

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 مهربان^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

پذیرش برای چاپ: بهمن نود و هشت

دریافت مقاله: دی 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 ژن های 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 سروتاایپینگ، 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 *int* و *invA* 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

باشند(۱). سالمونلا انتریکا سرووار اینتریتیدیس، تیفی موریوم و اینفنتیس از مهم ترین عوامل مسمومیت های غذایی در انسان و حیوانات در جهان به شمار می روند. این میکروارگانیسم یکی از شایع ترین پاتوژن های قابل انتقال از حیوانات به انسان می باشد. گاستروانتریت شایع ترین و متداول ترین عفونت سالمونلایی است که توسط این سروتیپ ها ایجاد می گردد. سالمونلوزیس از دیگر بیماری های ناشی باکتری سالمونلاست و از طریق مصرف مواد

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 انتروباکتریاسه، 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 لاکتوز، سوکروز و *ONPG* منفی همچنین دارای واکنش اندول منفی، اوره منفی، *VP* منفی و متیل رد (*MR*) مثبت می

انتشار و مستقر شدن باکتری در بدن میزبان (انسان و حیوان) و اختلال در سلامت جامعه به اثبات رسیده است (۱۰). حضور 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 آغازگر توانایی از دیداد و شناسایی چندین ژن توأمأ 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 میکروبی 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 آنگوشت راپاپورت واسیلیادیس کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای $37^{\circ}C$ 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 (*MRVP, SIM, اندول, H₂S* و حرکت)، تخمیر قندها، اوره از، لیزین دکربوکسیلاز، سیمون سترات 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

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 آن ها نسبت به آنتی بیوتیک ها 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 در آزمایشگاه 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 و مشترک بین انسان و دام است. در حال حاضر بیش از ۲۰۰۰ سرووار 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 اپیدمیولوژی این بیماری پیدا کرده است که معمولاً تشخیص و شناسایی آن ها 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 اپیتلیال روده میزبان لازم است کد می کند (۹). ژن *intI* که آنزیم اینتگرز را کد می کند. این اینتگرز 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, spvCR* و *spvD* می باشد. نقش این اپرون در ایجاد حدت و مقاومت دارویی،

هم زمان استفاده شد. به منظور تکثیر سه ژن ویروالانس 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 $P < 0/05$ به عنوان شاخص آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

پلی والان و مونو والان (شرکت *Mast* انگلستان)، جهت تعیین سروتیپ انجام گردید. برای شناسایی ژن های (*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 ویروالانس (*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

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق

نام ژن	توالی پرایمر (5' → 3')	محصول PCR	رفرنس
<i>int</i>	F- GCCCTCCCGCACGATGAT R- ATGGCGGCCTTGCTGTTCTTCTA	۲۶۵	۱۱
<i>invA</i>	F- CGCGGCCCGATTTTCTCTGGA R- AATGCGGGGATCTGGGCGACAAG	۳۲۱	۱۱
<i>spvC</i>	F- GGGGCGGAAATACCATCTACA R- GCGCCAGGCTAACACG	۳۹۲	۱۱

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

حجم (μl)	مواد واکنش PCR
۱۰	Master mix (2X)
۰/۸ (۳)	پرایمر چپ (10 pmol/μl)
۰/۸ (۳)	پرایمر راست (10 pmol/μl)
۴	نمونه DNA
۶/۲	اب مقطر دو بار تقطیر شده
۲۵	حجم کل

جدول ۳- شرایط به کار رفته جهت انجام واکنش PCR

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

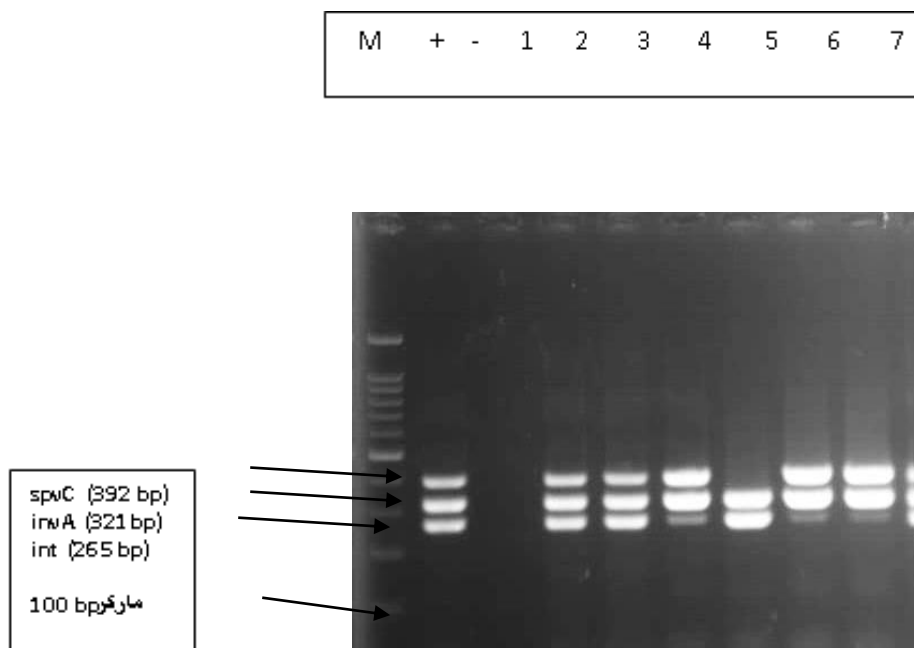
یافته ها

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) جمع آوری گردید. پس از انجام تست های تشخیصی تعداد ۶۰ نمونه به عنوان سالمونلا شناسایی شد. نتایج رنگ آمیزی 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 روش های بیوشیمیایی شناسایی شده بودند، با آزمایش سروتایپینگ مورد بررسی قرار گرفتند. تعداد ۳۰ ایزوله سروتیپ اینفنتیس (۵۰٪) شناسایی شدند.

۴- نتایج تست های بیوشیمیایی برای شناسایی سالمونلاها

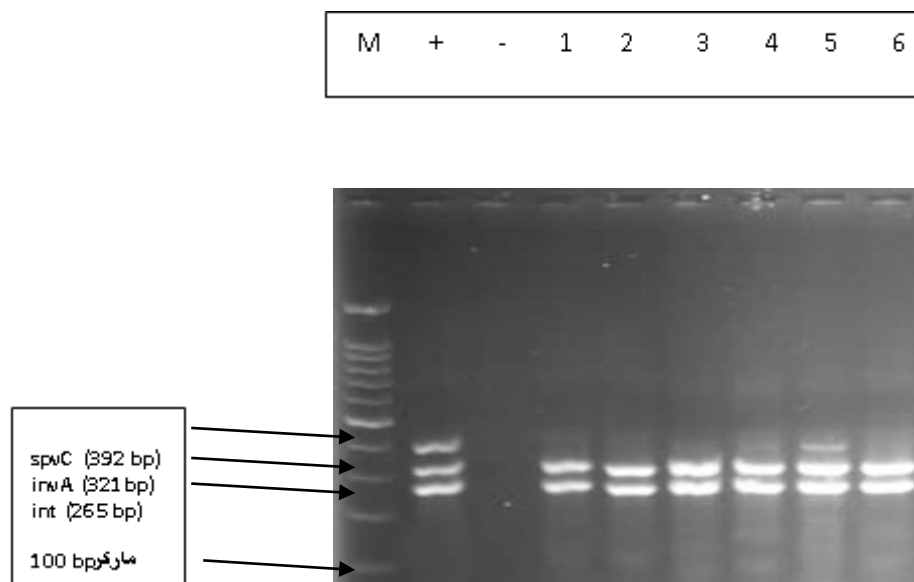
نام تست	سالمونلا تیفی موریوم	سالمونلا اینفنتیس
رنگ آمیزی گرم	گرم منفی	گرم منفی
مک کانکی آگار	+	+
حرکت	+	+
تولید H ₂ S	+	+
تست TSI	+	+
لیزین دکربوکسیلاز	+	+
اوره از	-	-
تست MR	+	+
تست VP	-	-
تخمیر گلوکز	+	+
تخمیر لاکتوز	-	-
سیمون سترات	+	+

نتایج محصولات **Multiplex PCR** که بر روی نمونه های سالمونلا تیفی موریوم و سالمونلا اینفنتیس انجام شده است پس از الکتروفورز روی ژل آگاروز یک درصد و عکسبرداری با ژل داگ بررسی شد (شکل ۱ و 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 سویه های سالمونلاتیفی موریوم با روش Multiplex PCR .

خانه M: مارکر مولکولی (100 bp)؛ خانه +: نمونه کنترل مثبت (از سویه های دارای هر سه ژن *spvC* , *invA* , *int*)؛ خانه -: نمونه کنترل منفی (آب مقطر)؛ خانه های شماره ۱، ۲، ۳، ۵، ۶ و ۷: نمونه های دارای حضور هر سه ژن *spvC* (392bp) ، *invA* (321bp) و *int* (265bp)؛ خانه های شماره ۴: نمونه دارای حضور ژن *invA* (321bp) و *int* (265bp).



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

خانه M: مارکر مولکولی (100 bp)؛ خانه +: نمونه کنترل مثبت (از سویه های دارای هر سه ژن *spvC* , *invA* , *int*)؛ خانه -: نمونه کنترل منفی (آب مقطر)؛ خانه های شماره ۱، ۲، ۳، ۴ و ۶: نمونه های دارای حضور دو ژن *invA* (321bp) و *int* (265bp)؛ خانه شماره ۵: نمونه دارای حضور هر سه ژن *spvC* (392bp) ، *invA* (321bp) و *int* (265bp).

بصورت همزمان بودند. تمام سویه ها دارای دو ژن *int* و *invA* به طور همزمان بودند (جدول ۶).

نتایج نشان داد ۹۳/۳٪ از جدایه های تیفی موریوم و ۶/۶٪ از جدایه های 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 سروتایپ های اینفنتیس جداسازی شده همه ژن های حدت مورد بررسی را دارا بوده و تعداد ۳۰ مورد از آن ها *int* و *invA* را دارا می باشند. همچنین تعداد ۲۸ مورد از سروتایپ های تیفی موریوم جداسازی شده دارای هر سه ژن بصورت همزمان بودند و ۳۰ ایزوله از آنها دارای ژن های *int* و *invA*

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

سروتایپ	فراوانی ژن های حدت			
	<i>int , invA</i>	<i>int , spvC</i>	<i>invA , spvC</i>	<i>int , invA , spvC</i>
تیفی موریوم	۳۰	۲۸	۲۸	۲۸
اینفنتیس	۳۰	۲	۲	۲
کل	۶۰	۳۰	۳۰	۳۰

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 *int* , *invA* , *spvC* 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 آن در سروتایپ های اینفنتیس و تیفی موریوم به ترتیب ۷٪ و ۹۴٪ بود. با توجه به شیوع صد در صدی ژن های *int* و *invA* در ایزوله های مورد بررسی به نظر می رسد که این ژن ها در بیماریزایی سروتایپ های مختلف سالمونلا حائز اهمیت باشند. همچنین ژن *spvC* در سروتایپ تیفی موریوم نسبت به اینفنتیس دارای شیوع بیشتری بود که ممکن است نشان دهنده نقش برجسته تر این ژن در ویروانس 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 می باشند و آب و مواد غذایی آلوده به این باکتری، از دلایل اصلی ابتلا به بیماری در انسان است. این میکروارگانیسم ها می توانند از محیط های آبی به طور مستقیم با مدفوع انسان و یا حیوانات در تماس باشند و یا به طور غیرمستقیم از طریق فاضلاب و یا زمین های کشاورزی باعث آلودگی گردند. در کشورهای صنعتی، سالمونلا انتریکا سرووار انتریدیتیس و تیفی موریوم از عوامل اصلی عفونت های سالمونلاهای غیرتیفوئیدی به شمار می روند. با این وجود، گزارشات منتشر شده در برخی از کشورها، از

نتایج حاصل از تحلیل های آماری صورت گرفته با استفاده از آزمون کای دو نشان داد که دو متغیر *spvC* و نوع باکتری ارتباط معناداری در سطح اطمینان ۹۵ درصد با هم دارند ($P < 0.05$). همچنین حضور سه ژن (*int,inv,spv (vir)*) در باکتری سالمونلا تیفی موریوم دارای ارتباط معنی داری نبودند ($P = 0.129$)، و حضور سه ژن (*int,inv,spv (vir)*) در باکتری سالمونلا اینفنتیس دارای ارتباط معنی داری بودند ($P < 0.01$). بین حضور همزمان سه ژن (*int,inv,spv (vir)*) در دو باکتری سالمونلا تیفی موریوم و باکتری سالمونلا اینفنتیس ارتباط معنی دار وجود نداشت ($P = 0.69$).

بحث

گسترش ژن های بیماریزا به یک مشکل مهم در درمان عفونت های حاصل از باکتری های بیماریزا تبدیل شده است. ژن های ویروانس در سالمونلا شناسایی شده است که هر یک به صورت جداگانه در DNA کروموزومی، باکتریوفازی و پلاسمیدی باکتری قرار دارند. این جزایر بیماریزا در نواحی بزرگی از DNA ژنومی سویه های بیماریزا قرار دارند، سویه های غیر بیماریزا فاقد این ژن ها 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 باکتریوفازها 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

جمله مجارستان و استرالیا حاکی از انتشار بالای سرووارهای اینفنتیس در سال های اخیر، نسبت به گذشته می باشد (۱۲ و ۱۳). به طور مثال، در سال های ۲۰۰۵ و ۲۰۰۶، عفونت های سالمونلوز باعث حدود ۸ الی ۹ هزار مورد بیماری در مجارستان گردید. شایع ترین سروتیپ ها، 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 سرووارها و مسئول حدود ۵ درصد از بیماری های ایجاد شده است (۱۴). نتایج مطالعات گال مور و همکاران در سال ۲۰۱۰ در فلسطین اشغالی نشان می دهد 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 بیمارستان ها، عمدتاً در بین کودکان مشاهده می گردد، با این وجود در بزرگسالان گاهی اوقات با علائم سپتی سمی و کشنده نیز ظاهر می گردد. پایداری طولانی مدت در شرایط محیطی بیمارستانی، از ویژگی های بارز سالمونلا سروتیپ اینفنتیس می باشد (۱۶). در ایران نیز شیوع این سرووار در سال های اخیر در حال افزایش است. چنانچه در مطالعه ی 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 سرووار 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 سروتیپ های سالمونلا، سروتیپ انتریتیدیس، تیفی موریوم و اینفنتیس از شیوع بیشتر در میان سروتیپ 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 بیماری های 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 و تخم مرغ آلوده و یا فرارده های تخم مرغ ونیم پز می باشد. تیفی موریوم شایع ترین سروتیپ گزارش شده از مرکز کنترل بیماری ها می باشد. تخمین زده شده سالیانه ۹۳/۸٪ از سالمونلازیس غیرتیفوئید در سراسر جهان رخ می دهد (۲۱). مطالعات گسترده تر روی جدایه های سالمونلا و تعیین عوامل خطر، بررسی مولکولی و تعیین بیماریزایی جدایه های ایرانی و تعیین تأثیرات اقتصادی عفونت های ناشی از سالمونلا، از جمله مواردی است که باید به آن توجه شود. در مقایسه تحقیق حاضر با تحقیقات انجام شده فوق مشخص می شود که در نمونه های مطالعه حاضر که با روش سروتایپینگ و روش های بیوشیمیایی جداسازی انجام شده، ۸٪ نمونه ها سالمونلا بودند که ۵۰٪ آن ها سالمونلا تیفی موریوم و ۵۰٪ بقیه سالمونلا اینفنتیس بودند. در سال ۲۰۱۴ در برزیل روولندز و همکاران، تعداد ۲۳۷ گونه سالمونلای مرتبط و غیر مرتبط با سالمونلوزیس منتقله از طریق مواد غذایی در برزیل را که تماماً متعلق به سروتیپ انتریتیدیس بودند را هدف مطالعه قرار دادند؛ تمامی سویه ها از نظر حضور ژن *invA* مثبت بودند و فراوانی ژن *spvC*، ۴۸/۱ درصد بود (۲۲). فراوانی ژن *spvC* برای تیفی موریوم مطالعه حاضر مشابه مطالعه انجام شده توسط Pan و همکاران در تایوان بود. آن محققین گزارش نمودند که از ۲۸ جدایه سالمونلا تحت مطالعه، فقط ۲ جدایه فاقد ژن *spvC* 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 سرووار که طی سال های 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 *spvC* بودند (۲۴). در مطالعه ارجمند و همکاران حضور ژن های *spvC* 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* و *invA* در سالمونلا انتریتیدیس استفاده کردند. آنالیز نمونه ها نشان داد که ژن های *spvC* و *spvB* و *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

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 عفونت های انسانی بخصوص در اطفال و افراد مسن را به خود اختصاص می دهد 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 سروتایپ 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 باکتری های 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 آزمایشگاه 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

دارای ژن های ssaR و spvC بود و یک سویه دارای همه ژن های ویروالانس 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 ژن های 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 سویه ها، از نظر حضور حداقل ۲ مورد از این ژن ها 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

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-Estevéz 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 Phymurium. *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 of Salmonella 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.