Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 11, Number 2 (May - June)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Farname Inc.

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

Abolfazl Moghadam[1], Shahram Nazarian[2], Jafar Amani[3]

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

Downloaded from ijmm.ir at 4:28 +0430 on Saturday August 19th 2017

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
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*, *Sdf1* and *FljB*, 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(fljB)* 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.

Final proof

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

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۱ – شماره ۲ – خرداد و تیر ۱۳۹۶

Journal homepage: www.ijmm.ir

Farname Inc.

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

ابوالفضل مقدم[۱]، شهرام نظریان[۲]، جعفر امانی[۳]

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

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۵/۰۶/۲۴

پذیرش: ۱۳۹۵/۱۰/۰۶

انتشار آنلاین: ۱۳۹۶/۰۳/۱۷

موضوع:

باکتری‌شناسی 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: ۰۹۸۲۱۷۷۱۰۴۹۳۴

پست الکترونیک:

nazarian56@gmail.com
kpnazari@ihu.ac.ir

چکیده

زمینه و اهداف: سالمونلوزیس یکی از بیماری‌های مهم عفونی و به‌عنوان یک بیماری مشترک در انسان و حیوانات می‌باشد که اهمیت شناخت و کنترل این‌گونه را ضروری‌تر می‌کند. ژن‌های خانه‌دار، ژن‌هایی هستند که به‌طورمعمول برای حفظ و بقای عملکرد سلول‌ها ضروری می‌باشند و می‌توانند به‌عنوان ژن‌های تشخیصی در غربالگری عوامل باکتریایی مدنظر قرار گیرند. هدف از این مطالعه بررسی ژن‌های خانه‌دار *sdf1, fliC* و *fljB* برای غربالگری سرووارهای *تیفی موریوم*، *انتریتیدیس* و *اینفنتیس* سالمونلا می‌باشد.

مواد و روش کار: در یک مطالعه توصیفی از بهمن‌ماه سال ۱۳۹۳ تا مردادماه سال ۱۳۹٤، ۱۳۲ نمونه از بیماران مبتلابه اسهال و استفراغ حاد مراجعه‌کننده به مراکز درمانی و بیمارستان‌های مختلف کرمان گرفته شد. نمونه‌ها برای شناسایی *سالمونلا* با روش‌های استاندارد سرولوژی و باکتریولوژی به آزمایشگاه میکروبیولوژی منتقل شدند. DNA سویه‌های جنس *سالمونلا* به روش CTAB استخراج و در آزمون PCR از پرایمرهای اختصاصی ژن‌های خانه‌دار جنس *سالمونلا* (*invA*) و سروتیپ های *تیفی موریوم* (*fliC*)، *اینفنتیس* (*fljB*) و *انتریتیدیس* (*sdfI*) استفاده گردید.

یافته‌ها: با استفاده از روش PCR حضور جنس *سالمونلا* با تکثیر ژن *invA* در ۱۳۰ نمونه از ۱۳۲ نمونه تأییدشده سالمونلا با روش‌های میکروبی و تست‌های بیوشیمیایی (۹۸ درصد) تأیید گردید. همچنین نتایج نشان‌دهنده شیوع ۱۹ درصدی *سالمونلا اینفنتیس*، ۲۲ درصدی *سالمونلا تیفی موریوم* و ۳۲ درصدی *سالمونلا انتریتیدیس* بود.

نتیجه‌گیری: نتایج حاکی از این بود که در این منطقه شیوع *سالمونلا انترتیدیس* نسبت به سایر سرووارها بیشتر است، اما شیوع *سالمونلا تیفی موریوم* و *اینفنتیس* همانند آمارهای جهانی در حال افزایش می‌باشند.

کلمات کلیدی: ژن‌های خانه‌دار، PCR، *سالمونلا تیفی موریوم*، *سالمونلا انتریتیدیس*، *سالمونلا اینفنتیس*

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

Downloaded from ijmm.ir at 4:28 +0430 on Saturday August 19th 2017

مقدمه

باکتری *سالمونلا* یکی از اعضای خانواده *انتروباکتریاسه* است که به‌صورت باسیل‌های گرم منفی هستند و اکثر سروتیپ های آن توانایی حرکت رادارند. این جنس به‌صورت هوازی یا بی‌هوازی اختیاری است و بهترین شرایط رشد آن دمای ۳۷ درجه سلسیوس می‌باشد. گونه‌های *سالمونلا* به‌عنوان یکی از مهم‌ترین آلوده‌کننده‌های مواد غذایی و گاستروانتریت در انسان به شمار می‌آیند. در جنس *سالمونلا* بیش از ۲۶۰۰ سروتیپ وجود دارد که بسیاری از این سرووارها پاتوژن های مهمی برای انسان‌ها و حیوانات محسوب می‌شوند (۱). در ایران نیز گزارش‌های متعددی از اپیدمی‌های مربوط به سرووارهای *انتریتیدیس*، *تیفی موریوم* و *اینفنتیس* انتشاریافته 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 می‌افتد که این مسئله به‌عنوان یک معضل بزرگ بهداشتی در کشورهای درحال‌توسعه ازجمله کشور ما می‌باشد (۳). از سوی دیگر وجود حاملین چه در انسان و چه در حیوانات جایگاه ویژه‌ای در اپیدمیولوژی این

بیماری پیداکرده 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 فاژتایپینگ اغلب زمان‌بر، غیراقتصادی، غیرقابل‌اعتماد 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 مراز (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 سالمونلایی در سرتاسر جهان مطرح شد (۵). در طی موارد گزارش‌شده، سروتیپ های *سالمونلا انتریتیدیس* و *اینفنتیس* از عوامل شیوع ۹۰ درصد از عفونت‌های سالمونلوزیس می‌باشند که سروتایپ *اینفنتیس* از سروارهای 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 اثبات‌شده 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* شناخته‌شده 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 می‌نماید. ژن *fliC* استفاده‌شده در تحقیق از ژن‌های رمز کننده تاژک مرحله اوّل 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 به‌منظور شناسایی *سالمونلا اینفنتیس* و با استفاده از روشPCR به کار گرفته شد. شناسایی بر اساس ژن هدف *fljB* به‌صورت اختصاصی عملکرد داشت. ژن *fljB* رمز کننده تاژک مرحله دوم است و بسیار حفاظت‌شده است (۱۲).

هدف از این مطالعه جداسازی و شناسایی سروتیپ های *سالمونلا* از مراکز درمانی سطح استان کرمان به منظور بررسی شیوع آن‌ها می باشدکه 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 مراجعه‌کننده 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 سیترات و اوره (مرک آلمان)، کلنی‌های مشکوک به سالمونلا جداسازی و پس از انجام آزمون‌های افتراقی مذکور، آزمون‌های سروتایپینگ با

Downloaded from ijmm.ir at 4:28 +0430 on Saturday August 19th 2017

Final Proof

Downloaded from ijmm.ir at 4:28 +0430 on Saturday August 19th 2017

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

طبق بررسی‌های به‌عمل‌آمده و مرور مطالعات انجام‌شده قبلی توسط سایر محققین، جفت پرایمر های اختصاصی برای شناسایی جنس *سالمونلا* و هر یک از *سالمونلا های انتریتیدیس*، *تیفی موریوم* و *اینفنتیس* انتخاب گردید (جدول ۱). جهت اطمینان از عملکرد پرایمرهای مورداستفاده، 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.

جدول شماره ۱: مشخصات پرایمر های استفاده‌شده

باکتری هدف	ژن هدف	توالی پرایمر	طول قطعه (bp)	دمای اتصال	منبع
Salmonella. spp	*InvA*	F:GTGAAATTATCGCCACGTTCGGGCAA R:TCATCGCACCGTCAAAGGAACC	۲۸۵	۶۰	(۷)
S. typhimorium	*Flic*	F:CGGTGTTGCCCAGGTTGGTAAT R:ACTCTTGCTGGCGGTGCGACTT	۵۵۹	۶۰	(۱۶،۱۵)
S. enteritidis	*Sdf I*	F:TGTGTTTTATCTGATGCAAGAGG R:TGAACTACGTTCGTTCTTCTGG	۳۰۴	۵۶	(۱۷،۱۱)
S. infantis	*fljB*	F: AACAACGACAGCTTATGCCG R: CCACCTGCGCCAACGCT	۷۳۴	۵۶	(۱۲)

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، ۰/۲dNTPs میلی مول، پرایمر ها 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 نمونه گذاری 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 گردید، سپس بارنگ اتیدیوم برماید رنگ‌آمیزی و درنهایت زیر نور ماورای بنفش موردبررسی قرار گرفت.

جهت بررسی اختصاصیت روش تشخیصی مورداستفاده 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 مورداستفاده در این تحقیق، PCRبا تعداد واحد سازنده کلنی مشخص (CFU) از باکتری استاندارد استفاده شد و رقت‌های سری از آن تهیه گردید.

یافته‌ها

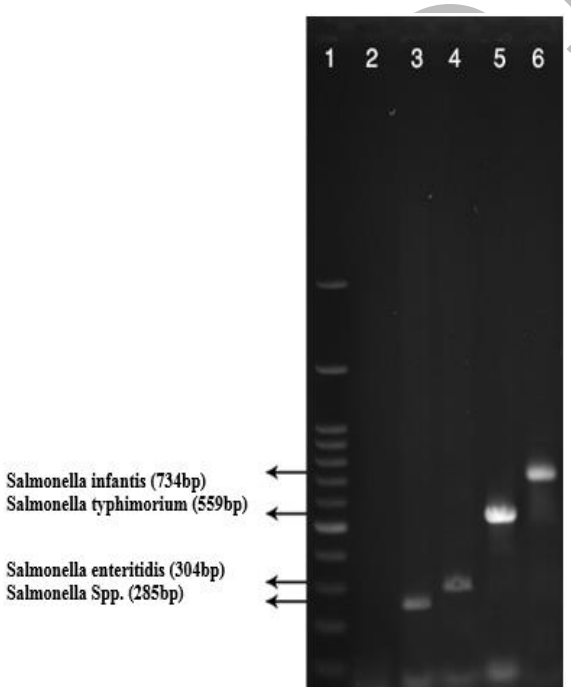
درمجموع ۱۱۲۵ نمونه مدفوع افراد مبتلابه گاستروانتریت و اسهال از مراکز درمانی سطح استان کرمان جمع‌آوری گردید، ۱۳۲ نمونه مشکوک به جنس *سالمونلا* از طریق روش‌های میکروبی و بیوشیمیایی در این مراکز شناسایی شد، ژنوم باکتری‌ها به روش CTAB جداسازی و تخلیص گردید. اختصاصیت واکنش تکثیری با استفاده از باکتری اشریشیاکلی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

Final Proof

Downloaded from ijmm.ir at 4:28 +0430 on Saturday August 19th 2017

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 (۹۸٪)، تعداد ۴۳ ایزوله *سالمونلا انتریکا* سرووار *انتریتیدیس* با طول باند ۳۰۴bp (۳۲٪)، تعداد ۲۹ ایزوله *سالمونلا انتریکا* سرووار *تیفی موریوم* با طول باند ۵۵۹bp (۲۲٪) و ۲۶ ایزوله *سالمونلا انتریک* اسرووار *اینفنتیس* با طول باند ۷۳۴bp (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. سروتایپ های *سالمونلا* جزء رایج‌ترین سروتایپ در اکثر نقاط جهان ازجمله 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 درنهایت 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 سرووار *انتریتیدیس* و *تیفی موریوم* نسبت به سایر سروارها بیشتر و از سوی دیگر شیوع سرووار *انتریتیدیس* در حال کاهش می‌باشد که نتایج تحقیق حاضر نیز با بررسی‌های انجام‌شده در گزارش‌های توسط Lin و Pan تطابق دارد (۱۸،۲۰). در مطالعات مختلف روش‌های متفاوتی را برای تشخیص *سالمونلا* مورداستفاده قرار داده‌اند که ازجمله این‌ها روش‌های مبتنی برکشت و بررسی‌های بیوشیمایی است. روش‌های کشت میکروبی و بررسی‌های بیوشیمایی 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 ازنظر آلودگی به *سالمونلا* به‌وسیله کشت و روش‌های شیمیایی موردبررسی 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 سروار ها 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 به‌منظور 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 نسب به سایر روش‌های تشخیصی بود

(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 ازجمله حساسیت روش تشخیصی نیز وجود دارد. در سال ۲۰۰۲ در تایوان تشخیص *سالمونلا انتریتیدیس* به‌وسیله PCR انجام شد که در این تحقیق ۲۷ سروتیپ *سالمونلا* موردبررسی 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 سروارهای *سالمونلا* می‌باشد.

همان‌طور که در نتایج مشاهده گردید از ۱۳۲ نمونه مشکوک به سالمونلا که در مراکز درمانی به‌وسیله تست‌های بیوشیمیایی تشخیص داده‌شده بود با روش PCR ۱۳۰ نمونه به‌عنوان *سالمونلا* تأیید شدند بقیه آن سوش ها 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 همکاران در سال ۱۳۹۱ روی سالمونلاهای گروه C جداشده از موارد انسانی مشخص‌شده 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 موردبررسی 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٪ جدایه ها *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. ازجمله یکی از این روش‌های جدید ردیابی قطعات ژنومی باکتری با روش PCR است که محققین در طی ارزیابی‌های خود به‌سرعت و دقت بالای روش‌های جدید نسبت به روش قدیمی میکروبیولوژی اشاره دارند (۳۰،۳۱). در این پژوهش همچنین به‌دقت بالای روش PCR پی بردیم که در مقایسه با روش روتین کشت نتیجه دقیق‌تری گرفته شد.

تقدیر و تشکر

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

تعارض منافع

بین نویسندگان و مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

Downloaded from ijmm.ir at 4:28 +0430 on Saturday August 19th 2017

Final Proof

Downloaded from ijmm.ir at 4:28 +0430 on Saturday August 19th 2017

References

1. Su LH, Chiu CH. *Salmonella*: clinical importance and evolution of nomenclature. Chang Gung Med J 2007; 30(3):210–9.
2. 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]
3. 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]
4. 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.
5. 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.
6. Gonera E. Salmonellosis in 1997. Przegl Epidemiol 1999; 53(1-2):83–91.
7. 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.
8. 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.
9. Darwin KH, Miller VL. Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. Clin Microbiol Rev 1999; 12(3):405–28.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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]
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. Adak GK. Trends in indigenous foodborne disease and deaths, England and Wales: 1992 to 2000. Gut. 2002; 51(6):832–41.
20. 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.
21. 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]
22. 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]
23. 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.

Final Proof

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.

Downloaded from ijmm.ir at 4:28 +0430 on Saturday August 19th 2017

Final Proof