Original Article

Molecular identification of virulence genes in clinical *Salmonella typhimurium* strains using the multiplex- PCR method and their antibiotic resistance profile

Arjmand-Asl M[1], Amini K[2*]

Department of Microbiology, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, I. R. Iran.

Received December 28, 2015; Accepted September 6, 2016

Abstract:

Background: *Salmonella* as an enteric, gram negative, facultative anaerobic, obligate parasite causes food poisoning in human. The aim of present study was to identify the virulence genes *stn*, *sopB*, *slyA*, *spvc* and *Phop/Q* in *Salmonella typhimurium* strains isolated from clinical specimens using multiplex PCR method and also the determination of their antibiotic resistance profile.

Material and methods: In this cross-sectional study during a 12 month period (April to March 2015) a total of 60 *Salmonella typhimurium* isolates were collected from Shariati hospital (Tehran, Iran). After the identification of strains, the antimicrobial susceptibility test was done using the disk diffusion agar test on Müller-Hinton agar media according to the Clinical and laboratory standards institute (CLSI) guidelines. Then the presence of virulence genes (e.g. *stn*, *sopB*, *slyA*, *spvc* and *Phop/Q*) were identified using multiplex PCR method.

Results: These findings obtained from isolates showed the highest sensitivity to the Imipenem, Gentamicin, and Trimethoprim antibiotics . Distribution analysis of virulence for genes *slyA*, *stn*, *sopb*, *Phop*/*Q* showed the frequency of 23.3%, 30%, 3.33%5 and 43.3%, respectively. The *spvC* gene is not seen in any isolates.

Conclusion: The results of this study indicate that the prevalence of virulence genes in clinical *Salmonella Typhimurium* isolates can serve as an alarm for the prevalence of these genes to the other *Salmonella* serotypes. As the *Salmonella* virulence genes are located on the *Salmonella* pathogenicity islands, so the high prevalence of these genes can help to the dissemination of islands among the *Salmonella* strains.

Keywords: *Salmonella Typhimurium*, Virulence genes, Multiplex-PCR

* **Corresponding Author.**
Email: dr_kumarss_amini@yahoo.com
Tel: 0098 912 545 4074
Fax: 0098 21 448 50954

Conflict of Interests: ***No***

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, October, 2016; Vol. 20, No 4, Pages 376-382

Please cite this article as: 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. ***Feyz*** 2016; 20(4): 376-82.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-08-07]

شناسایی مولکولی ژن‌های ویرولانس در سویه‌های بالینی *سالمونلا تیفی‌موریوم* به‌روش Multiplex-PCR و تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی آنها

محمد ارجمند اصل [۱]، کیومرث امینی [۲*]

خلاصه:

سابقه و هدف: سالمونلا یک ارگانیسم روده‌ای گرم منفی است که عامل ایجاد بیماری و بروز مسمومیت‌های غذایی در انسان می‌باشد. هدف از مطالعه حاضر شناسایی ژن‌های *Stn*، *sopB*، *slyA*، *spvc* و *Phop/Q* در سویه‌های *سالمونلا تیفی‌موریوم* جدا شده از نمونه‌های بالینی به روش Multiplex PCR و تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه توصیفی-مقطعی و در یک بازه زمانی ۱۲ ماهه از ابتدای فروردین لغایت پایان اسفند ۱۳۹۴، تعداد ۶۰ جدایه بالینی *سالمونلا تیفی‌موریوم* از بیمارستان شریعتی تهران جمع‌آوری شد. پس از تایید سویه‌ها با استفاده از تست‌های استاندارد بیوشیمیایی و میکروبیولوژیکی، آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی روی محیط مولر هینتون آگار و بر اساس استاندارد (CLSI) انجام گردید. آزمون multiplex-PCR جهت تشخیص ژن‌های حدت با استفاده از آغازگرهای اختصاصی انجام شد.

نتایج: نتایج آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی نشان داد که تمامی ایزوله‌ها دارای حساسیت به ایمی‌پنم، جنتامایسین و تری‌متوپریم بودند. هم‌چنین، یافته‌های مولکولی در خصوص فراوانی ژن‌های *slyA*، *Stn*، *sopB*، *Phop/Q* به‌ترتیب برابر ۲۳/۳، ۳۰، ۳/۳۳ و ۴۳/۳ درصد گزارش گردید، درحالی‌که ژن *spvC* در جدایه‌های *سالمونلا تیفی‌موریوم* مشاهده نگردید.

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه حاضر حاکی از شیوع ژن‌های ویرولانس در سویه‌های بالینی *سالمونلا تیفی‌موریوم* می‌باشد که می‌تواند به‌عنوان زنگ خطری برای انتشار این ژن‌ها به دیگر سروتیپ‌های سالمونلا باشد. ازآنجایی‌که ژن‌های ویرولانس سالمونلاها روی جزایر بیماری‌زایی سالمونلا (SPI) قرار دارند، شیوع بالای این ژن‌ها می‌تواند به انتشار این جزایر در بین سویه‌های سالمونلا کمک کند.

واژگان کلیدی: *سالمونلا تیفی‌موریوم*، ژن‌های ویرولانس، مقاومت آنتی بیوتیکی

دو ماه‌نامه علمی- پژوهشی فیض، دوره بیستم، شماره ۴، مهر و آبان ۱۳۹۵، صفحات ۳۸۲-۳۷۶

مقدمه

جنس سالمونلا متعلق به خانواده انتروباکتریاسه بوده و تاکنون بالغ بر ۲۷۰۰ گونه مختلف از این باکتری در نقاط مختلف دنیا شناسایی شده است. باکتری‌های این جنس کوکوباسیل کوتاه، گرم منفی و به اندازه ۴/۵-۲ میکرون هستند [۱]. سالمونلاها فاقد کپسول‌اند و اغلب دارای تاژک پیرامونی (به استثنا *سالمونلا گالیناروم* و *سالمونلا پولوروم*) بوده و پیلی‌دار می‌باشند [۲]. *سالمونلا تیفی‌موریوم* یکی از سه سروار با اهمیت این جنس در جهان است. آلودگی سالمونلایی در انسان به‌صورت مسمومیت غذایی، گاسترو-انتریت، تب تیفوئید و گاهی سپتی‌سمی بروز می‌کند [۳].

سروارهای سالمونلا گسترش جهانی داشته و بسیاری از پستانداران، پرندگان و خزندگان را مبتلا می‌سازند. سالمونلاها ممکن است در آب، خاک، غذای حیوانات، گوشت، مدفوع و سبزیجات حضور داشته باشند. از عوامل بیماری‌زایی سالمونلا می‌توان به زنده ماندن این باکتری‌ها درون ماکروفاژها اشاره کرد [۱]. این باکتری در روده قادر به تولید انتروتوکسین و سیتوتوکسین‌هایی می‌باشد که برای سلول‌های انسان آسیب‌زا هستند [۴]. سالمونلا پس از ورود به معده می‌تواند وارد سلول‌های M واقع در پلاک‌های پیر در بخش انتهایی روده کوچک شده و این سلول را مورد تهاجم قرار دهد [۲]. اکثر فاکتورهای ویرولانس باکتری سالمونلا توسط سیستم ترشحی تیپ III کد می‌شود [۵]. چهار پروتئین اصلیSIP (A، B، C و D) توسط یک اپران پلی‌سیسترونیک منفرد کد می‌شوند که در مجاورت لوکوس inv/spa قرار گرفته است [۴]. از مهم‌ترین عوامل حدت، ژن‌های پلاسمید حدت یا spv می‌باشند. این اپرون واجد پنج ژن *spvR*, *spvA*, *spvB*, *spvC*, *spvD* بوده که در باکتری سالمونلا بسیار حراست شده می‌باشند. شواهد اپیدمیولوژی بر این عقیده است که اپرون spv برای

[۱] دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران

[۲] استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران

* **نشانی نویسنده مسئول:**

گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی ساوه

تلفن: ۰۹۱۲۵۴۵۴۰۷۴ **دورنویس:** ۰۲۱ ۴۴۸۵۰۹۵۴

پست الکترونیک: dr_kumarss_amini@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۰/۷ **تاریخ پذیرش نهایی:** ۹۵/۶/۱۶

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-08-07]

بیماری‌زایی خارج روده‌ای ایجاد عفونت عمومی توسط سروارهای غیرتیفوئیدی در حیوانات خون‌گرم و انسان مورد نیاز است. پروتئین‌های SipB/C/D در انتقال یکسری پروتئین اثرگذار (effector protein) به درون سلول‌های میزبان نقش دارند [۵]. SipA به پلیمریزاسیون اکتین کمک می‌کند؛ سالمونلا ۱۲ پروتئین اجرایی را که توسط جزیره بیماری‌زایی یک (SPI-1) کد می‌شوند از طریق سیستم ترشحی تیپ سه (type three secretion system یا T3SS) به درون سلول میزبان (انتروسیت) تزریق می‌کند [۶]. احتمالا اولین پروتئین‌های رهاشده توسط T3SS پروتئین‌های SipA و SipC (Salmonella inner pro-teins) هستند. SipA و SipC پدیده‌های ناهمواری غشا (Membrane ruffling)، تهاجم (Invasion) و استقرار (Colonization) را از طریق برهمکنش مستقیم با اکتین اسکلت سلولی تحریک نموده و حرکت و دینامیک اکتین را تنظیم می‌کنند [۷]. هم‌چنین، SIP-I با کد کردن پروتئینی به نام phoP/phoQ سبب حفاظت باکتری از دفنسین‌های فاگوسیتی دخیل در واکنش‌های کشتار غیروابسته به اکسیژن می‌شود. بنابراین، در بقای باکتری در سلول‌های فاگوسیتر نظیر ماکروفاژ کمک می‌کند. حداقل دو انتروتوکسین در سالمونلاهای مولد عفونت گوارشی و اختلالات گاستروانتریت موجود می‌باشد [۸]. در سال ۲۰۱۴ در برزیل Rowlands و همکاران، تعداد ۲۳۷ گونه سالمونلای مرتبط و یا غیر مرتبط با سالمونلوزیس منتقله از طریق مواد غذایی در برزیل را که تماما متعلق به سروتیپ انتریتیدیس بودند، هدف مطالعه خود قرار دادند؛ بیشترین مقاومت به استرپتو-مایسین (۳۵/۹ درصد) و نالیدیکسیک اسید (۱۹/۹ درصد) بود و تمامی سویه‌ها به سفوکسیتین، سفالوتین، سفوتاکسیم، آمیکاسین، سیپروفلوکساسین و ایمی‌پنم حساس بودند. هم-چنین، تمامی سویه‌ها از نظر حضور ژن *invA* مثبت بودند و فراوانی ژن‌های *spvC* و *pefA* به‌ترتیب برابر ۴۸/۱ و ۴۴/۳ درصد بود. ژن *sefA* نیز تنها در ۳۱/۶ درصد از سویه‌های سالمونلا انتریتیدیس حضور داشت. فراوانی بالای مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه‌های جدا شده از ماکیان نشان داد که خطر بالایی در مصرف این محصولات وجود دارد و رعایت موازین بهداشتی مناسب از مزرعه تا خط تولید کارخانه و مصرف ماده غذایی اعم از نگهداری و طبخ غذا می‌تواند سبب کاهش انتشار پاتوژن‌های مرتبط با بهداشت عمومی شود [۹]. فیروزی و همکاران در شیراز در سال ۲۰۱۳ در مطالعه‌ای تحت عنوان ویژگی‌های سالمونلای جدا شده از منابع انسانی و حیوانی مختلف به‌وسیله PCR، دریافتند که از ۶۴ سویه سالمونلا جدا شده فراوانی ژن‌های *spvA*، *int2* و *invC* به‌ترتیب برابر ۶۵/۶، ۳۹/۱ و ۷۶/۶ درصد است. در سویه‌های با مقاومت چندتایی (MDR) شیوع بالایی از ژن-های *int2* و *spvA* مشاهده شد که ممکن است نقش مهمی در انتشار مقاومت ضد میکروبی در سویه‌های MDR سالمونلا داشته باشد. *spvA* روی پلاسمید و *int2* روی عناصر متحرک وجود دارند [۳]. شناسایی و تایید این ژن‌ها می‌تواند در بررسی اپیدمیولوژیکی وسیع، مقاومت‌های آنتی بیوتیکی، تولید واکسن، میزان حدت، پیشگیری و درمان نقش داشته باشد. لذا، هدف از مطالعه حاضر شناسایی ژن-های *Stn*، *sopB*، *slyA*، *spvc* و *Phop/Q* در سویه‌های *سالمونلا تیفی‌موریوم* جدا شده از نمونه‌های بالینی به‌روش Multiplex PCR می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

در این مطالعه توصیفی-مقطعی که در یک بازه زمانی یک‌ساله از ابتدای فروردین لغایت پایان اسفند ۱۳۹۴ انجام گردید، تعداد ۶۰ جدایه بالینی *سالمونلا تیفی‌موریوم* از نمونه مدفوع بیماران مراجعه کننده به بیمارستان شریعتی تهران جمع‌آوری گردید. به‌منظور تایید سویه‌ها، تمامی آنها روی محیط سالمونلا شیگلا (SS) آگار منتقل شد و گرمخانه گذاری به‌مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سلیسیوس انجام گرفت. سپس، با استفاده از تست‌های استاندارد بیوشیمیایی و میکروبیولوژیکی نظیر سیمون سیترات، TSI، SIM، MRVP و تولید اوره‌آز و اندول مورد بررسی قرار گرفتند. کلونی‌های جدا شده با ویژگی بیوشیمیای لاکتوز و اوره منفی، H_2S، حرکت، سیترات و متیل رد مثبت به‌عنوان یک جدایه متعلق به جنس سالمونلا تعیین گردیدند. آزمون سروتایپینگ برای مشخص نمودن آنتی‌ژن‌های سوماتیک (O)، فلاژله (H) و کپسولی (Vi) با استفاده از آنتی سرم‌های پلی‌والان و مونووالان تهیه شده از شرکت بهار افشان به روش آگلوتیناسیون اسلایدی انجام گردید. از سویه رفرانس *Salmonella* enterica subsp. enterica serovar Typhimurium ATCC 14028 تهیه شده از بانک میکروبی دانشگاه علوم پزشکی ایران به‌عنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

آزمون انتشار از دیسک

آزمون حساسیت آنتی بیوتیکی روی محیط مولر هینتون

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-08-07]

آگار و با استفاده از روش انتشار از دیسک روی تمامی سویه‌های جمع‌آوری شده، برای آنتی بیوتیک‌های آموکسی کلاو، تتراسیکلین، ایمی‌پنم، آمیکاسین، استرپتومایسین، جنتامایسین، کلرامفنیکل، تری-متوپریم سولفوماتکسازول، آمپی‌سیلین و سفتریاکسون بر اساس دستورالعمل استاندارد آزمایشگاه و بالین (CLSI., 2015) انجام گردید [۱۰]. سوسپانسیون تهیه شده به‌وسیله سوآپ استریل پنبه‌ای روی محیط مولر هینتون آگار به‌صورت متراکم کشت داده شد. سپس، دیسک‌های آنتی بیوتیکی با پنس استریل در سطح محیط قرار گرفته و محیط کشت به‌مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار داده شد. سپس، قطر هاله عدم رشد به-وسیله کولیس اندازه‌گیری شد.

شناسایی مولکولی ژن‌های ویرولانس

به‌منظور تکثیر ژن‌های *Stn*، *sopB*، *slyA*، *spvc* و *Phop/Q* ابتدا تمامی جدایه‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت روی محیط تریپتی کیس سوی براث (مرک، المان) کشت داده شد. سپس، استخراج DNA ژنومی طبق دستورالعمل شرکت سازنده و با استفاده از کیت DNA سیناژن (Cell culture, Tissues, Gram negative Bacteria and CSF) انجام گردید. جهت تایید درجه خلوص DNA استخراج شده از دستگاه بیوفتومتر (Bio-Rad, USA) و OD260/280nm استفاده گردید. به-منظور ردیابی ژن‌های حدت در سویه‌های تحت مطالعه از روش MPCR و توالی‌های اختصاصی الیگونوکلئوتیدی پرایمرهای موجود در جدول شماره ۱ استفاده شد [۱۱]. در نهایت، واکنش MPCR به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۶/۲ میکرولیتر PCR master mix 5X (سینا کلون، ایران) حاوی Taq DNA polymerase (0.05 U/µl) و dNTPs ($MgCl_2$ (3 mM (0.4mM)، ۰/۷ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها به غلظت ۰/۸ میکرومولار، ۰/۷ میکرولیتر از DNA الگو (۱۰ نانوگرم) و ۴/۶ میکرولیتر آب دیونیزه استریل با استفاده از گرادیانت ترموسایکلر (اپندورف، آلمان) برای ۳۲ سیکل به‌صورت زیر انجام گرفت؛ مرحله واسرشتگی در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به‌مدت ۱ دقیقه، مرحله اتصال پرایمرها در ۶۰ درجه سلسیوس به‌مدت ۱ دقیقه و مرحله طویل سازی در ۷۲ درجه سلسیوس به‌مدت ۱۲۰ ثانیه. در پایان، محصولات واکنش M-PCR در ژل آگارز ۱ درصد حاوی اتیدیوم بروماید (۰/۵µg/ml) در مقایسه با سویه استاندار *سالمونلا انتریکا* زیر گروه انتریکا سروار تایفی‌موریوم ATCC 14028 الکتروفورز گردید. در تمامی مراحل انجام این پروژه از سویه‌های رفرانس *Salmonella* enterica subsp. enterica serovar Typhimurium ATCC 14028 به‌عنوان کنترل مثبت و *اشر-یشیا کلی* ATCC 25922 به‌عنوان کنترل منفی (تهیه شده از بانک میکروبی دانشگاه علوم پزشکی ایران) استفاده گردید.

نتایج

نتایج آزمون‌های کشت، بیوشیمیایی و سرولوژیک (TSI، اوره، آبگوشت MR-VP، SIM، تولید اندول و آزمون سروآگلو-تیناسیون) روی تمامی ۶۰ جدایه بالینی *سالمونلا تیفی‌موریوم* که از نمونه مدفوع بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان شریعتی تهران جمع‌آوری گردید، مورد تایید و شناسایی قرار گرفتند. نتایج تست حساسیت آنتی بیوتیکی نشان داد که تمامی ایزوله‌ها به ایمی‌پنم، جنتامایسین و آمیکاسین حساس بوده و بنابراین این عوامل ضد میکروبی به‌عنوان داروی انتخابی در عفونت‌های سالمونلوزیس می‌باشند. هم‌چنین، بیشترین مقاومت آنتی بیوتیکی نیز بر علیه آمپی سیلین (۱۵ درصد)، آموکسی کلاو (۱۳/۳ درصد) و تتراسیکلین (۱۱/۶ درصد) بود (جدول شماره ۲). نتایج آزمون مولکولی نشان داد که بیشترین و کمترین توزیع فراوانی مربوط به ژن‌های *Phop/Q* (۴۳/۳ درصد) و *sopB* (۳/۳۳ درصد) می‌باشد. هم-چنین، تمامی سویه‌ها (۱۰۰ درصد) از نظر وجود ژن *spvc* منفی بودند (جدول شماره ۳ و شکل شماره ۱).

جدول شماره ۱- توالی اسید نوکلئوتیدی آغازگرهای مورد استفاده در مطالعه حاضر

ژن	توالی پرایمر ('۳→'۵)	طول قطعه مورد انتظار (bp)	رفرنس
slyA	F=5'-GCCAAAACTGAAGCTACAGGTG-3' R=5'- CGGCAGGTCAGCGTGTCGTGC-3'	۷۰۰	۱۱
Spvc	F=5'-ACTCCTTGCACAACCAAATGCGGA-3' R=5'-TGTCTTCTGCATTTCGCCACCATCA-3'	۴۲۴	۱۲
Stn	F=5'-TTAGGTTGATGCTTATGATGGACACCC-3' R=5'-CGTGATGAATAAAGATACTCATAGG-3'	۶۱۷	۱۱
sopB	F=5'-GATGTGATTAATGAAGAAATGCC-3' R=5'-GCAAACCATAAAAACTACACTCA-3'	۱۱۷۰	This work
Phop/Q	F=5' -ATGCAAAGCCCGACCATGACG-3' R=5'-GTATCGACCACCACGATGGTT-3'	۲۹۹	۱۱

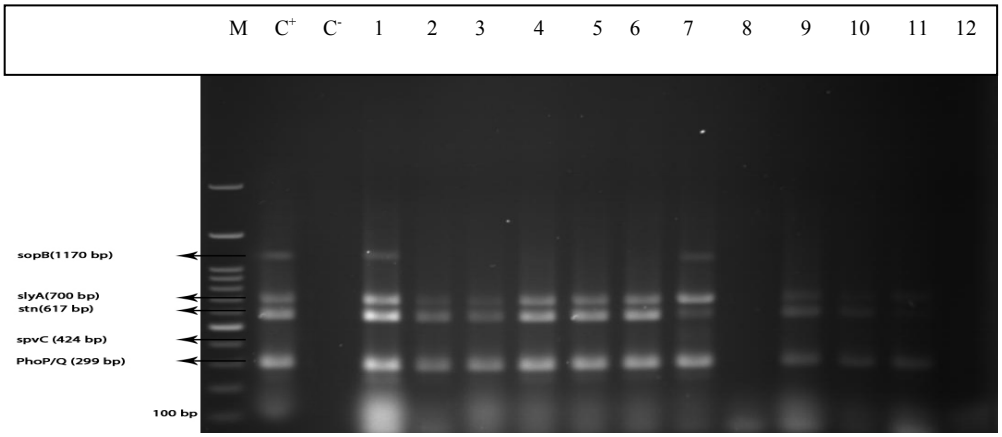
[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-08-07]

جدول شماره ۲- نتایج آنتی بیوگرام سویه‌های *سالمونلا تیفی‌موریوم* مورد مطالعه

آنتی بیوتیک	تعداد (درصد) *سویه‌های سالمونلا تیفی‌موریوم* (n= ۶۰)		
	حساس	نیمه‌حساس	مقاوم
آموکسی سیلین / کلاولانات	۵۲ (۸۶/۶)	۰	۸ (۱۳/۳)
تتراسیکلین	۵۱ (۸۵)	۲ (۳/۳)	۷ (۱۱/۶)
ایمی‌پنم	۶۰ (۱۰۰)	۰	۰
آمیکاسین	۶۰(۱۰۰)	۰	۰
استرپتومایسین	۵۸(۹۶/۶)	۱ (۱/۶)	۱ (۱/۶)
جنتامایسین	۶۰(۱۰۰)	۰	۰
کلرامفنیکل	۵۸(۹۶/۶)	۲ (۳/۳)	۰
تری‌متوپریم سولفومتاکسازول	۵۵ (۹۱/۶)	۰	۵ (۸/۳)
آمپی‌سیلین	۴۹ (۸۱/۶)	۲ (۳/۳)	۹ (۱۵)
سفتریاکسون	۵۹ (۹۸/۳)	۰	۱ (۱/۶)

جدول شماره ۳- فراوانی ژن‌های مورد مطالعه در سویه‌های *سالمونلا تیفی‌موریوم*

ژن مورد مطالعه	تعداد (درصد) سویه‌های حامل ژن (۶۰ نمونه)				
	slyA	*Spvc*	*Stn*	*sopB*	*Phop/Q*
	۱۴ (۲۳/۳)	۰	۱۸(۳۰)	۲(۳/۳۳)	۲۶(۴۳/۳)



تصویر شماره ۱- نتیجه آزمایش Multiplex- PCR انجام شده در مطالعه حاضر؛ به‌ترتیب از چپ به راست: M؛ مارکر ۱۰۰ bp، C^+؛ کنترل مثبت، C^-؛ کنترل منفی، ژن *phoP* با طول باند ۲۹۹ bp، ژن *spv* با طول باند ۶۱۷ bp، ژن *slyA* با طول باند ۷۰۰ bp و ژن *sop* با طول باند ۱۱۷۰ bp می‌باشند.

بحث

در سال‌های اخیر شیوع سالمونلاهای غیرتیفوییدی در جهان به‌دلیل پیدایش بسیاری از سروتایپ‌های جدید سالمونلایی که در گذشته شیوع چندانی نداشته است، به‌طور وسیعی روبه افزایش است [۱۲]. تحقیقات انجام شده نشان می‌دهد که سرو-تایپ‌های جدیدی در بروز سالمونلوز حاد دخالت دارند، بنابراین لازم است که بررسی‌های مجددی شود و نوع سالمونلای غالب در جامعه مشخص گردد؛ زیرا گاستروانتریت حاد در مناطقی که از نظر بهداشتی و اقتصادی در حد پایین بوده و تراکم جمعیت آنها زیاد است، یکی از شایع‌ترین بیماری‌ها می‌باشد و در کشورهای در حال توسعه از جمله کشور ما عفونت‌های سالمونلایی هم‌چنان از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است؛ به‌طوری‌که سالانه درصد قابل توجهی از عفونت‌های انسانی به‌خصوص اطفال و افراد مسن را به-خود اختصاص می‌دهند [۱۳]. لذا، ارزیابی الگوی اثرات آنتی بیوتیک‌های رایج و مصرفی و مقایسه آن با دیگر داروهای مناسب به‌عنوان جایگزین در درمان این عفونت دارای اهمیت می‌باشد. مصرف بیش از اندازه آنتی بیوتیک در بالین، دامپزشکی و کشاورزی و محصولات غذایی حیوانی باعث ظهور سویه‌هایی از

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-08-07]

سالمونلا با مقاومت چندگانه شده است و آن را به یک مشکل اپیدمیولوژیک بزرگ در سرتاسر جهان تبدیل نموده است [۱۴]. در مطالعه حاضر هیچ‌یک از سویه‌ها به آنتی بیوتیک‌های ایمی‌پنم، آمیکاسین و جنتامایسین مقاومت نشان ندادند. این نتایج با مطالعه سایر محققین از جمله، اشراقی و همکاران در تهران [۱۵]، عبداللهی و همکاران در فسا [۱۶]، سلطان دلال و همکاران [۱۷]، و رنجبر و همکاران [۱۸] هم‌خوانی دارد. مهم‌ترین اقدام درمانی در گاستروانتریت سالمونلایی‌اصلاح دهیدراتاسیون و اختلالات الکترولیتی است. معمولا بدون نیاز به آنتی بیوتیک، بهبودی حاصل می‌شود. از آنتی بیوتیک فقط در درمان بیماران پرخطر و افراد مبتلا به عفونت‌های خارج روده‌ای استفاده می‌شود. اشراقی و همکاران [۱۵] در سال ۱۳۸۸ در یک مطالعه مقطعی و در تهران به بررسی ۱۹۵۰ نمونه مدفوع کودکان مبتلا به اسهال پرداختند و نتیجه گرفتند که با توجه به حساسیت بالای سویه‌ها به سفالوسپورین‌ها و فلوروکوئینولون‌ها از آنها می‌توان به‌عنوان داروی مناسب جهت درمان عفونت‌های سالمونلایی استفاده کرد. نتایج آزمون مولکولی نشان داد که بیشترین و کمترین توزیع فراوانی مربوط به ژن‌های *Phop/Q* (۴۳/۳ درصد) و *sopB* (۳/۳۳ درصد) می‌باشد. اختلاف فاحشی در نتایج مطالعات کنونی با مطالعه انجام شده در آمریکا وجود دارد؛ به‌طوری‌که در آن مطالعه از ۳۷ سالمونلا جدا شده از منابع مختلف تعداد ۳۱ جدایه (۹۷ درصد) به‌صورت توأم واجد ژن *spvC* و ژن *invA* بودند [۱۹]. تمامی سویه‌های مورد مطالعه در پژوهش کنونی از نظر وجود ژن *spvc* منفی بودند که این یافته‌ها با نتیجه Pan و همکاران [۲۰] در تایوان تفاوت دارد. این محققین دریافتند که از ۲۸ جدایه سالمونلا تحت مطالعه فقط ۲ جدایه فاقد ژن *spv* بودند که می‌تواند در نتیجه اختلاف جغرافیایی و اختلاف در نوع سروتایپ سالمونلای تحت مطالعه (*سالمونلا تیفی‌موریوم* در مقایسه با *سالمونلا انتریتیدیس*) باشد. Ling و همکاران [۲۱] جهت جداسازی سریع سالمونلا از پرایمرهای *InvA* و *spvC* استفاده نمودند و نتیجه گرفتند از مجموع ۴۱۰ جدایه مربوط به ۵۸ سروار که طی سال‌های ۲۰۰۰ تا ۲۰۰۳ از نمونه‌های با منشاء مدفوع، غذا، آب در چین جدا گردیده بود، در تمامی جدایه‌ها ژن *invA* وجود داشته، اما فقط ۱۵ درصد نمونه‌ها واجد ژن *spvC* بودند. زهرایی صالحی و همکاران [۲۲] با استفاده از پرایمرهای اختصاصی اقدام به بررسی فنوتیپی و ژنوتیپی از سالمونلا پرداختند؛ این محققین با استفاده از ۳ جفت آغازگر به‌نام‌های ST_{I}-ST_{14}، S_1-S_4، $SEFA_2$-$SEFA_4$ با تولید قطعه ژنومی به‌ترتیب با اندازه ۴۲۹bp، ۲۵۰bp، ۳۱۰bp مربوط به ژن‌های با ترادف اتفاقی، پلاسمید حدّت و فیمریه با روش M-PCR روی ۱۰۰ جدایه *سالمونلا انتریتیدیس*، آنها را تأئید نمودند. علاوه بر آن، حضور ژن‌های *invA* و *spvC* به‌ترتیب در تمام جدایه‌های سروار تیفی‌موریوم و انتریتیدیس نیز تأئید گردید. هم‌چنین، امینی و همکاران [۲۳] از روش مولتی‌پلکس PCR برای تعیین و شناسایی هم‌زمان ژن‌های *invA* و *spvC* و از روش PCR ساده برای تعیین ژن‌های *spvA* و *spvB* در *سالمونلا انتریتیدیس* استفاده کردند؛ آنالیز نمونه‌ها نشان داد که ژن‌های *spvA*، *spvB* و *spvC* در ۹۰ درصد از *سالمونلا انتریتیدس*‌های جدا شده از منابع انسانی و ۱۰۰ درصد گونه‌های جدا شده از منابع گاوی وجود دارد، در صورتی‌که در مطالعه ما این ژن در هیچ‌یک از نمونه‌ها شناسایی نگردید و این می‌تواند در نتیجه اختلاف در نوع نمونه‌ها باشد. علی‌رغم اینکه ژن‌های *stn* ،*slyA, phoP/Q* در جزایر بیماری‌زای سالمونلا قرار نگرفته‌اند، نقش مهمی در بیماری‌زایی این باکتری داشته و ترشح سالمولایزین از طریق تنظیم نسخه برداری ژن‌ها در داخل ماکروفاژها کد می‌شوند. درتحقیق حاضر ژن *spvC* مشاهده نشد که این امر می‌تواند در گونه‌های مختلف بدون حضور این ژن مشاهده گردد. مطالعات پیشین اثبات کرده‌اند که عدم حضور ژن *spv* در سالمونلاها باعث غیرمهاجم شدن این باکتری‌ها می‌گردد [۲۴]. در تحقیق حاضر نیز میزان شیوع ژن‌های *slyA, phoP/Q*، *stn* بیشتر بوده که کاملا با منشا ایجاد آن و تولید توکسین باکتری در داخل روده مرتبط می‌باشد.

نتیجه گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که شناسایی مقاومت‌های دارویی و جلوگیری از انتشار آنها قطعا یکی از مسایل عمده در درمان عفونت‌ها و بهداشت جامعه می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه مقطع کارشناسی ارشد میکروب شناسی در دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه می‌باشد. پژوهشگران از مدیریت و پرسنل محترم گروه میکروب شناسی و پرسنل بیمارستان دکتر شریعتی و آزمایشگاه تحقیقاتی پاسارگاد به‌ویژه جناب آقای ابوالفضل مقدم که در پیش‌برد این تحقیق یاری ارزنده و سودمند داشته‌اند، قدردانی به‌عمل می‌آورند.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-08-07]

References:

[1] Coburn B, Grassl GA, Finlay B. *Salmonella*, the host and disease: a brief review. ***Immunol Cell Biol*** 2007; 85(2): 112-18.

[2] Majowicz SE, Musto J, Scallan E, Angulo FJ, Kirk M, O'Brien SJ, et al. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. ***Clin Infect Dis*** 2010; 50(6): 882–9.

[3] Firouzi R, Derakhshandeh A, Mehrshad S, Heydari S. Characterization of Salmonellae isolated from different animal and human sources by PCR and resistance trends. ***IJVR*** 2014; 15(2): 132-7.

[4] Mao X, Hu J, Liu X. Estimation on disease burden of foodborne nontyphoid salmonellosis in China using literature review method. ***Chinese J Disease Control Prevention*** 2011; 15: 622–5.

[5] Ke B, Ran L, Wu S, Deng X, Ke C, Feng Z, et al. Survey of physician diagnostic and treatment practices for patients with acute diarrhea in Guangdong Province, China. ***Foodborne Pathog Dis*** 2012; 9(1): 47–53.

[6] Majowicz SE, Musto J, Scallan E, Angulo FJ, Kirk M, O'Brien SJ, et al. The Global Burden of Nontyphoidal Salmonella Gastroenteritis. ***Clin Infect Dis*** 2010; 50(6): 882–9.

[7] Heithoff DM, Shimp WR. Human *Salmonella* Clinical Isolates Distinct from Those of Animal origin. ***Appl Environ Microbiol*** 2008; 74(6): 1757–66.

[8] Ktsoyan Z, Ghazaryan K, Manukyan G, Martirosyan A, Mnatsakanyan A, Arakelova K, et al. Inflammatory Responses to Salmonella Infections are Serotype-Specific. ***Int J Bacteriol*** 2013; 2013: 168-79.

[9] Rowlands RE, Ristori CA, Ikuno AA, Barbosa ML, Jakabi M, Franco BD. 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): 461-7.

[10] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. ***M100-S25*** 2015; 35(3): 44-50.

[11] Guerra B, Laconcha I, Soto SM, Gonza¨lez-Hevia M, Mendoza MC. Molecular characterisation of emergent multiresistant *Salmonella* enterica serotype [4,5,12:i:3] organisms causing human salmonellosis. ***FEMS Microbiol Lett*** 2000; 190(2): 341-7.

[12] Moreno Switt AI, den Bakker HC, Cummings CA, Rodriguez-Rivera LD, Govoni G, Raneiri ML, et al. Identification and Characterization of Novel Salmonella Mobile Elements Involved in the Dissemination of Genes Linked to Virulence and Transmission. ***PLOS One*** 2012; 7(7): e41247.

[13] Jones TF, Ingram LA, Cieslak PR, Vugia DJ, Tobin-D'Angelo M, Hurd S, et al. Salmonellosis Outcomes Differ Substantially by Serotype. ***J Infect Dis*** 2008; 198(1): 109–14.

[14] Beceiro A, Tomás M, Bou G. Antimicrobial Resistance and Virulence: A Successful or Deleterious Association in the Bacterial World. ***Clin Microbiol Rev*** 2013; 26(2): 185–230.

[15] Eshraghi S, Soltan Dalall MM, Fardsanei F, Zahraii Salehi T, Ranjbar R, B Nikmanesh, et al. Salmonella enteritidis and antibiotic resistance patterns: a study on 1950 children with diarrhea. ***Tehran Univ Med J*** 2010; 67(12): 876-82. [in Persian]

[16] Abdollahi A, Najafipour S, Kouhpayeh SA, Meshkibaf MH, Naghdi M. salmonella enterica; serotyping, drug resistance and extended spectrum β-lactamase. ***J Fasa Univ Med Sci*** 2011; 1(1): 38-44.

[17] Soltan Dallal MM, Rastegar Lari A, Sharifi Yazdi MK. Pattern of serotyping and antibiotic resistance of Salmonella in children with diarrhea. ***J Gorgan Uni Med Sci*** 2014; 16(1): 100-5. [in Persian]

[18] Ranjbar R, Naghouni A, Panahi Y, Izadi M. Antibiotic susceptibility patterns of *Salmonella* strains isolated from clinical cases less than ten antibiotics used in the treatment of *Salmonella* infection. ***J Infect Dis Tropical Med*** 2009; 14(46): 41-5. [in Persian]

[19] Swamy SC, Barnhart HM, Lee MD, Dreesen DW. Virulence Determinants *invA* and *spvC* in Salmonellae Isolated from Poultry Products, Wastewater, and Human Sources. ***Appl Environ Microbiol*** 1996; 62(10): 3768–71.

[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] Ling JM. Rapid detection of food-borne pathogens in clinical specimens, food and environmental samples. ***Hong Kong Med J*** 2009; 15 Suppl 2: 26-9.

[22] Madadgar O, Salehi TZ, Tadjbakhsh H, Mahzounieh M, Feizabadi MM. Genomic and phenotypic evaluation of Salmonella typhimurium and Salmonella enteritidis in Iran. ***Comparative Clin Pathol*** 2008; 17(4): 229-35.

[23] Amini K, Salehi TZ, Nikbakht G, Ranjbar R, Amini J, Ashrafganjooei B. Molecular detection of invA and spv virulence genes in salmonella enteritidis isolated from human and animals in Iran. ***Afr J Microbiol Res*** 2010; 4(21): 2002-210.

[24] Bajpai VK, Baek KH, Kang SC. Control of *Salmonella* in foods by using essential oils: A review. ***Food Res Int*** 2012; 45(2): 722–34.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-08-07]