



## Identification and assessment of *Salmonella typhimurium*, *infantis* and *enteritidis* serotypes in clinical samples from medical centers of Kerman province

Abolfazl Moghadam<sup>1</sup>, Shahram Nazarian<sup>2</sup>, Jafar Amani<sup>3</sup>

1. Department of Biology, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran
2. Department of Biology, Faculty of Science, Imam Hossein University, Tehran, Iran
3. Applied Microbiology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

### Article Information

#### Article history:

Received: 2016/09/14

Accepted: 2016/12/26

Available online: 2017/06/07

#### Article Subject:

Medical Bacteriology

IJMM 2017; 11(2): 01-08

#### Corresponding author:

Dr. Shahram Nazarian

Department of Biology,  
Faculty of Science, Imam  
Hossain University, Tehran,  
Iran

Tel: 0982177104934

#### Email:

[nazarian56@gmail.com](mailto:nazarian56@gmail.com)

[kpnazari@ihu.ac.ir](mailto:kpnazari@ihu.ac.ir)

### Abstract

**Background and Aims:** Salmonellosis is one of the important infectious diseases and can be as spread disease between humans and animals that make it essential for identification and detection of Salmonella. Housekeeping genes are typically important genes which are necessary for maintenance and survival of basic cells and can be considered as a gene diagnostic screening bacterial agents. The aim of this study was analysis of *Flic*, *SdfI* and *FliJ*, housekeeping genes for screening of *typhimurium*, *infantis* and *enteritidis* serovars isolated in Kerman's hospitals.

**Materials and Methods:** In a descriptive study from February 2015 to August 2015, 132 *Salmonella* specimens were taken from patients with acute gastroenteritis referred to different medical centers and hospitals in Kerman. The specimens were transferred to microbiology laboratory for identification of *Salmonella* with serological and bacteriological standard methods. DNA of *Salmonella* genus strains were extracted by CTAB and, specific primers of housekeeping genes of *Salmonella* genus (*invA*) and *typhimurium*(*fliC*), *infantis*(*fliJ*) and, *enteritidis*(*sdfI*) serotypes are used in PCR test.

**Results:** Using PCR technique, the presence of *Salmonella* genus were confirmed by amplification of *invA* gene in 130 out of 132 specimens which are identified as a *Salmonella* by microbiological and biochemical methods (98%). Also results indicating the prevalence of 19% in *infantis*, 22% in *Salmonella typhimurium* and 32% in *Salmonella enteritidis*.

**Conclusions:** Results showed that the prevalence of *Salmonella enteritidis* is more than any other serotypes in this region, but as the global statistics, the prevalence of *typhimurium* and *Infantis* are increasing.

**KeyWords:** Housekeeping genes, PCR, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella infantis*, *Salmonella enteritidis*

Copyright © 2017 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

### How to cite this article:

Moghadam A, Nazarian S, Amani J. Identification and assessment of *Salmonella typhimurium*, *Infantis* and *enteritidis* serotypes in clinical samples from medical centers of Kerman province. Iran J Med Microbiol. 2017; 11 (2):01-08



Farname Inc.

## شناسایی و بررسی سروتیپ های سالمونلا تیفی موریوم، اینفنتیس و انتریتیدیس در نمونه های بالینی از مراکز درمانی سطح استان کرمان

ابوالفضل مقدم<sup>۱</sup>، شهرام نظریان<sup>۲</sup>، جعفر امانی<sup>۳</sup>

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۲. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه امام حسین (ع)، تهران، ایران
۳. مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)، تهران، ایران

### چکیده

### اطلاعات مقاله

**زمینه و اهداف:** سالمونلوزیس یکی از بیماری های مهم عفونی و به عنوان یک بیماری مشترک در انسان و حیوانات می باشد که اهمیت شناخت و کنترل این گونه را ضروری تر می کند. ژن های خانه دار، ژن هایی هستند که به طور معمول برای حفظ و بقای عملکرد سلول ها ضروری می باشند و می توانند به عنوان ژن های تشخیصی در غربالگری عوامل باکتریایی مدنظر قرار گیرند. هدف از این مطالعه بررسی ژن های خانه دار *sdfI*، *fliB* و *fliC* برای غربالگری سرووارهای تیفی موریوم، انتریتیدیس و اینفنتیس سالمونلا می باشد.

**مواد و روش کار:** در یک مطالعه توصیفی از بهمن ماه سال ۱۳۹۲ تا مردادماه سال ۱۳۹۴، ۱۳۲ نمونه از بیماران مبتلا به اسهال و استفراغ حاد مراجعه کننده به مراکز درمانی و بیمارستان های مختلف کرمان گرفته شد. نمونه ها برای شناسایی سالمونلا با روش های استاندارد سرولوژی و باکتریولوژی به آزمایشگاه میکروبیولوژی منتقل شدند. DNA سویه های جنس سالمونلا به روش CTAB استخراج و در آزمون PCR از پرایمرهای اختصاصی ژن های خانه دار جنس سالمونلا (*invA*) و سروتیپ های تیفی موریوم (*fliC*)، اینفنتیس (*fliB*) و انتریتیدیس (*sdfI*) استفاده گردید.

**یافته ها:** با استفاده از روش PCR حضور جنس سالمونلا با تکثیر ژن *invA* در ۱۳۰ نمونه از ۱۳۲ نمونه تأیید شده سالمونلا با روش های میکروبی و تست های بیوشیمیایی (۹۸ درصد) تأیید گردید. همچنین نتایج نشان دهنده شیوع ۱۹ درصدی سالمونلا اینفنتیس، ۲۲ درصدی سالمونلا تیفی موریوم و ۲۲ درصدی سالمونلا انتریتیدیس بود.

**نتیجه گیری:** نتایج حاکی از این بود که در این منطقه شیوع سالمونلا انتریتیدیس نسبت به سایر سرووارها بیشتر است، اما شیوع سالمونلا تیفی موریوم و اینفنتیس همانند آمارهای جهانی در حال افزایش می باشند.

**کلمات کلیدی:** ژن های خانه دار، PCR، سالمونلا تیفی موریوم، سالمونلا انتریتیدیس، سالمونلا اینفنتیس

کپی رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروبی شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

تاریخچه مقاله  
دریافت: ۱۳۹۵/۰۶/۲۴  
پذیرش: ۱۳۹۵/۱۰/۰۶  
انتشار آنلاین: ۱۳۹۶/۰۳/۱۷  
موضوع:

باکتری شناسی پزشکی

IJMM 1396; 11(2): 01-08

نویسنده مسئول:

دکتر شهرام نظریان

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه امام حسین (ع)، تهران، ایران

تلفن: ۰۹۸۲۱۷۷۱۰۴۹۲۴

پست الکترونیک:

[nazarian56@gmail.com](mailto:nazarian56@gmail.com)

[kpnazari@ihu.ac.ir](mailto:kpnazari@ihu.ac.ir)

### مقدمه

حیوانات محسوب می شوند (۱). در ایران نیز گزارش های متعددی از اپیدمی های مربوط به سرووارهای انتریتیدیس، تیفی موریوم و اینفنتیس انتشار یافته است (۲). به گزارش سازمان بهداشت جهانی، سالیانه بالغ بر ۱۶ تا ۳۳ میلیون مورد بیمار و ۵۰۰ تا ۶۰۰ هزار مرگ ناشی از سالمونلا اتفاق می افتد که این مسئله به عنوان یک معضل بزرگ بهداشتی در کشورهای در حال توسعه از جمله کشور ما می باشد (۳). از سوی دیگر وجود حاملین چه در انسان و چه در حیوانات جایگاه ویژه ای در اپیدمیولوژی این

باکتری سالمونلا یکی از اعضای خانواده *انتروباکتریاسه* است که به صورت باسیل های گرم منفی هستند و اکثر سروتیپ های آن توانایی حرکت را دارند. این جنس به صورت هوازی یا بی هوازی اختیاری است و بهترین شرایط رشد آن دمای ۳۷ درجه سلسیوس می باشد. گونه های سالمونلا به عنوان یکی از مهم ترین آلوده کننده های مواد غذایی و گاستروانتریت در انسان به شمار می آیند. در جنس سالمونلا بیش از ۲۶۰۰ سروتیپ وجود دارد که بسیاری از این سرووارها پاتوژن های مهمی برای انسان ها و

می‌نماید. ژن *fliC* استفاده شده در تحقیق از ژن‌های رمز کننده تاژک مرحله اول یکی از ژن‌های بسیار حراست شده می‌باشد که می‌توان از آن در جهت تأیید *سالمونلا تیفی* موریوم با اطمینان کامل بهره برد (۱۰).

Agron و همکاران در سال ۲۰۰۱ قطعه ژنی که تنها در سویه‌های *سالمونلا انتریتیدیس* مشاهده می‌شد را بررسی کرده و آن را *sdf* (Salmonella difference fragment) نامیدند. این قطعه ژنی به طول ۳۰۴ جفت باز برای شناسایی اختصاصی *سالمونلا انتریتیدیس* با روش PCR و بر روی سرووارهای مختلف *سالمونلا* استفاده گردید که اختصاصیت بالای این قطعه ژنی را برای شناسایی *سالمونلا انتریتیدیس* نشان داد (۱۱).

ژن *fljB* در سال ۲۰۰۷ توسط Kardos و همکاران به منظور شناسایی *سالمونلا اینفنتیس* و با استفاده از روش PCR به کار گرفته شد. شناسایی بر اساس ژن هدف *fljB* به صورت اختصاصی عملکرد داشت. ژن *fljB* رمز کننده تاژک مرحله دوم است و بسیار حفاظت شده است (۱۲).

هدف از این مطالعه جداسازی و شناسایی سروتیپ‌های *سالمونلا* از مراکز درمانی سطح استان کرمان به منظور بررسی شیوع آن‌ها می‌باشد که علاوه بر روش‌های کشت میکروبی از روش PCR (به کمک بررسی ژن‌های خانه‌دار) نیز جهت تأیید جنس و نوع سروتیپ استفاده گردید.

#### مواد و روش‌ها

##### ایزوله‌های باکتریایی

در یک مطالعه توصیفی از بهمن‌ماه سال ۱۳۹۳ تا مردادماه سال ۱۳۹۴، ۱۳۲ نمونه از بیماران مبتلا به اسهال و استفراغ حاد مراجعه کننده به مراکز درمانی و بیمارستان‌های مختلف کرمان گرفته شد. نمونه‌ها برای شناسایی *سالمونلا* با روش‌های استاندارد سرولوژی و باکتریولوژی در محیط Rappaport Vassiliadis (مرک آلمان) در مجاورت یخ به آزمایشگاه میکروبیولوژی منتقل شدند. کشت اولیه و افتراقی بر روی نمونه‌ها در محیط‌های انتخابی مانند *سالمونلا-شیگلا* (SS) آگار، بیسموت سولفیت آگار انتقال و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند. با تست‌های بیوشیمیایی و محیط‌های افتراقی مانند TSI، MR-VP، لیزین آیرون آگار، سیمون سترات و اوره (مرک آلمان)، کلنی‌های مشکوک به *سالمونلا* جداسازی و پس از انجام آزمون‌های افتراقی مذکور، آزمون‌های سروتایپینگ با

بیماری پیدا کرده است که معمولاً تشخیص و شناسایی آن‌ها با روش معمول آزمایشگاهی مشکل می‌باشد.

در ایران دومین عامل ایجادکننده اسهال در انسان پس از *شیگلا* باکتری *سالمونلا* می‌باشد (۴). در مقابل، شیوع آن در محل پرورش حیوانات باعث از دست رفتن تولیدات دامی، مرگ‌ومیر، افزایش ضررهای اقتصادی می‌باشد. جهت جلوگیری از انتشار می‌بایست بیماری خیلی سریع تشخیص داده شود. روش‌هایی مانند بیوتایپینگ، سروتایپینگ و فازتایپینگ اغلب زمان‌بر، غیراقتصادی، غیرقابل اعتماد می‌باشد و در بررسی‌های اپیدیمیولوژیکی وسیع این روش‌ها ناتوان می‌باشند، لذا به روش‌های دقیق‌تر و سریع‌تر در این زمینه نیاز است. با استفاده از ژن‌های خانه‌دار که ژن‌های ضروری در متابولیسم و فعالیت سلول می‌باشد و به دلیل تولید پروتئین که برای بقا و عمل کرد ضروری است می‌توان از آن‌ها با استفاده از تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلی مرز (PCR) به تشخیص و جداسازی سویه‌های *سالمونلا* پرداخت (۴). روش PCR از حساسیت و ویژگی بالایی برای شناسایی عوامل عفونی برخوردار است.

بر طبق آمار سازمان بهداشت جهانی از سال ۱۹۹۰ *سالمونلا انتریکا* سرووار تیفی موریوم به‌عنوان شایع‌ترین عامل گاستروانتریت *سالمونلا* در سرتاسر جهان مطرح شد (۵). در طی موارد گزارش شده، سروتیپ‌های *سالمونلا انتریتیدیس* و *اینفنتیس* از عوامل شیوع ۹۰ درصد از عفونت‌های سالمونلوزیس می‌باشند که سروتایپ *اینفنتیس* از سرووارهای شایع بروز این بیماری به‌ویژه در میان کودکان است. همچنین گزارش‌ها به‌دست‌آمده در سال‌های اخیر نشان‌دهنده افزایش ناگهانی *سالمونلا* های غیر تیفوئیدی در برخی از کشورهای آسیایی و اروپایی است (۶).

ژن *invA* شامل توالی منحصربه‌فردی مخصوص جنس *سالمونلا* است و اثبات شده است که هدف بسیار مناسبی برای PCR به‌منظور شناسایی جنس *سالمونلا* است (۷). تکثیر این ژن اکنون به‌عنوان یک استاندارد جهانی به‌منظور تشخیص جنس *سالمونلا* شناخته شده است (۸). این ژن کد کننده یک پروتئین درون غشایی است که مسئول تهاجم به سلول‌های اپیتلیال میزبان می‌باشد (۹).

Oliveira و همکاران در سال ۲۰۰۲ از ژن *fliC* برای شناسایی *سالمونلا تیفی* موریوم استفاده نمودند و مشاهده کردند که این ژن برای شناسایی این *سالمونلا* کاملاً اختصاصی عمل

طبق بررسی‌های به‌عمل‌آمده و مرور مطالعات انجام‌شده قبلی توسط سایر محققین، جفت پرایمرهای اختصاصی برای شناسایی جنس سالمونلا و هر یک از سالمونلاهای انتریتیدیس، تیفی موریوم و اینفنتیس انتخاب گردید (جدول ۱). جهت اطمینان از عملکرد پرایمرهای مورد استفاده، با استفاده از نرم‌افزار Oligo 5 (ساخت آمریکا، کلرادو) برخی ویژگی‌های پرایمرها مانند میزان GC، دمای Tm، احتمال تشکیل لوب و جفت‌شدگی بررسی شد. پرایمرها توسط شرکت سینا کلون سنتز گردید.

آنتی سرم های O و H انجام پذیرفت (۱۳). واکنش آگلوتیناسیون به‌عنوان واکنش مثبت ثبت شد، سپس با استفاده از روش‌های استاندارد باکتریولوژیک، باکتری‌ها در محیط LB براث کشت داده شدند.

## استخراج DNA

به‌منظور استخراج DNA از روش CTAB استفاده شد (۱۴).

## واکنش PCR

جدول شماره ۱: مشخصات پرایمرهای استفاده‌شده

منبع	دمای اتصال	طول قطعه (bp)	توالی پرایمر	ژن هدف	باکتری هدف
(۷)	۶۰	۲۸۵	F:GTGAAATTATCGCCACGTTTCGGCAA R:TCATCGCACCGTCAAAGGAACC	<i>InvA</i>	<i>Salmonella. spp</i>
(۱۶،۱۵)	۶۰	۵۵۹	F:CGGTGTTGCCAGGTTGGTAAT R:ACTCTTGCTGCGGTTGCGACTT	<i>Flic</i>	<i>S. typhimorium</i>
(۱۷،۱۱)	۵۶	۳۰۴	F:TGTGTTTTATCTGATGCAAGAGG R:TGAACACTACGTTTCGTTCTTCTGG	<i>SdfI</i>	<i>S. enteritidis</i>
(۱۲)	۵۶	۷۳۴	F: AACAACGACAGCTTATGCCG R: CCACCTGCGCCAACGCT	<i>fljB</i>	<i>S. infantis</i>

گردید، سپس بارنگ اتیدیوم برماید رنگ‌آمیزی و درنهایت زیر نور ماورای بنفش موردبررسی قرار گرفت.

جهت بررسی اختصاصیت روش تشخیصی مورد استفاده در این تحقیق واکنش PCR بر روی باکتری اشریشیا کلی (ATCC 10536) به‌عنوان کنترل منفی انجام شد و بر روی باکتری سالمونلا تیفی موریوم (ATCC 14028) و باکتری سالمونلا انتریتیدیس (ATCC 13076) و باکتری سالمونلا اینفنتیس (ATCC 51741) به‌عنوان کنترل مثبت انجام شد.

جهت بررسی حد نهایی تشخیص آزمون مورد استفاده در این تحقیق، PCR با تعداد واحد سازنده کلنی مشخص (CFU) از باکتری استاندارد استفاده شد و رقت‌های سری از آن تهیه گردید.

## یافته‌ها

در مجموع ۱۱۲۵ نمونه مدفوع افراد مبتلا به گاستروانتریت و اسهال از مراکز درمانی سطح استان کرمان جمع‌آوری گردید، ۱۳۲ نمونه مشکوک به جنس سالمونلا از طریق روش‌های میکروبی و بیوشیمیایی در این مراکز شناسایی شد، ژنوم باکتری‌ها به روش CTAB جداسازی و تخلیص گردید. اختصاصیت واکنش تکثیری با استفاده از باکتری اشریشیا کلی به‌عنوان کنترل منفی بررسی شد و هیچ قطعه ژنی با اندازه

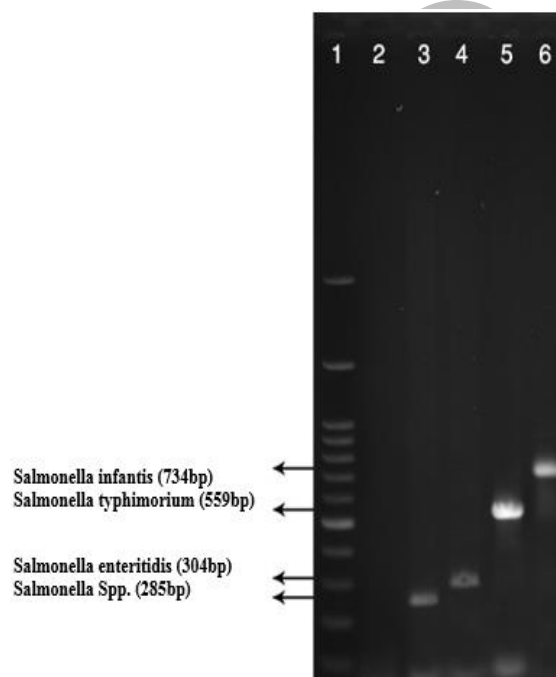
به‌منظور بهینه‌سازی روش PCR، مقادیر و غلظت‌های مختلف Mgcl2، dNTPs و DNA ژنومی و همچنین دماهای مختلف برای مرحله اتصال پرایمرها موردبررسی قرار گرفتند. درنهایت واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل بافر PCR (10X) ۲ میکرولیتر، dNTPs ۰/۲ میلی مول، پرایمرها هرکدام ۰/۵ میکرومول و ۱ واحد آنزیم Taq پلی مراز، ۲ میلی مول Mgcl2، DNA الگو ۱۵۰ نانوگرم و آب مقطر استریل ۱۰/۵ میکرولیتر راه‌اندازی گردید.

واکنش PCR به‌صورت تکی (Single PCR) با ۳۵ سیکل شامل مرحله واسرشت در درجه حرارت ۹۵ درجه سلسیوس و ۴۰ ثانیه، مرحله اتصال پرایمر در درجه حرارت ۵۶ درجه سلسیوس برای پرایمرهای اختصاصی سالمونلا اینفنتیس و انتریتیدیس و ۶۰ درجه سلسیوس برای پرایمرهای اختصاصی سالمونلا تیفی موریوم و جنس سالمونلا و مدت‌زمان ۴۵ ثانیه، مرحله تکثیر در درجه حرارت ۷۲ درجه سلسیوس و مدت‌زمان ۱ دقیقه انجام شد. در انتها نیز مرحله تکثیر نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس انجام شد. ۶ میکرولیتر محصول PCR به همراه ۱ میکرولیتر بافر نمونه‌گذاری الکتروفورز (6X) مخلوط گردید و بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد ساخته‌شده با بافر TAE 1X، به مدت ۴۰ دقیقه با ولتاژ ۱۲۰ ولت الکتروفورز

سرروار انتریتیدیس و تیفی موریوم نسبت به سایر سرروارها بیشتر و از سوی دیگر شیوع سرروار انتریتیدیس در حال کاهش می‌باشد که نتایج تحقیق حاضر نیز با بررسی‌های انجام‌شده در گزارش‌های توسط Lin و Pan تطابق دارد (۱۸۰۲۰). در مطالعات مختلف روش‌های متفاوتی را برای تشخیص سالمونلا مورد استفاده قرار داده‌اند که از جمله این‌ها روش‌های مبتنی بر کشت و بررسی‌های بیوشیمیایی است. روش‌های کشت میکروبی و بررسی‌های بیوشیمیایی بسیار وقت‌گیر بوده و برای بررسی تعداد زیاد نمونه‌ها چندان مطلوب نیستند. در سال ۲۰۰۵ در ایران طی تحقیقی که توسط Jafari و همکاران انجام شد، نتایج کشت نمونه‌های مدفوع مرغ‌های خانگی حاکی از وجود ۱۱ درصد سالمونلا انتریتیدیس و ۱۸ درصد سالمونلا تیفی موریوم در نمونه‌ها بود (۲۱). که برخلاف نتایج پژوهش حاضر سالمونلا تیفی موریوم شیوع بالاتری نسبت به سالمونلا انتریتیدیس داشته است. در پژوهشی در سال ۲۰۰۱ که توسط Mehrabian و همکاران در سطح شهر تهران انجام شد، ۲۰۰ نمونه تخم‌مرغ، پوسته تخم‌مرغ، گوشت مرغ و گوشت قرمز از نظر آلودگی به سالمونلا به وسیله کشت و روش‌های شیمیایی مورد بررسی قرار گرفتند که میزان آلودگی به سالمونلا انتریتیدیس ۴۰ درصد و سالمونلا تیفی موریوم ۱۰ درصد گزارش شد (۲۲). در سال ۲۰۰۲ در تایوان تشخیص سالمونلا انتریتیدیس بر روی نمونه‌های بالینی به روش PCR صورت گرفت که در این تحقیق ۲۷ سروتیپ سالمونلا مورد بررسی قرار گرفتند که سالمونلا انتریتیدیس جزء ۳ سویه شایع در ایجاد بیماری بود (۲۰). نتایج پژوهش حاضر هم نیز نشان‌دهنده شیوع بالای سالمونلا انتریتیدیس نسبت به سایر سرروارها بود. همچنین در پژوهشی که در سال ۲۰۱۴ در هند بر روی نمونه‌های بالینی خون و مدفوع انجام شد شیوع ۵۷ درصدی سالمونلا تیفی موریوم و ۱۶ درصدی سالمونلا انتریتیدیس را نشان داد که شیوع سالمونلا انتریتیدیس با پژوهش حاضر همخوانی ندارد که می‌توان به علت موقعیت جغرافیایی متفاوت و یا سایر عوامل مؤثر در اپیدمی این باکتری باشد (۲۳). Soria و همکاران در سال ۲۰۱۲ با مقایسه روش تشخیصی کشت و PCR به منظور شناسایی سالمونلا نشان دادند که دقت روش PCR دقیق‌تر از روش‌های کشت می‌باشد (۲۴). همچنین در ایران Soltan Dallal و همکاران در سال ۱۳۹۰ پژوهشی بر روی مقایسه تکنیک PCR و سایر روش‌های روتین در تشخیص سالمونلا انجام دادند که نتایج نشان‌دهنده دقت بسیار بالای روش PCR نسبت به سایر روش‌های تشخیصی بود

موردنظر تکثیر نگردید. (شکل ۱). حد نهایی تشخیص آزمون به‌گونه‌ای بود که شناسایی ۱۰۰ سلول باکتری امکان‌پذیر بود.

توسط روش PCR تعداد ۱۳۰ ایزوله جنس سالمونلا با طول باند ۲۸۵bp (۰/۹۸)، تعداد ۴۳ ایزوله سالمونلا انتریکا سرروار انتریتیدیس با طول باند ۳۰۴bp (۰/۳۲)، تعداد ۲۹ ایزوله سالمونلا انتریکا سرروار تیفی موریوم با طول باند ۵۵۹bp (۰/۲۲) و ۲۶ ایزوله سالمونلا انتریکا سرروار اینفنتیس با طول باند ۷۳۴bp (۰/۱۹) شناسایی گردید.



شکل ۱: تصویر ژل الکتروفورز محصولات واکنش PCR. ردیف ۱ مارکر (100bp DNA ladder)، ردیف‌های ۲ تا ۶ به ترتیب اشریشیاکلی (ATCC 10536)، جنس سالمونلا، سالمونلا انتریتیدیس، تیفی موریوم و اینفنتیس

#### بحث

سالمونلا یکی از خطرناک‌ترین بیماری‌های مشترک میان انسان و حیوانات است. سروتایپ‌های سالمونلا جزء رایج‌ترین سروتایپ در اکثر نقاط جهان از جمله ایران است. بیماری‌های سالمونلا عموماً از طریق مرغ و تخم‌مرغ به انسان منتقل می‌شوند. سالمونلا در انسان باعث تورم معده و روده، اسهال خونی، استفراغ، سردرد، بی‌حالی و در نهایت زمین‌گیری می‌شود (۱۸). عفونت با باکتری سالمونلا پس از خوردن غذاهایی نظیر گوشت، مرغ، شیر تازه یا تخم‌مرغ خام یا آشامیدن آب آلوده به باکتری ایجاد می‌شود (۱۹). بر طبق گزارش‌های موجود میزان شیوع دو



همکاران در سال ۱۳۹۱ روی سالمونلاهای گروه C جداسازی شده از موارد انسانی مشخص شده است که از مجموع ۱۳۸ نمونه مشکوک به وجود سالمونلا، ۴۰ جدایه (۲۸٪) جز سرووار سالمونلا/اینفنتیس بودند که توسط روش ERIC-PCR تنوع ژنتیکی آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت (۲۸). Rahmani از سال ۲۰۰۷ تا سال ۲۰۱۱، ۳۶ نمونه سالمونلا از جوجه‌های گوشی سه منطقه در شمال کشور جمع‌آوری نمود که ۷۵٪ جدایه‌ها سالمونلا/اینفنتیس و ۲۵ درصد سالمونلا/انتریتیدیس بودند (۲۹). در پژوهش حاضر شیوع سالمونلا/اینفنتیس با استفاده از روش PCR ۱۹٪ گزارش شد که با نتایج Rahmani تفاوت زیادی را نشان می‌دهد که یکی از احتمالات این تفاوت می‌تواند نمونه‌های متفاوت (انسانی و طیور) در این دو پژوهش باشد.

با توجه به شیوع عفونت‌های سالمونلایی در دهه‌های اخیر، دانشمندان نسبت به احتمال وقوع همه‌گیری‌های جهانی آن بیمناک شده‌اند. به همین دلیل محققین به دنبال ابداع روش‌هایی برای شناسایی سریع و به موقع سالمونلا در مواد غذایی هستند و معرفی روش‌های جدید مولکولی امیدهایی را در جهت نیل به این هدف به وجود آورده است. از جمله یکی از این روش‌های جدید ردیابی قطعات ژنومی باکتری با روش PCR است که محققین در طی ارزیابی‌های خود به سرعت و دقت بالای روش‌های جدید نسبت به روش قدیمی میکروبیولوژی اشاره دارند (۳۰،۳۱). در این پژوهش همچنین به دقت بالای روش PCR پی بردیم که در مقایسه با روش روتین کشت نتیجه دقیق‌تری گرفته شد.

#### تقدیر و تشکر

بدین وسیله از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه امام حسین (ع) و همچنین گروه پژوهشی میکروبی‌شناسی پاسارگاد به دلیل حمایت‌های خود سپاسگزاری می‌گردد.

#### تعارض منافع

بین نویسندگان و مجله میکروبی‌شناسی پزشکی ایران هیچ‌گونه تعارض منافی وجود ندارد.

(۲۵). بر این اساس در پژوهش حاضر برخلاف پژوهش Mehrabian و همکاران از روش PCR استفاده شد. در این پژوهش در طراحی روش آزمایش، از روش Multiplex PCR استفاده نشد، هرچند که این روش می‌تواند مدت‌زمان انجام آزمایش را کوتاه‌تر کند، اما احتمال کاهش برخی ویژگی‌ها از جمله حساسیت روش تشخیصی نیز وجود دارد. در سال ۲۰۰۲ در تایوان تشخیص سالمونلا/انتریتیدیس به وسیله PCR انجام شد که در این تحقیق ۲۷ سروتیپ سالمونلا مورد بررسی قرار گرفتند که سالمونلا/انتریتیدیس جزء ۳ سویه شایع در ایجاد بیماری بود، در این پژوهش مشخص گردید که حساسیت Multiplex PCR کمتر از PCR می‌باشد بنابراین در پژوهش حاضر از روش PCR Single استفاده شد تا نتایج دقیق‌تری حاصل شود (۲۰). در پژوهش حاضر سعی بر این بوده است که از روش‌هایی استفاده شود که درصد خطای تشخیص را به کمترین حالت خود برساند بنابراین از روش Single PCR و همچنین از ژن‌هایی با اختصاصیت بالا برای هر سرووار سالمونلا استفاده گردید که نتایج مؤید شیوع ۳۲ درصدی سالمونلا/انتریتیدیس و ۲۲ درصدی سالمونلا/اینفنتیس در نمونه‌های انسانی بود که مطابق آمارهای جهانی نشان‌دهنده شیوع بالای سالمونلا/انتریتیدیس در میان سایر سرووارهای سالمونلا می‌باشد.

همان‌طور که در نتایج مشاهده گردید از ۱۳۲ نمونه مشکوک به سالمونلا که در مراکز درمانی به وسیله تست‌های بیوشیمیایی تشخیص داده شده بود با روش PCR ۱۳۰ نمونه به‌عنوان سالمونلا تأیید شدند بقیه آن سوش‌ها احتمالاً یکی از سایر جنس‌های مشابه مانند پروتئوس، سیتروباکتر و ادواردسیلا بودند، به‌عبارت‌دیگر دو باکتری دیگر دارای وجه تشابه تشخیص با سالمونلا هستند که اگر گالری کاملی در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی نباشد احتمال خطا در تشخیص سالمونلا وجود دارد.

پژوهش‌های سازمان EFSA (European Food Safety Authority) اروپا نشان‌دهنده این است که سالمونلا/انتریتیدیس و سالمونلا/اینفنتیس عمدتاً در طیور تخم‌گذار و گوشتی اروپا دیده می‌شوند (۲۶،۲۷). در ایران شیوع سالمونلا/اینفنتیس در سال‌های اخیر در حال افزایش است. در مطالعه Ranjbar و

## References

- Su LH, Chiu CH. *Salmonella*: clinical importance and evolution of nomenclature. *Chang Gung Med J* 2007; 30(3):210-9.
- Soltan Dallal MM, Sharifi Yazdi M, Mirzaei N, Kalantar E. Prevalence of *Salmonella* spp. in Packed and Unpacked Red Meat and Chicken in South of Tehran. *Jundishapur J Microbiol* 2014;7(4):562-8.[in persian]
- Nosrat S, Sabokbar A, Dezfoolian M, Tabarraie B, Fallah F. Prevalence of *Salmonella enteritidis*, typhi and typhimurium from food products in Mofid hospital. *Res Med* 2012;36(1):43-8. [in persian]
- Silver N, Best S, Jiang J, Thein S. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC Mol Biol* 2006;7(1):33.
- Miller Ma, Sentz J, Rabaa Ma, Mintz Ed. Global epidemiology of infections due to *Shigella*, *Salmonella* serotype Typhi, and enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Epidemiol Infect* 2008;136(04): 433-5.
- Gonera E. Salmonellosis in 1997. *Przegl Epidemiol* 1999; 53(1-2):83-91.
- Rahn K, De Grandis SA, Clarke RC, McEwen SA, Galán JE, Ginocchio C, et al. Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Mol Cell Probes* 1992; 6(4):271-9.
- Malorny B, Hoorfar J, Bunge C, Helmuth R. Multicenter validation of the analytical accuracy of *Salmonella* PCR: towards an international standard. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69(1):290-6.
- Darwin KH, Miller VL. Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12(3):405-28.
- Oliveira SD, Santos LR, Schuch DMT, Silva AB, Salle CTP, Canal CW. Detection and identification of salmonellas from poultry-related samples by PCR. *Vet Microbiol* 2002; 87(1):25-35.
- Agron PG, Walker RL, Kinde H, Sawyer SJ, Hayes DC, Wollard J, et al. Identification by subtractive hybridization of sequences specific for *Salmonella enterica* serovar *enteritidis*. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67(11):4984-91.
- Kardos G, Farkas T, Antal M, Nógrády N, Kiss I. Novel PCR assay for identification of *Salmonella enterica* serovar *Infantis*. *Lett Appl Microbiol* 2007; 45(4):421-5.
- Eshraghi S, Soltan Dalall M, Fardsanei F, Zahraii Salehi T, Ranjbar R, Nikmanesh B. *Salmonella enteritidis* and antibiotic resistance patterns: A study on 1950 children with diarrhea. *Tehran Univ Med J* 2010; 67(12):876-82. [in persian]
- Wang TY, Wang L, Zhang JH, Dong WH. A simplified universal genomic DNA extraction protocol suitable for PCR. *Genet Mol Res* 2011; 10(1):519-25.
- Jamshidi A, Bassami M., Afshari-Nic S. Identification of *Salmonella* spp. and *Salmonella typhimurium* by a multiplex PCR-based assay from poultry carcasses in Mashhad- Iran. *IntJVetRes* 2009; 3(1):43-8.
- Lim Y-H, Hirose K, Izumiya H, Arakawa E, Takahashi H, Terajima J, et al. Multiplex polymerase chain reaction assay for selective detection of *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*. *Jpn J Infect Dis* 2003; 56(4):151-5.
- de Freitas CG, Santana AP, da Silva PHC, Gonçalves VSP, Barros M de AF, Torres FAG, et al. PCR multiplex for detection of *Salmonella Enteritidis*, *typhi* and *typhimurium* and occurrence in poultry meat. *Int J Food Microbiol* 2010; 139(1-2):15-22.
- Lin JS, Tsen HY. Development and use of polymerase chain reaction for the specific detection of *Salmonella typhimurium* in stool and food samples. *J Food Prot* 1999; 62(10):1103-10.
- Adak GK. Trends in indigenous foodborne disease and deaths, England and Wales: 1992 to 2000. *Gut* 2002; 51(6):832-41.
- 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):147-51.
- Jafari RA, Ghorbanpour M, Jaideri A. An Investigation into *Salmonella* Infection Status in Backyard Chickens in Iran. *Int J Poult Sci* 2007; 6(3):227-9. [in persian]
- Mehrabyan S, Rafiee Tabatabaei R, Hajiyan A. Study of type and drug resistance in *salmonella* isolated from foods. *J Sci* 2001; 1:193-9. [in persian]
- Jinu M, Agarwal RK, Sailo B, Wani MA, Kumar A, Dhama K, et al. Comparison of PCR and Conventional Cultural Method for Detection of *Salmonella* from Poultry Blood and Faeces. *Asian J Anim Vet Adv* 2014; 9(11):690-701.

24. Soria MC, Soria MA, Bueno DJ. Comparison of 2 culture methods and PCR assays for *Salmonella* detection in poultry feces. *Poult Sci.* 2012; 91(3):616–26.
25. Soltan Dallal M, Rahimi Forushani A, Sadigh Maroufi S, Sharifi Yazdi K. The comparison of PCR technique and API-20E kit with the conventional biomedical methods for the identification of *Salmonella* species in laboratory. *mljgoums* 2011; 5(2):20–7. [in persian]
26. Report of the Task Force on Zoonoses Data Collection on the Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in broiler flocks of *Gallus gallus*, in the EU, 2005-2006 - Part A: *Salmonella* prevalence estimates. *EFSA J* 2007; 5(3):98.
27. Gal-Mor O, Valinsky L, Weinberger M, Guy S, Jaffe J, Schorr YI, et al. Multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar *Infantis*, Israel. *Emerg Infect Dis* 2010; 16(11):1754–7.
28. Ranjbar R, Sarshar M, Sadeghifard N, AWT\_TAG. Characterization of Genetic Diversity among Clinical Strains of *Salmonella enterica* Serovar *Infantis* by Ribotyping Method. *ZUMS J* 2012; 20(81):75-84. [in persian]
29. 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(1):66
30. Ward MP, Alinovi CA, Couëtil LL, Wu CC. Evaluation of a PCR to detect *Salmonella* in fecal samples of horses admitted to a veterinary teaching hospital. *J Vet Diagn Invest* 2005; 17(2):118–23.
31. Trkov M, Majerikova I, Jerasek B, Stefanovicova A, Rijpens N, Kuchta T. Detection of *Salmonella* in food over 30 h using enrichment and polymerase chain reaction. *Food Microbiol* 1999; 16:393–9.