

Study of antibiotic resistance pattern and incidence of pathogenic genes of *mgtC*, *spi4R*, *agfA*, *invE/A* and *ttrC* in *Salmonella infantis* isolated from clinical specimens

Aghdasi-Araghinezhad R, Amini K*

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

Received November 13, 2016; Accepted May 29, 2017

Abstract:

Background: The importance of the health of red meat, poultry and eggs in human nutrition is very high. One of the factors that jeopardize the health of poultry food products is the bacterial family of *Enterobacteriaceae*, especially *Salmonella*. The aim of this study was to detect pathogenic genes in *Salmonella* infectious bacteria isolated from stool specimens using the multiple PCR assay.

Materials and Methods: Selective and specific media for isolation of *Salmonella* were used. Primary isolation was carried out using Peptone water, Rapaport, selenite cysteine, MacConky agar and xylose-lysine deoxycholate agar. To confirm the diagnosis, biochemical tests including TSI, urea, endodontic, and citrate were used. The *Salmonella* Polyvalent Kit was used to determine *Salmonella* groups and *mgtC*, *spi4R*, *agfA*, *invE/A* and *ttrC* genes were studied in 60 samples by the multiple PCR method.

Results: The results showed that all samples had 2 genes *mgtC* and *ttrC*, and none of the samples showed resistance to cefepime. Of the 60 samples of *Salmonella*, none were resistant to cefepime and ceftriaxone; 38.8% of the samples were resistant to amoxicillin, 53% to erythromycin and 38.3% to sulfamethoxazole.

Conclusion: It can be concluded that cefepime is the best selective drug for the treatment of *Salmonella* infections. Identification and validation of genes in the region's bacteria can play a role in the broad epidemiological examination, antibiotic resistance, vaccine production, level of virulence, prevention and treatment. Also, evaluation of these genes in the samples for their virulence index is very important.

Keywords: *Salmonella infantis*, Pathogenic genes, Antibiotic resistance, Multiple PCR

* Corresponding Author.

Email: dr_kumarss_amini@yahoo.com

Tel: 0098 912 545 4074

Fax: 0098 864 224 1 511

Conflict of Interests: No

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, December, 2017; Vol. 21, No 5, Pages 443-449

Please cite this article as: Aghdasi-Araghinezhad R, Amini K. Study of antibiotic resistance pattern and incidence of pathogenic genes of *mgtC*, *spi4R*, *agfA*, *invE/A* and *ttrC* in *Salmonella infantis* isolated from clinical specimens. *Feyz* 2017; 21(5): 443-9.

بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و بروز ژن‌های بیماری‌زای *agfA spi4R mgtC* و *invE/A* در باکتری *سالمونلا* / *اینفنتیس* جدا شده از نمونه‌های بالینی

رویا اقدسی عراقی‌نژاد^۱، کیومرث امینی^{۲*}

خلاصه:

سابقه و هدف: اهمیت سلامت گوشت قرمز، مرغ و تخم‌مرغ در تغذیه انسان بسیار زیاد است. یکی از عللی که سلامت فرآورده‌های غذایی طيور را به‌مخاطره می‌اندازد باکتری‌های خانواده اتروباکتریاسه به‌ویژه سالمونلا می‌باشد. هدف از این تحقیق شناسایی ژن‌های بیماری‌زا در باکتری‌های سالمونلا / اینفنتیس جدا شده از نمونه‌های مدفوع با روش PCR چندگانه بود.

مواد و روش‌ها: از محیط‌های پیش‌انتخابی و اختصاصی برای جداسازی سالمونلا استفاده شد. به‌منظور جداسازی اولیه از محیط‌های آب پی‌تونه، راپاپورت، سلنیت سیستین، مک‌کانگی آگار و XLD استفاده شد. جهت تأیید تشخیص از تست‌های بیوشیمیایی شامل TSI، اوره، اندول و سترات، و حرکت استفاده گردید. برای تعیین گروه سالمونلای جدا شده، از کیت پلی‌والان سالمونلا استفاده شد و ژن‌های *agfA spi4R mgtC invE/A* و *ttrC* در ۶۰ نمونه مورد مطالعه با روش PCR چندگانه بررسی گردید.

نتایج: نتایج تحقیق نشان داد که تمام نمونه‌ها دارای ۲ ژن *mgtC* و *ttrC* بوده و هیچ‌کدام از نمونه‌ها مقاومتی نسبت به سفپیم نشان ندادند. از مجموع ۶۰ نمونه سالمونلا، هیچ‌کدام به سفپیم و سفتریاکسون مقاوم نبودند، ۳۸/۸ درصد آن‌ها به آموکسی‌سیلین، ۵۳ درصد به اریترومایسین و ۳۸/۳ درصد به سولفامتوکسازول مقاومت نشان دادند.

نتیجه‌گیری: در مجموع می‌توان گفت سفپیم به‌عنوان بهترین داروی انتخابی برای درمان ابتلا به سالمونلا / اینفنتیس می‌باشد. شناسایی و تایید ژن‌ها در باکتری‌های منطقه می‌تواند در بررسی اپیدمیولوژیکی وسیع، مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی، تولید واکسن، میزان حدت، پیشگیری و درمان نقش داشته و بررسی این ژن‌ها در نمونه‌ها به‌دلیل فراوانی شاخص حدت بسیار اهمیت دارد.

واژگان کلیدی: سالمونلا / اینفنتیس، ژن‌های بیماری‌زا، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، PCR چندگانه

دو ماه‌نامه علمی-پژوهشی فیض، دوره بیست و یکم، شماره ۵، آذر و دی ۱۳۹۶، صفحات ۴۴۹-۴۴۳

مقدمه

علی‌رغم پیچیدگی خانواده اتروباکتریاسه، کمتر از ۲۰ جنس آن‌ها عامل بیش از ۹۵ درصد از عفونت‌های ایجاد شده می‌باشند. برخی از اعضای این خانواده علاوه بر اینکه فلور طبیعی روده انسان و حیوانات می‌باشند، به‌طور گسترده از آب، خاک، و سبزی-ها جدا می‌گردند، و همچنین بعضی از اعضای این خانواده بیماری‌زا بوده و بعضی دیگر عامل عفونت فرصت طلب می‌باشند. در حدود ۳۰ تا ۳۵ درصد از عفونت‌های خون، بیش از ۷۰ درصد از عفونت‌های مجاری ادراری و بسیاری از عفونت‌های روده‌ای در اثر آلودگی به باکتری‌های این خانواده ایجاد می‌شوند.

عفونت‌های ایجاد شده توسط باکتری‌های خانواده اتروباکتریاسه می‌توانند از یک مخزن حیوانی مانند اغلب گونه‌های سالمونلا و یرسینیا، یک ناقل انسانی مانند گونه‌های شیگلا و سالمونلا و نیز از انتشار درونی ارگانیزم در بیماران مستعد مانند / شریشیاکلی منشاء گرفته و درواقع می‌توانند هرجایی از بدن انسان و حیوان را درگیر نمایند [۲، ۱]. روش‌های مولکولی آن‌هایی که به‌طور وسیع در مطالعات اپیدمیولوژیک سالمونلاها استفاده می‌گردند عبارتند از: پلاسمید تایپینگ، ریبوتا‌پینگ، RCCS تایپینگ، انگشت‌نگاری عناصر IS200 و اخیراً انگشت‌نگاری‌های PFGE و AFLP. پیشرفت‌های اخیر در روش‌های مولکولی شناسایی ژن‌ها این امکان را فراهم نموده است تا بتوان باکتری‌ها را براساس خصوصیات ژنوتیپی دسته‌بندی کرد. روش‌های مولکولی بر مبنای DNA پلاسمیدی و شناسایی ژن‌های حدت پلاسمیدی جهت تفریق سوبه‌های سالمونلا به‌کار می‌آیند. در یک تحقیق مشابه نیز از روش PCR چندگانه جهت تعیین هویت سالمونلا تی‌بی‌موریوم و سالمونلا اتریتیدیس و تعیین ژن‌های پلاسمید حدت (SPV) استفاده شده است [۳]. روش‌های متداول تشخیص سالمونلا بین ۳ الی ۵ روز وقت می‌گیرد و امروز سعی بر این است که از روش‌های سریع اما حساس و با ویژگی بالا استفاده شود. آزمایشات

^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:

دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ساوه، دانشکده علوم پایه، گروه میکروبیولوژی

تلفن: ۰۹۱۲۵۴۵۴۰۷۴ | دورنویس: ۰۸۶۴۲۲۴۱۵۱۱

پست الکترونیک: dr_kumarss_amin@yahoocom

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۸/۲۳ | تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۶/۳/۸

جدا سازی و تأیید بیوشیمیایی سالمونلا
همه ایزوله‌ها توسط روش‌های متداول بیوشیمیایی و میکروسکوپی شناسایی شدند (جدول شماره ۱)؛ بدین ترتیب که ابتدا نمونه‌ها روی محیط‌های کشت انتخابی سالمونلا-شیگلا آگار انتقال یافته و پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در 37°C از روی آبگوشت برین‌هارت روی ژلوز لوریا برتانی (LB) به صورت خطی جهت به دست آوردن کلونی منفرد کشت داده شد و در نهایت جهت کارهای مولکولی استفاده شدند.

جدول شماره ۱- خصوصیات بیوشیمیایی سالمونلا

نوع تست	نتیجه تست	نوع تست	نتیجه تست
اندول	-	لیزین	+
سیرات	+	مانیتول	+
اورنیتین	+	سوکروز	-
VP	-	گلوکز	+
TSI	k/gas	لاکتوز	-
H ₂ S	+	اوره‌آز	-
ONPG	-	MR	+

مراحل جدا سازی باکتری‌ها از نمونه‌های محیطی و بالینی از نمونه‌های انتقال داده شده به آزمایشگاه در زیر هود و در کنار شعله با رعایت اصول استریل بودن، در محیط غنی کننده راپاپورت واسیلیادیس (Rappaport Vassiliadis) کشت انجام شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای 37°C انکوبه گردید. پس از گذشت زمان مورد نظر با استفاده از لوپ در محیط‌های انتخابی-افترافی، سالمونلا-شیگلا آگار، کروم-آگار سالمونلا، رامباخ و XLD به صورت خطی کشت انجام شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت از پرگنه‌های سیاه رنگ به محیط‌های بیوشیمیایی نظیر TSI، اوره، سیمون سیرات، آبگوشت MR-VP و محیط SIM انتقال صورت گرفت. بعد از تأیید بیوشیمیایی باکتری سالمونلا، در ادامه با روش استاندارد آگلوتیناسیون و استفاده از آنتی سرم‌های اختصاصی O و H با دستورالعمل مربوطه، سروار باکتری تعیین شده و نیز به-وسیله PCR چندگانه سالمونلا/ینفتیس تأیید شد [۶،۴].

تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن
آزمایش دیسک دیفیوژن که روش کربی بائر نیز نامیده می-شود، از سال ۱۹۶۶ در آزمایشگاه‌ها به طور وسیعی مورد استفاده قرار می‌گیرد. اغلب آزمایشگاه‌ها برای تعیین حساسیت آنتی-بیوتیکی از این روش و بر اساس استانداردهای NCCLS استفاده می‌کنند. عوامل اصلی این آزمایش عبارتند از دیسک‌های حاوی آنتی‌بیوتیک، محیط کشت مناسب و سوسپانسیون باکتریایی که هر-

PCR متنوعی جهت تشخیص سریع سالمونلاها در نمونه‌های بالینی و مواد غذایی استفاده شده است. PCR چندگانه علاوه بر حساسیت بالا در تشخیص سالمونلا در نمونه مدفوع، نیاز به نمونه کمتر داشته و ۲۴ ساعت پس از دریافت نمونه قابل پاسخ‌دهی می-باشد [۴،۲]. ژن‌های هدف در PCR سالمونلاها بسیار متنوع هستند و در مطالعات زیادی ارزیابی شده‌اند. در این میان می‌توان ژن *invA* و آغازگرهای آن، ST139 و ST141 با قطعه افزوده سازی شده bp ۲۸۴ را نام برد. همچنین، ژن *oriC* و ژن *agfA* که قطعات ۳۹۴ و bp ۱۶۳ را به ترتیب افزوده سازی می‌کنند. همین-طور ژن *OmpC* که پروتئین *OmpC* را در غشاء سیتوپلاسمیک کد می‌کند و دو آغازگر S 18 و S 19 با قطعه bp ۱۵۹، و ژن *fimA* که ژن مربوط به فیمبریه می‌باشد و قطعه bp ۸۵ را افزوده می‌نماید. همچنین، ژن‌های *invE*، *fimZ*، *fimY* و *fimW* نیز مورد آزمایش قرار گرفته‌اند [۵،۲]. لزوم این تحقیق شناسایی ژن‌های *ttrC*، *invE/A*، *agfA*، *spi4R*، *mgtC* و *ینفتیس* از نمونه‌های بالینی مدفوع با روش PCR چندگانه بوده تا بدین گونه میزان مقاومت این باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد نظر بررسی گردد. از جمله ژن‌های ویروالانس می‌توان به *ttrC*، *invA*، *agfA*، *spi4R*، *mgtC* در جنس سالمونلا اشاره کرد. این ژن‌ها پروتئین‌هایی را کد می‌کنند که در مقابله با سیستم ایمنی، کمپلمان و مرگ داخل سلولی نقش دارند. عنصر ژنتیکی مهم دیگری که نقش اساسی در پاتوژنز این باکتری دارد، جزایر پاتوژنیسته سالمونلاها به نام SPIs می‌باشد که واسطه تهاجم اولیه به مخاط روده است. ژن *spi4R* برای بقای درون ماکروفاژها و ترشح توکسین نقش اساسی دارد. گروهی از ژن‌ها تحت عنوان *invA* وجود دارند که در ورود سالمونلا به سلول‌های اپی‌تلیال نقش ایفا می‌کنند. این جزایر هم از نظر اندازه و هم از نظر محتوی ژنی بسیار مهم هستند [۲]. هدف از انجام این تحقیق شناسایی ژن‌های *ttrC*، *invE/A*، *agfA*، *spi4R*، *mgtC* و *ینفتیس* از نمونه‌های بالینی مدفوع با روش PCR چندگانه می-باشد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش مقطعی-توصیفی تعداد ۶۰ نمونه از نمونه‌های انسانی از بیمارستان امام خمینی^(۳) تهران در ظروف استریل مخصوص جمع‌آوری و کدگذاری گردیده و با رعایت کلیه نکات حمل و نقل نمونه‌های عفونی، به آزمایشگاه گروه میکروب شناسی پاسارگاد منتقل شد.

تهیه گردد. پس از گذشت ۳۰-۲۰ دقیقه، ۲۵ میکرولیتر محلول تریس ۱ مولار به محلول فوق اضافه گردید تا عمل هضم باکتری توسط NaOH متوقف گردد و محلول با pH نهایی ۷/۵ تهیه شود. بلافاصله با افزودن ۴۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل، حجم محلول به ۵۰۰ میکرولیتر رسیده و رقت نهایی از عصاره DNA جهت انجام آزمایش PCR آماده گردید.

آغازگرها (پرایمرها)

پرایمر الیگونوکلئوتیدی اساسی ترین عامل موثر بر راندمان و اختصاصی شدن واکنش PCR می باشد. طراحی دقیق پرایمر برای به دست آوردن محصولات مورد نظر در مقادیر مطلوب و جلوگیری از تکثیر توالی های غیراختصاصی ضروری است. معمولاً ۱-۱/۰ پرایمر در هر واکنش مورد نیاز است (جدول شماره ۲).

جدول شماره ۲- پرایمرها و سویه های استاندارد به کار رفته در PCR ژن های مورد مطالعه [۷]

پرایمر	سکانس پرایمر (از ۵' به ۳')
<i>InvE/A</i> (500 bp)	F:TGCCTACAAGCATGAAATGG / R:AAACTGGACCACGGTACAA
<i>ttrC</i> (920 bp)	F:GTGGGCGGTACAATATTCTTTT / R:TCACGAATAATAATCAGTAGCGC
<i>mgtC</i> (655 bp)	F:TGACTATCAATGCTCCAGTGAAT / R:ATTTACTGGCCGCTATGCTGTTG
<i>spi4R</i> (1269 bp)	F:GAATAGAAGACAAAGCGATCATC / R:GCTTTGTCCACGCCTTTCATC
<i>agfA</i> (261 bp)	F:TCCGGCCCCGACTCAACG / R:CAGCGCGGCGTTATACCG

۳۸/۸ درصد آنها به آموکسی سیلین، ۵۳ درصد به اریترومایسین و ۳۸/۳ درصد به سولفامتوکسازول مقاومت نشان دادند (جدول شماره ۳). امروزه افزایش به مقاومت آنتی بیوتیک ها در باکتری ها یک معضل جهانی است که در اثر مصرف بی رویه و روزافزون داروها اتفاق افتاده و متأسفانه کشور ما هم از این قاعده مستثنی نیست. نتیجه آزمایش PCR چندگانه جهت شناسایی ژن های *spi4R* *mgtC* *agfA* و *invE/A* نشان داد که تمام نمونه ها دارای ژن های *mgtC* و *ttrC* بوده و ژن *spi4R* در هیچ کدام از ایزوله ها یافت نشد (شکل های شماره ۱ و ۲).

جدول شماره ۳- نتایج دیسک دیفیوژن بر حسب تعداد نمونه

(I: intermediate و S: sensitive, R: resistance)			
آنتی بیوتیک ها	(S) Mm	نیمه حساس (I)	(R) Mm
اریترومایسین	۲۸	۰	۳۲
سولفامتوکسازول	۵۰	۰	۱۰
آموکسی سیلین	۳۷	۰	۲۳
سفپیم	۶۰	۰	۰
سفتریاکسون	۵۲	۸	۰

یک از موارد فوق بایستی مطابق با معیارهای NCCLS فراهم شوند [۶]. آزمایشات صورت گرفته با روش دیسک دیفیوژن برای ایزوله های *سالمونلا* / *ینفتیس* با استفاده از ۵ دیسک آنتی بیوتیکی تهیه شده از شرکت پادتن طب که شامل: اریترومایسین، سفپیم، سفتریاکسون، سولفامتوکسازول و آموکسی سیلین بود، انجام گردید.

استخراج DNA از باکتری ها

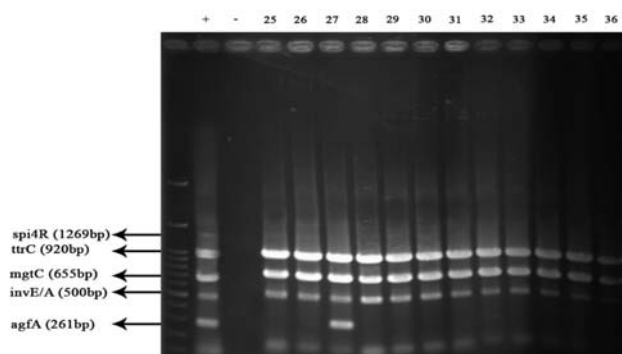
برای استخراج DNA در این پژوهش از روش لیز NaOH نیم نرمال استفاده گردید؛ بدین صورت که ابتدا از ذخیره باکتریایی پس از خروج از حالت انجماد در محیط کشت لوریا- برتانی برات به مدت ۲۴-۱۸ ساعت کشت داده شد. سپس، از محیط کشت یک کلونی انتخاب شده و به میکروتیوب های ۷۰۰ میکرو- لتری حاوی ۲۵ میکرولیتر NaOH نیم نرمال اضافه گردید تا شیرابه

الکتروفورز و آنالیز محصولات PCR

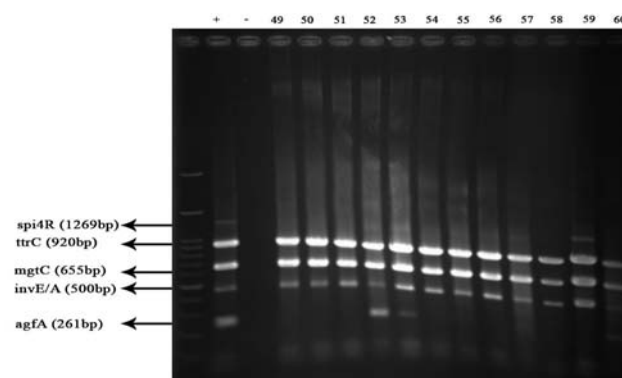
آمپلیکون ها یا فرآورده های حاصل از واکنش PCR، شامل میلیون ها قطعه از DNA مورد هدف است که به طور طبیعی واجد طول مشخصی در ناحیه بین دو پرایمر می باشد. یکی از روش های شناسایی محصولات PCR الکتروفورز روی ژل آگاروز است [۶].

نتایج

بعد از کشت دادن نمونه های جمع آوری شده، در نهایت نمونه های آلوده به باکتری سالمونلا براساس آزمون های بیوشیمیایی جداسازی گردید. پس از کشت های اولیه به منظور بالا بردن دقت از تست های بیوشیمیایی استفاده شد که تست های بیوشیمیایی مورد استفاده ما شامل سیترات، تست TSI، تست MR/VP، SIM، و اوره بودند (جدول شماره ۱). اغلب آزمایشگاه ها برای تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی از روش دیسک دیفیوژن براساس استاندارد NCCLS استفاده می کنند. همچنین، باتوجه به اهمیت مقوله ایجاد مقاومت دارویی، در این مطالعه جدایه ها از نظر مقاومت دارویی مورد بررسی قرار گرفته که نتایج آن به شرح زیر است: از مجموع ۶۰ نمونه سالمونلا، هیچ کدام به سفپیم و سفتریاکسون مقاوم نبودند،



شکل شماره ۱- نتایج PCR چندگانه روی ژل از چپ به راست: مارکر (۱۰۰ bp)، کنترل مثبت، کنترل منفی، نمونه‌های ۲۵-۳۶ حاوی ژن *ttrC* و *mgtC* و *invA* نمونه ۲۷ دارای ژن *agfA* می‌باشند.



شکل شماره ۲- نتایج PCR چندگانه روی ژل از چپ به راست: مارکر (۱۰۰ bp)، کنترل مثبت، کنترل منفی، نمونه‌های ۴۹-۶۰ حاوی ژن *ttrC* و *mgtC* و *invA* و نمونه‌های ۵۲ و ۵۳ و ۶۰ دارای ژن *agfA* می‌باشند.

بحث

سالمونلوز یکی از مهم‌ترین بیماری‌های عفونی است که گسترش جهانی داشته و در انسان و گونه‌های مختلف حیوانات به صورت بیماری‌های متفاوتی ظاهر می‌گردد. دو سرووار شایع این باکتری در حیوانات و انسان *سالمونلا انتریتیدیس* و *تیفی موریوم* می‌باشد [۶]. Morshed و همکاران در سال ۲۰۱۱ بالاترین مقاومت جدایه‌ها را نسبت به آمپی‌سیلین، آموکسی‌کلاو و سولفومتوکسازول، تتراسایکلین و کلرامفنیکل گزارش کرده‌اند. بیشترین مقاومت به سولفومتوکسازول گزارش شده که با نتایج این تحقیق مطابقت ندارد. دلایل این اختلاف می‌تواند به تفاوت در نوع سویه‌ها، زمان نمونه‌گیری و میزان شیوع پلاسمیدهای حاوی ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی مرتبط باشد [۸]. Ross و همکاران با انجام روش PCR روی ایزوله‌های *سالمونلا تیفی موریوم* جدا شده طی سال‌های ۲۰۰۰ تا ۲۰۰۱ و ۲۰۰۵ تا ۲۰۰۶ از بچه‌خوک‌های دارای اسهال نشان دادند که همه ایزوله‌ها دارای ژن *invA* بوده و فقط ۱۴ درصد از ایزوله‌ها دارای ژن *ttrC* می‌باشند [۹]. آزمایشات PCR متنوعی جهت تشخیص سریع سالمونلاها در نمونه‌های بالینی و مواد غذایی استفاده شده است. در اغلب این روش‌ها قبل از انجام PCR یک مرحله غنی‌سازی به منظور بالا بردن حساسیت آزمایش پیشنهاد گردیده

است. سروتایپ‌های سالمونلا از جمله سروتایپ اینفتیس جزء رایج‌ترین سروتایپ‌ها در اکثر نقاط جهان از جمله ایران است. این سروتایپ طی زمان دچار تغییرات ژنتیکی شده و از نظر جغرافیایی در مناطق مختلف دارای ویژگی‌های ژنوتیپی متفاوت می‌باشد. بنابراین، ژنوتایپینگ دقیق این سروتایپ، اطلاعات زیادی در مورد اپیدمیولوژی و شناسایی منابع عفونت آن در اختیار قرار می‌دهد [۹]. محققین مجارستانی در سال ۲۰۰۸ تعداد ۱۴ سویه *سالمونلا اینفتیس* از نمونه‌های مدفوع انسان و ۱۸۲ سویه از نمونه‌های مدفوع جوجه‌ها جدا کردند و در این مطالعه نیز این سروتایپ از فراوانی بیشتری برخوردار بود. بیشترین میزان مقاومت دارویی نیز مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین، فورازولیدون، نالیدیکسیک اسید، تتراسایکلین، لینکوپایکین، فلومکوتین و سولفامتوکسازول تری‌متوپریم بود [۱۰]. زهرایی و همکاران (۱۳۸۲) با استفاده از PCR ساده به بررسی حضور ژن *spi4D* در سروتایپ‌های متفاوت سالمونلا پرداخته و عنوان کردند که از این ژن می‌توان در شناسایی سویه‌های مختلف سالمونلا استفاده کرد [۱۱]. اما باتوجه به نتیجه تحقیق ما ژن مذکور نمی‌تواند دارای حساسیت و ویژگی مناسب جهت تشخیص این باکتری باشد. محققین با افزوده‌سازی PCR ژن *InvA* در ۶۰ جدایه سالمونلا، حضور قطعه ۲۸۴bp این ژن را در

تمام جدایه‌ها مورد تأیید قرار دادند و استفاده از این روش را که کمتر از ۱۲ ساعت زمان نیاز دارد، در جهت تشخیص جنس سالمونلا توصیه نمودند. همچنین، در دیگر مطالعات با افزوده‌سازی PCR ژن *OmpC* در ۲۰۰ نمونه مدفوع گاو اخذ شده از نقاط مختلف ایران و نیز ۲۵ جدایه کلینیکی سالمونلا، در ۷ مورد از نمونه‌های مدفوع و همه ۲۵ جدایه‌های بالینی سالمونلا، حضور قطعه ۱۵۹ bp این ژن تأیید شده و تعیین ژن *OmpC* با روش PCR به-دنبال غنی‌سازی مدفوع روش مناسبی جهت جستجوی سالمونلا در نمونه‌های مدفوع نشان داده شده است [۱۱، ۲، ۳]. در مصر طی سال ۲۰۰۹ از مجموع ۱۴۱ ایزوله سالمونلا جدا شده از نمونه‌های مواد غذایی ۸۱ ایزوله مربوط به سالمونلا/اینفنتیس بود که نسبت به سایر سروتیپ‌های سالمونلا بیشترین موارد جدا شده از نمونه‌های مواد غذایی بود. همچنین، در سال ۲۰۰۳ در آرژانتین، سالمونلا/اتریکا سرووار اینفنتیس دومین عامل شایع در میان سروتیپ‌های سالمونلا در میان کودکان بستری شده در بیمارستان بوده است [۱۲]. در یک مطالعه که به جستجوی سروتیپ سالمونلا/اینفنتیس با استفاده از PCR در بین جدایه‌های گروه C سالمونلا طیور و تعیین الگوی مقاومت دارویی جدایه‌ها پرداخته است، همه جدایه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های فلورفینیکل و دانوفلوکساسین حساس بوده و کمترین مقاومت دارویی به آنتی‌بیوتیک‌های لووفلوکساسین، سفنازیدیم، سفتریاکسون و نورفلوکساسین مربوط می‌شده که با نتایج به‌دست آمده در مطالعه ما هم‌خوانی دارد [۱۳]. دانشمندان به‌منظور ارائه یک روش اختصاصی و سریع برای شناسایی سالمونلا/انترتیدیس و سایر سروتیپ‌های واجد پلاسمید حدت از روش PCR چندگانه با استفاده از آغازگرهای مربوط به ژن‌های *invA* و *spi4R* که به‌ترتیب قطعات ۲۴۴ و ۵۷۱ bp را افزوده‌سازی می‌نمایند، استفاده کرده‌اند. در این روش سروتیپ‌های واجد پلاسمید حدت نظیر سالمونلا تیفی‌موریوم، سالمونلا/انترتیدیس، سالمونلا کلراسوئیس، سالمونلا دابلین و سالمونلا سندائی دو قطعه و سالمونلاهای فاقد پلاسمید حدت تنها یک قطعه مربوط به ژن *invA* را مشخص کردند [۱۴]. عنوان شده است که در عفونت‌های سیستمیک سالمونلا تیفی‌موریوم ژن‌های حدت یا پلاسمید حدت باعث تکثیر و افزایش باکتری‌ها در سیستم رتیکولاندوتلیال و ماکروفاژها شده و حذف ژن‌های *ttrC* باعث کاهش میزان حدت می‌گردد [۱۵]. همچنین، به‌وسیله ایجاد جهش در ژن‌های سکانس *ttrC* صفت ایجاد حدت در سالمونلا تیفی‌موریوم به اثبات رسیده است. قسمت *BttrC* از پلاسمید حدت این توانایی را دارد که همانند یک *ttrC* کامل و دست‌نخورده باعث ایجاد عفونت سیستمیک به‌واسطه سالمونلا تیفی‌موریوم در موش‌های BALB/C بعد از ایجاد عفونت به شکل زیرپوستی گردد [۱۷، ۱۶].

در مطالعه‌ای که Chiu و همکاران (۲۰۰۲) روی سویه‌های جدا شده سالمونلا تیفی‌موریوم و انترتیدیس انجام دادند، نشان دادند که PCR چندگانه در شناخت ایزوله‌های سالمونلای دارای مقاومت چندگانه به‌خصوص سالمونلا تیفی‌موریوم نوع ACSSUT و همچنین در شناسایی توزیع ژن بتالاکتاماز در بین ایزوله‌های سالمونلا بسیار سودمند است. در این روش از سه جفت پرایمر مربوط به ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی *blaPSE-1*، *cmlA/tetR* و *blaTEM* و یک جفت پرایمر مربوط به ژن *sipB/C* که ژن ویژه جنس سالمونلا است، استفاده گردید [۱۸]. بیان شده است که سن، ژنتیک و محیط فاکتورهای اصلی در میزان حدت باکتری بوده و پلاسمیدهای حدت و یا فاکتورهای حدت به‌طور مستقیم دخالتی در واکنش بین میزبان و باکتری ندارند، اما اغلب این ژن‌ها پروتئین‌هایی را کد می‌نمایند که در واکنش بین میزبان و باکتری دخالت نموده و این پروتئین‌های تأثیرگذار نقش مهمی در بقاء و تکثیر سالمونلا دارند [۱۹]. Chashni و همکاران با انجام PCR چندگانه روی ۱۱۲۵ نمونه جدا شده از جوجه‌های خانگی نشان دادند که ۵۵/۵ درصد از نمونه‌ها سالمونلا انترتیدیس و ۲۲/۲ درصد سالمونلا تیفی‌موریوم هستند. تمام سروتیپ‌های سالمونلا تیفی‌موریوم برای چهار ژن *rfbJ* (پادگن O)، *fliC* (پادگن H1)، *fliB* (پادگن H2) و *invA* (تهاجم) مثبت بودند. همچنین، تمام سروتیپ‌های سالمونلا/انترتیدیس برای ژن‌های *spi* و *SefA* (انترتوکسین) مثبت بودند. ایشان نتیجه گرفتند که دقت و حساسیت روش مذکور آن را به یک ابزار ارزشمند برای تعیین گونه‌های سالمونلا تبدیل کرده است [۲۰]. امینی و همکاران نیز از روش PCR چندگانه برای تعیین و شناسایی هم‌زمان ژن‌های *invA* و *ttrC* از روش PCR ساده برای تعیین ژن‌های *mgtC* و *agfA* در سالمونلا/انترتیدیس استفاده کردند. آنالیز نمونه‌ها نشان داد که ژن‌های *ttrC* و *mgtC* در ۹۰ درصد از سالمونلا/انترتیدیس‌های جدا شده از منابع انسانی و ۱۰۰ درصد گونه‌های جدا شده از منابع گاوی وجود دارد [۲۱]. مقایسه نتیجه تحقیق امینی با تحقیق حاضر در ارتباط با میزان شیوع ژن‌های *ttrC* و *mgtC* نشان از شیوع بالای این ژن‌ها در گونه‌های سالمونلا/اینفنتیس و انترتیدیس می‌باشد. برخلاف نتایج حاصل از این مطالعه، در بررسی سالمونلا تیفی‌موریوم نشان از تفاوت زیاد در درصد فراوانی ژن‌های *invA* و *ttrC* در مقایسه با گونه‌های تیفی-موریوم و اینفنتیس می‌باشد.

نتیجه‌گیری

باتوجه به وجود ژن‌های *mgtC* و *ttrC* در همه نمونه‌ها و حساسیت تمام باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک سفپیم این طور می‌توان

تشکر و قدردانی

از کلیه عزیزانی که در مراحل مختلف انجام این پژوهش ما را یاری نمودند کمال قدردانی را به عمل آورده و مراتب سپاسگزاری فراوان خود را از مسئول محترم آزمایشگاه میکروب شناسی و آزمایشگاه تحقیقاتی پاسارگاد جناب آقای مهندس مقدم، اعلام می-داریم.

References:

[1] Wannaprasat W, Padungtod P, Chuanchuen R. Class 1 integrons and virulence genes in *Salmonella enterica* isolates from pork and humans. *Int J Antimicrob Agents* 2011; 37(5): 457-61.

[2] Naghyly B, MoghadasPour, Majidpour A, Pahlevanzdeh H. Evaluation of different strains of *Salmonella* to antibiotics, infectious diseases, tropical Conference, Tehran, December database computer Congresses, Research Department of the Ministry of Health, Treatment Med Education 3rd ed. 1990; 647-8. [in Persian]

[3] Madadgar Omid, molecular identification of *Salmonella* isolates to electrophoresis in alternating electric field, Dissertation in Microbiology. Tehran. Faculty of Vet Med University. 1998. [in Persian]

[4] Hojati P, Isolation and identification of *Salmonella* poultry ERic-PCR and serological methods, Dissertation of Poultry Veterinary. Tehran. Science and Research Azad University. 1997. [in Persian]

[5] Hudson CR, Garcia M, Gast RK, Maurer JJ. Determination of close genetic relatedness of the major *Salmonella enteritidis* phage types by pulsed-field gel electrophoresis and DNA sequence analysis of several *Salmonella* virulence genes. *Avian Dis* 2001; 45(4): 875-86.

[6] Mahon CR, Lehman DC, Manuselis G. Textbook of Diagnostic Microbiology-E-Book: Elsevier Health Sciences; 2014. P. 450-720

[7] Soto SM, Rodríguez I, Rodicio MR, Vila J, Mendoza MC. Detection of virulence determinants in clinical strains of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis and mapping on macrorestriction profiles. *J Med Microbiol* 2006; 55(4): 365-73.

[8] Morshed R, Peighambari SM. *Salmonella* infections in poultry flocks in the vicinity of Tehran. *Iran J Vet Med* 2010; 4(4): 273-6. [in Persian]

[9] 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): 375-84.

[10] Nógrády N, Kardos G, Bistyak A, Turcsányi I, Mészáros J, Galántai Z, et al. Prevalence and characterization of *Salmonella infantis* isolates originating from different points of the broiler chicken-human food chain in Hungary. *Int J Food Microbiol* 2008; 127(1): 162-7.

نتیجه گرفت که در نهایت داروی سفپیم به عنوان بهترین داروی انتخابی برای درمان ابتلا به *سالمونلا اینفانتیس* می باشد. شناسایی و تایید ژن ها در باکتری های منطقه می تواند در بررسی اپیدمیولوژیکی وسیع، مقاومت های آنتی بیوتیکی، تولید واکسن، میزان حدت، پیشگیری و درمان نقش داشته و بررسی این ژن ها در نمونه ها به دلیل شاخص حدت بسیار حائز اهمیت می باشد.

[11] Zahraei Salehi MT, Study of the antigenic *Salmonella typhimurium* and use it to detect and track infections caused by this bacterium. Dissertation. Tehran University. 1995. [in Persian]

[12] Ahmed A, Ishida Y, Shimamoto T. Molecular characterization of antimicrobial resistance in *Salmonella* isolated from animals in Japan. *J Appl Microbiol* 2009; 106(2): 402-9.

[13] Aviv G, Tsyba K, Steck N, Salmon-Divon M, Cornelius A, Rahav G, et al. A unique megaplasmid contributes to stress tolerance and pathogenicity of an emergent *Salmonella enterica* serovar Infantis strain. *Environ Microbiol* 2014; 16(4): 977-94.

[14] Shanmugasamy M, Velayutham T, Rajeswar J. InvA gene specific PCR for detection of *Salmonella* from broilers. *Vet World* 2011; 4(12): 562-4.

[15] Matsui H, Kawakami T, Ishikawa S, Danbara H, Gulig PA. Constitutively Expressed phoP Inhibits Mouse-Virulence of *Salmonella typhimurium* in an Spv-Dependent Manner. *Microbiol Immunol* 2000; 44(6): 447-54.

[16] Reed GH, Kent JO, Wittwer CT. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. 2007.

[17] Robbe-Saule V, Schaeffer F, Kowarz L, Norel F. Relationships between H-NS, σ S, SpvR and growth phase in the control of spvR, the regulatory gene of the *Salmonella* plasmid virulence operon. *Mol Gen Genet* 1997; 256(4): 333-47.

[18] Chiu CH, Wu TL, Su LH, Chu C, Chia JH, Kuo AJ, et al. The emergence in Taiwan of fluoroquinolone resistance in *Salmonella enterica* serotype Choleraesuis. *N Engl J Med* 2002; 346(6): 413-9.

[19] Asten AJ, Dijk JE. Distribution of "classic" virulence factors among *Salmonella* spp. *Pathog Dis* 2005; 44(3): 251-9.

[20] Chashni S, Hassanzadeh M, Fard M, Mirzaie S. Characterization of the *Salmonella* isolates from backyard chickens in north of Iran, by serotyping, multiplex PCR and antibiotic resistance analysis. *Arch Razi Inst* 2009; 64(2): 77-83.

[21] Amini K, Salehi TZ, Nikbakht G, Ranjbar R, Amini J, Ashrafganjooei SB. 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): 2202-10.