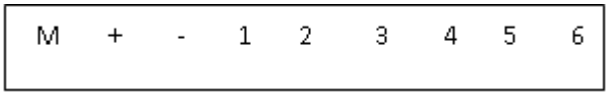
نتایج محصولات **Multiplex PCR** که بر روی نمونه های سالمونلا تیفی موریوم و سالمونلا اینفنتیس انجام شده است پس از الکتروفورز روی ژل اگاروز یک درصد و عکسبرداری با ژل داک بررسی شد (شکل ۱و ۲). نتایج فراوانی حضور ژن های (**int,inv,spv (vir)**) در سویه های مورد بررسی در جدول ۵ آورده شده است.

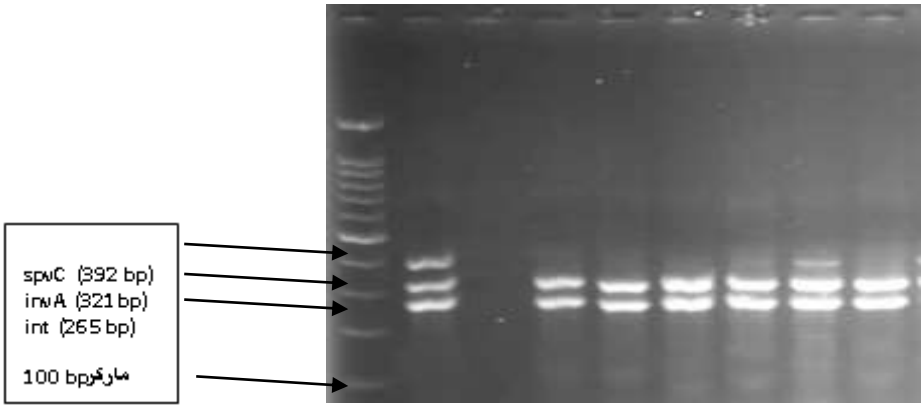




شکل ۱- تکثیر ژن های حدت مورد بررسی در سویه‌های *سالمونلاتیفی‌موریوم* با روش Multiplex PCR .

خانه M: مارکر مولکولی (۱۰۰bp)؛ خانه +: نمونه کنترل مثبت (از سویه های دارای هر سه ژن *spv*C , *inv*A , ***int***)؛ خانه -: نمونه کنترل منفی (آب مقطر)؛ خانه های شماره ۱، ۲، ۳، ۵، ۶و ۷: نمونه‌های دارای حضور هر سه ژن *spvC* (۳۹۲bp)، *invA* (۳۲۱bp) و *int* (۲۶۵bp)؛ خانه های شماره ۴: نمونه دارای حضور ژن *invA* (۳۲۱bp) و *int* (۲۶۵bp).





شکل ۲- تکثیر ژن های حدت مورد بررسی در سویه های *سالمونلا اینفنتیس* با روش Multiplex PCR .

خانه M: مارکر مولکولی (۱۰۰bp)؛ خانه +: نمونه کنترل مثبت (از سویه های دارای هر سه ژن *spv*C , *inv*A , ***int***)؛ خانه -: نمونه کنترل منفی (آب مقطر)؛ خانه های شماره ۱، ۲، ۳، ۴ و ۶: نمونه‌های دارای حضور دو ژن *invA* (۳۲۱bp) و *int* (۲۶۵bp)؛ خانه شماره ۵: نمونه دارای حضور هر سه ژن *spvC* (۳۹۲bp)، *invA* (۳۲۱bp) و *int* (۲۶۵bp).

نتایج نشان داد ۹۳/۳٪ از جدایه های تیفی موریوم و ۶/۶٪ از جدایه‌های اینفنتیس سه ژن حدت ((int,inv,spv (vir) را دارا می باشند. با بررسی نتایج سروتایپینگ و ژنوتایپینگ و مقایسه آنها مشخص شد که تعداد ۲ مورد از سروتیپ‌های اینفنتیس جداسازی شده همه ژن‌های حدت مورد بررسی را دارا بوده و تعداد ۳۰ مورد از آن‌ها invA و Int را دارا می‌باشند. همچنین تعداد ۲۸ مورد از سروتیپ‌های تیفی موریوم جداسازی شده دارای هر سه ژن بصورت همزمان بودند و ۳۰ ایزوله از آنها دارای ژن های invA و Int بصورت همزمان بودند. تمام سویه ها دارای دو ژن invA و Int به طور همزمان بودند (جدول ۶).

جدول ۶- فراوانی ژن های حدت بر اساس نوع سروتیپ در جدایه های سالمونلا

سروتیپ	فراوانی ژن های حدت			
	int , *inv*A , *spv*C	*inv*A , *spv*C	*int* ,*spv*C	*int* , , *inv*A
تیفی موریوم	۲۸	۲۸	۲۸	۳۰
اینفنتیس	۲	۲	۲	۳۰
کل	۳۰	۳۰	۳۰	۶۰

نتایج حاصل از تحلیل‌های آماری صورت گرفته با استفاده از آزمون کای‌دو نشان داد که دو متغیر spvC و نوع باکتری ارتباط معناداری در سطح اطمینان ۹۵ درصد با هم دارند(**P** <۰/۰۵). همچنین حضور سه ژن ((int,inv,spv (vir) در باکتری سالمونلا تیفی موریوم دارای ارتباط معنی‌داری نبودند(**P**=۰/۱۲۹)، و حضور سه ژن ((int,inv,spv (vir) در باکتری سالمونلا اینفنتیس دارای ارتباط معنی‌داری بودند(**P** <۰/۰۱). بین حضور همزمان سه ژن ((int,inv,spv (vir) در دو باکتری سالمونلا تیفی موریوم و باکتری سالمونلا اینفنتیس ارتباط معنی دار وجود نداشت(**P**=۰/۶۹).

بحث

گسترش ژن های بیماریزا به یک مشکل مهم در درمان عفونت های حاصل از باکتری های بیماریزا تبدیل شده است. ژن های ویرولانس در سالمونلا شناسایی شده است که هر یک به صورت جداگانه در DNA کروموزومی، باکتریوفاژی وپلاسمیدی باکتری قرار دارند. این جزایر بیماریزا در نواحی بزرگی از DNA ژنومی سویه های بیماریزا قرار دارند، سویه های غیر بیماریزا فاقد این ژنها هستند. با این وجود انتقال این ژن های بیماریزا از سویه های پاتوژن به سویه های غیر پاتوژن طی فرآیند انتقال افقی ژن، از طریق پلاسمید ها و باکتریوفاژها اثبات شده است (۳ و ۸). لذا هدف از مطالعه حاضر مقایسه حضور ژن های حدت پلاسمیدی و کروموزومی ((int,inv,spv(vir) سالمونلا اینفنتیس و تیفی موریوم از موارد بالینی در کودکان و بزرگسالان با روش Multiplex PCR بود. برای این منظور ۶۷۶ نمونه مدفوع از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان های امام خمینی و میلاد جمع آوری شد و پس از انجام تست های تشخیصی و سروتایپینگ، ۳۰ ایزوله به عنوان سالمونلا اینفنتیس و ۳۰ ایزوله به عنوان سالمونلا تیفی موریوم تایید شد. با استفاده از تکنیک Multiplex PCR شیوع همزمانی ژن های spvC، invA و Int مورد بررسی قرار گرفت. در این تحقیق ژن های int و invA در اینفنتیس و تیفی موریوم دارای شیوع ۱۰۰ درصدی بودند؛ در حالی که ژن spvC از شیوع کمتری برخوردار بود و میزان شیوع ان در سروتیپ های اینفنتیس و تیفی موریوم به ترتیب ۷ ٪ و ۹۴ ٪ بود. با توجه به شیوع صد در صدی ژن های invA و Int در ایزوله های مورد بررسی به نظر می‌رسد که این ژن ها در بیماریزایی سروتیپ های مختلف سالمونلا حائز اهمیت باشند. همچنین ژن spvC در سروتیپ تیفی موریوم نسبت به اینفنتیس دارای شیوع بیشتری بود که ممکن است نشان دهنده نقش برجسته تر این ژن در ویرولانس تیفی موریوم نسبت به اینفنتیس باشد که البته با توجه به تعداد کم نمونه نیاز به بررسی های بیشتری دارد.

سالمونلاهای غیرتیفوئیدی یک بیماری مشترک بین انسان و دام می‌باشند و آب و مواد غذایی آلوده به این باکتری، از دلایل اصلی ابتلا به بیماری در انسان است. این میکروارگانیسم ها می‌توانند از محیط‌های آبی به طور مستقیم با مدفوع انسان و یا حیوانات در تماس باشند و یا به طور غیرمستقیم از طریق فاضلاب و یا زمین‌های کشاورز ی باعث آلودگی گردند. در کشورهای صنعتی، سالمونلا انتریکا سروار انتریدیتیس و تیفی موریوم از عوامل اصلی عفونت‌های سالمونلاهای غیرتیفوئیدی به شمار می‌روند. با این وجود، گزارشات منتشر شده در برخی از کشورها، از

جمله مجارستان و استرالیا حاکی از انتشار بالای سروارهای اینفنتیس در سال های اخیر، نسبت به گذشته می‌باشد (۱۲ و ۱۳). به طور مثال، در سال‌های ۲۰۰۵ و ۲۰۰۶، عفونت‌های سالمونلوز باعث حدود ۸ الی ۹ هزار مورد بیماری در مجارستان گردید. شایع ترین سروتیپ‌ها، سالمونلا انتریتیدیس و سالمونلا اینفنتیس بودند که روی هم حدود ۹۰ درصد از موارد گزارش شده را شامل شدند. در این سال ها، سروتیپ اینفنتیس به عنوان یکی از شایع ترین سروارها و مسئول حدود ۵ درصد از بیماری‌های ایجاد شده است (۱۴). نتایج مطالعات گال مور و همکاران در سال ۲۰۱۰ در فلسطین اشغالی نشان می‌دهد که از سال ۲۰۰۶ شیوع سالمونلاهای غیر تیفوئیدی به طور ناگهانی افزایش یافته است. این میزان در سال ۲۰۰۹ به ۴۴ مورد در هر ۱۰۰ هزار نفر رسیده است. مطالعه ی این گروه نشان داد که در این کشور شیوع سالمونلا انتریکا سروتیپ اینفنتیس از ۱/۲ مورد در سال ۲۰۰۱ به حدود ۱۴/۷ مورد در هر ۱۰۰ هزار نفر در سال ۲۰۰۹ رسیده که افزایشی دوازده برابری داشته است (۱۵). شیوع این سروتیپ در بیمارستان‌ها، عمدتاً در بین کودکان مشاهده می‌گردد، با این وجود در بزرگسالان گاهی اوقات با علایم سپتی‌سمی و کشنده نیز ظاهر می‌گردد. پایداری طولانی مدت در شرا یط محیطی بیمارستانی، از ویژگی‌های بارز سالمونلا سروتیپ اینفنتیس می‌باشد (۱۶). در ایران نیز شیوع این سروار در سال‌های اخیر در حال افزایش است. چنانچه در مطالعه‌ی رنجبر و همکاران در سال ۱۳۹۱ روی سالمونلاهای گروه C جدا شده از موارد انسانی مشخص شده است که از ۲۶ جدایه، ۱۹ جدایه (۷۳ درصد) جز سروار سالمونلا اینفنتیس بودند (۱۷). رحمانی از سال ۲۰۰۷ تا سال ۲۰۱۱ ،۳۶ نمونه سالمونلا از جوجه های گوشتی سه منطقه در شمال کشور جمع آوری نمود که ۷۵ درصد جدایه ها سالمونلا اینفنتیس و ۲۵ درصد سالمونلا انتریتیدیس بودند (۱۸). عمادی در سال ۱۳۸۸ در مطالعه ای در شمال ایران از ۱۱۲۵ نمونه جدا شده سالمونلا از ماکیان بومی ۵۵/۵ درصد سالمونلا انتریتیدیس، ۲۲/۲ درصد سالمونلا تیفی موریوم، ۱۴/۸ درصد سالمونلا هادار و ۷/۴ درصد سالمونلا اینفنتیس شناسایی نمود (۱۹). سالمونلا تیفی موریوم دیگر سروتیپ مورد بررسی در این مطالعه بود. یکی از شایع ترین گونه های سالمونلا، سالمونلا تیفی موریوم است. در انسان سالمونلا تیفی موریوم بیماری شدیدی مانند سالمونلا تیفی ایجاد نمی کند و به طور معمول کشنده نیست. چهره بالینی این بیماری با اسهال، درد های شکمی، استفراغ و تهوع بروز می یابد و به طور متوسط ۷ روز ادامه می یابد .در افراد مسن، کودکان یا افرادی که سیستم ایمنی ضعیفی دارند اگر با آنتی بیوتیک درمان نشوند، عفونت سالمونلا اغلب کشنده است (۲۰). مطالعات انجام شده نشان می دهد که در میان سروتایپ های سالمونلا، سروتایپ انتریتیدیس، تیفی موریوم و اینفنتیس از شیوع بیشتر در میان سروتایپ ها برخوردار هستند که مهم ترین عوامل بیماریزای منتقله از طریق آب و غذای آلوده و مسبب گاستریت در انسان می باشد. هر چند شیوع بیماری‌های روده ای در کشور های پیشرفته کاهش یافته اما موارد تک گیر آن همچنان مشاهده می گردد. سالیانه حدود ۴۰۰ مورد تب تیفوئید و ۵۰۰۰۰۰ مورد سالمونلازیس غیر تیفی در کشور آمریکا گزارش شده که حدود نیمی از موارد اپیدمی سالمونلا ناشی از مصرف مرغ وتخم مرغ آلوده ویا فرارده های تخم مرغ ونیم پز می باشد. تیفی موریوم شایع ترین سروتایپ گزارش شده از مرکز کنترل بیماری‌ها می باشد. تخمین زده شده سالیانه ۹۳/۸٪ از سالمونلازیس غیرتیفوئید در سراسر جهان رخ می دهد (۲۱). مطالعات گسترده تر روی جدایه‌های سالمونلا و تعیین عوامل خطر، بررسی مولکولی و تعیین بیماریزایی جدایه‌های ایرانی و تعیین تأثیرات اقتصادی عفونت‌های ناشی از سالمونلا، از جمله مواردی است که باید به آن توجه شود. در مقایسه تحقیق حاضر با تحقیقات انجام شده فوق مشخص می‌شود که در نمونه‌های مطالعه حاضر که با روش سروتایپینگ و روش‌های بیوشیمیایی جداسازی انجام شده، ۸ ٪ نمونه ها سالمونلا بودند که ۵۰ ٪ آن‌ها سالمونلا تیفی موریوم و ۵۰ ٪ بقیه سالمونلا اینفنتیس بودند. در سال ۲۰۱۴ در برزیل رووللندز و همکاران، تعداد ۲۳۷ گونه سالمونلای مرتبط و غیر مرتبط با سالمونلوزیس منتقله از طریق مواد غذایی در برزیل را که تماما متعلق به سروتیپ انتریتیدیس بودند را هدف مطالعه قرار دادند؛ تمامی سویه‌ها از نظر حضور ژن invA مثبت بودند و فراوانی ژن spvC، ۴۸/۱درصد بود (۲۲). فراوانی ژن spv C برای تیفی موریوم مطالعه حاضر مشابه مطالعه انجام شده توسط Pan و همکاران در تایوان بود. ان محققین گزارش نمودند که از ۲۸ جدایه سالمونلا تحت مطالعه، فقط ۲ جدایه فاقد ژن spv بودند (۲۳). لینگ و همکاران جهت جداسازی سریع سالمونلا از پرایمرهای spvC و InvA استفاده نمودند و نتیجه گرفتند از مجموع ۴۱۰ جدایه مربوط به ۵۸ سروار که طی سال‌های ۲۰۰۰ تا ۲۰۰۳ از نمونه های با منشاء مدفوع، غذا، آب در چین جدا گردیده بود، در تمامی جدایه ها ژن invA وجود داشته اما فقط ۱۵٪ از نمونه ها واجد ژن spv C بودند (۲۴). در مطالعه ارجمند و همکاران حضور ژن های spv C و invA در تمام جدایه های سرووارهای تیفی موریوم و انتریتیدیس تایید گردید (۲۵). امینی و همکاران از روش Multiplex PCR برای تعیین و شناسایی همزمان ژن های spvC وinvA در سالمونلا انتریتیدیس استفاده کردند. آنالیز نمونه ها نشان داد که ژن های spvC وspvB، spvA؛ در ۹۰ درصد از سالمونلا انتریتیدیس های جدا شده از منابع انسانی و ۱۰۰ درصد گونه های جدا شده از منابع گاوی وجود دارد (۲۶). باریلی و همکاران در سال ۲۰۱۸ به بررسی الگوی ویرولانس ۱۱ سالمونلای ایزوله شده از خوک در شمال ایتالیا پرداختند. دو سروتیپ به عنوان تیفی موریوم شناسایی شد. در آزمون PCR، تمام سویه های دارای ژن های invA, hilA, stn, ssrA, sipC بودند و تنها یک سویه

دارای ژن های ssaR و spvC بود و یک سویه دارای همه ژن های ویرولانس مورد بررسی بود (۲۷). در مطالعه ای که توسط لان و همکارانش در سال ۲۰۱۸ در ویتنام انجام شد ۱۸۴ نمونه مدفوعی مورد بررسی قرار گرفت. ۲۱ ایزوله به عنوان تیفی موریوم شناسایی شد. ایزوله های مورد نظر با استفاده از تکنیک multiplex PCR مورد بررسی قرار گرفتند. تمام سویه ها از نظر ژن های invA و sopB مثبت بودند. spvC تنها در ۵ درصد از ایزوله های مورد بررسی یافت شد (۲۸).

در مطالعه حاضر نیز که مشابه تحقیقات قبلی با روش مولکولی به بررسی حضور ژن‌های حدت در سالمونلا تیفی موریوم و سالمونلا اینفنتیس پرداخته شد، حضور همزمانی سه ژن int,inv,spv (vir)) در سالمونلا تیفی موریوم ۹۴٪ و در سالمونلا اینفنتیس ۷٪ مشاهده شد؛ و تمامی سویه‌ها، از نظر حضور حداقل ۲ مورد از این ژن‌ها مثبت بودند. وجود تفاوت در نتایج این تحقیق با تحقیقات مشابه در این زمینه می تواند به دلیل تفاوت نوع نمونه ها و منبع نمونه گیری باشد و یا بدلیل تفاوت تعداد نمونه ها و روش بررسی نمونه ها باشد. همچنین می تواند به شرایط اقلیمی و محیط زیست مکان مطالعه مورد نظر ارتباط داشته باشد.

نتیجه گیری

تحقیقات انجام شده نشان داده است که در سالهای اخیر سروتایپ های جدید سالمونلا، در بروز سالمونلوز حاد دخالت دارند، از انجایی که سالمونلوز سالانه درصد قابل توجهی از عفونت‌های انسانی بخصوص در اطفال و افراد مسن را به خود اختصاص می‌دهد بنابراین لازم است که بررسی های مجددی صورت گیرد و نوع سالمونلای غالب در جامعه مشخص گردد. نتایج این بررسی نشان می دهد که پراکندگی سه ژن حدت در سروتیپ های تیفی موریوم و اینفنتیس شناسایی شده از نمونه های مدفوع کودکان و بزرگسالان، از الگوی یکسانی پیروی نمی کند ولی وجود این ژن های حدت شدت بیماری زایی باکتری های سویه اینفنتیس و تیفی موریوم را افزایش می دهند و در بیماری زایی سالمونلا ها حائز اهمیت هستند. لذا جداسازی و بررسی مولکولی و ژنتیکی این ژن ها می تواند کمک شایانی به شناخت آنزیم های باکتری‌های نام برده نموده و به ساخت داروهای موثر برای درمان بیماری های مرتبط منجر شود. همچنین می تواند برای کنترل و پیش آگهی و پیش گیری از عفونت سالمونلایی و عدم گسترش سویه های مقاوم در جامعه بکار گرفته شود.

تشکر و قدردانی

از کلیه مسئولین محترم در ازمایشگاه پاسارگارد و دانشکده علوم زیستی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال که در انجام این تحقیق کمال همکاری را مبذول فرموده اند، سپاسگزاری و تشکر می گردد

REFERENCES

1.Chironna M, Tafuri S, Gallone MS, Sallustio A, Martinelli D, Prato R, Germinario C. Outbreak of Salmonella infantis gastroenteritis among people who had eaten at a hash house in southern Italy. Public health. 2014; 128(5):438-443.

2.Abdul-Razak HH, Rocca CJ, Howe SJ, Alonso-Ferrero ME, Wang J, Gabriel R, Bartholomae CC, Gan CHV, Garín MI, Roberts A, Blundell MP, Prakash V, Molina-Estevez FJ, Pantoglou J, Guenechea G, Holmes MC, Gregory PD, Kinnon C, von Kalle C, Schmidt M, Bueren JA, Thrasher AJ, Yáñez-Muñoz RJ. Molecular Evidence of Genome Editing in a Mouse Model of Immunodeficiency. Sci Rep. 2018; 8(1):8214.

3.McWhorter AR, Chousalkar KK. Comparative phenotypic and genotypic virulence of Salmonella strains isolated from Australian layer farms. Front Microbiol. 2015; 6(12): 1-14.

4.Blair JM, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJ. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. Nat Rev microbiol. 2015; 13(1):42-51.

5.Lee KM, Runyon M, Herrman TJ, Phillips R, Hsieh J. Review of Salmonella detection and identification methods: aspects of rapid emergency response and food safety. Food Control. 2015; 47: 264-276.

6.Bale J, Meunier D, Weill FX, dePinna E, Peters T, Nair S. Characterization of new Salmonella serovars by whole-genome sequencing and traditional typing techniques. Journal of medical microbiology. 2016; 65(10): 1074-1078.

7.Ahmadi F. The Effect of Virginiamycin and Thepax on Performance and some parameters in serum of blood broiler. World Applied Sciences Journal. 2010; 10(7): 834-838.

8.Ranjbar R, Mortazavi SM, Mehrabi Tavana A, Sarshar M, Najafi A, Soruri Zanjani R. Simultaneous molecular detection of Salmonella enterica serovars Typhi, enteritidis, infantis, and Typhimurium. Iran J Public Health. 2017; 46(1): 103-111.

9.Zagato E, Mazzini E, Rescigno M. Immunology letters Rescigno. 2016. The variegated aspects of Immunoglobulin A. Immunol Lett. 2016 ;178:45-49.

10.Jafarzadeh Somea A, Amini K. Molecular Identification of Plasmid Virulence Genes Spv in Salmonella Enteritidis Isolated from Poultry Samples in Saveh. Veterinary Researches Biological Products. 2016; 29(2-111): 2-7.

11.Gan E, Baird FJ, Coloe PJ, Smooker PM. Phenotypic and molecular characterization of Salmonella enterica serovar Sofia, an avirulent species in Australian poultry. Microbiology. 2011; 157(Pt 4):1056-1065.

12.Miller T, Prager R, Rabsch W, Fehlhaber K, Voss M. Epidemiological relationship between Salmonella Infantis isolates of human and broiler origin. Lohmann Inf. 2010; 45(2): 27-31.

13.Ross IL, Heuzenroeder MW. A comparison of three molecular typing methods for the discrimination of Salmonella enterica serovar Infantis. FEMS Immunol Med Microbiol. 2008; 53(3):375-384.

14.Dunowska M, Morley PS, Traub-Dargatz JL, Davis MA, Patterson G, Frye JG, Hyatt DR, Dargatz DA. 'Comparison of Salmonella enterica serotype Infantis isolates from a veterinary teaching hospital. J Appl Microbiol. 2007; 102(6):1527-1536.

15.Gal-Mor O, Valinsky L, Weinberger M, Guy S, Jaffe J, Schorr YI, Raisfeld A, Agmon V, Nissan I. Multidrug-resistant Salmonella enterica serovar Infantis, Israel', Emerging infectious diseases. 2010; 16(11): 1754-1757.

16.Long M, Yu H, Chen L, Wu G, Zhao S, Deng W, Chen Sh, Zhou K, Liu Sh, He L, Ao X, Yubao Yan Y, Ma M, Wang H, A. Davis M, Lisa Jones L, Bei Li B, Zhang A, Zou L. Recovery ofSalmonella isolated from eggs and the commercial layer farms. Gut Pathogens. 2017; 9(74): 1-9.

17.Ranjbar R, Sarshar M, Sadeghifard N. Characterization of Genetic Diversity among Clinical Strains of Salmonella enterica Serovar Infantis by Ribotyping Method Journal of Advances in Medical and Biomedical Research. J Adv Med Biomed Res. 2012; 20(81): 75-84.

18.Rahmani M, Peighambari SM, Svendsen CA, Cavaco LM, Agersø Y, Hendriksen RS. Molecular clonality and antimicrobial resistance in Salmonella enterica serovars Enteritidis and Infantis from broilers in three Northern regions of Iran. BMC Vet Res. 2013; 9(66): 1-9.

19.Emaddi Chashni SH., Hassanzadeh M, Bozorgmehri Fard MH, Mirzaie S. Characterization of the Salmonella isolates from backyard chickens in north of Iran, by serotyping, multiplex PCR and antibiotic resistance analysis. Archives of Razi Institute. 2009; 64(2): 77-83.

20.Dougnon Tamègnon Victorien, Bankolé Honoré Sourou, Houmanou Gildas, de Souza Muriel and Baba-Moussa Lamine. Review on the problematic of Salmonellosis and interests of traditional herbs in the treatment. Clinical Microbiology. 2016; 5(3): 1-4.

21.Krawiec M, Kuczkowski M, Kruszewicz AG, Wieliczko A. Prevalence and genetic characteristics of Salmonella in free-living birds in Poland. BMC Vet Res. 2015; 11(15): 1-10.
Lee KM, Runyon M, Herrman TJ, Phillips R, Hsieh J. Review of Salmonella detection and identification methods: aspects of rapid emergency response and food safety. Food Control. 2015; 47: 264-276.

22.Rowlands REG, Ristori CA, A Ikuno A, Barbosa ML, Jakabi M, Franko BDG. Prevalence of drug resistance and virulence features in Salmonella spp. isolated from foods associated or not with salmonellosis in Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 2014; 56(6): 461-467,

23.Pan TM, Liu YJ. Identification of Salmonella enteritidis isolates by polymerase chain reaction and multiplex polymerase chain reaction. J Microbiol Immunol Infect. 2002; 35(3): 147-151.

24.Ling, JM. Rapid detection of food-borne pathogens in clinical specimens, food and environmental samples. Hong Kong Med J. 2009; 15(2): 26-29.

25.Arjmand-Asl M, Amini K. Molecular identification of virulence genes in clinical Salmonella typhimurium strains using the multiplex-PCR method and their antibiotic resistance profile. KAUMS Journal. 2016; 20(4): 376-382.

26.Amini K, Zahraei Salehi T, Nikbakht G, Ranjbar R, Amini J, Ashrafganjooei Sh. Molecular detection of invA and spv virulence genes in Salmonella enteritidis isolated from human and animals in Iran. African Journal of Microbiology Research. 2010; 4(21): 2202-2210.

27.Barilli E, Bacci C, StellaVilla Z, Merialdi G, D'Incau M, Brindani F, Vismarra A. Antimicrobial resistance, biofilm synthesis and virulence genes in Salmonella isolated from pigs bred on intensive farms. Ital J food saf. 2018; 7(2):7223.

28.Lan TTQ, Gaucher ML, Nhan NTM, Letellier A, Quessy S. Distribution of Virulence Genes among Salmonella Serotypes Isolated from Pigs in Southern Vietnam. J Food Prot. 2018; 81(9):1459-1466.