Original Article

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.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-05]

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

رویا اقدسی عراقی‌نژاد[1]، کیومرث امینی[2*]

خلاصه:

سابقه و هدف: اهمیت سلامت گوشت قرمز، مرغ و تخم‌مرغ در تغذیه انسان بسیار زیاد است. یکی از عللی که سلامت فرآورده‌های غذایی طیور را به‌مخاطره می‌اندازد باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه 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 پپتونه، راپاپورت، سلنیت سیستئین، مک‌کانکی آگار و XLD استفاده شد. جهت تأئید تشخیص از تست‌های بیوشیمیایی شامل TSI، اوره، اندول و سیترات، و حرکت استفاده گردید. برای تعیین گروه سالمونلای جدا شده، از کیت پلی‌والان سالمونلا استفاده شد و ژن‌های *mgtC*، *spi4R*، *agfA*، *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 انتروباکتریاسه، 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 فرصت‌طلب 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 انتروباکتریاسه می‌توانند از یک مخزن حیوانی مانند اغلب گونه‌های سالمونلا و یرسینیا، یک ناقل انسانی مانند گونه‌های شیگلا و سالمونلا و نیز از انتشار درونی ارگانیسم در بیماران مستعد مانند *اشریشیاکلی* منشاء گرفته و درواقع می‌توانند هرجایی از بدن انسان و حیوان را درگیر نمایند [۲،۱]. روش‌های مولکولی آن‌هایی‌که به‌طور وسیع در مطالعات اپیدمیولوژیک سالمونلاها استفاده می‌گردند عبارتند از: پلاسمید تایپینگ، ریبوتایپینگ، RCCS تایپینگ، انگشت‌نگاری عناصر IS200 و اخیرا 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 سویه‌های سالمونلا به‌کار می‌آیند. در یک تحقیق مشابه نیز از روش PCR چندگانه جهت تعیین هویت *سالمونلا تیفی‌موریوم* و *سالمونلا انتریتیدیس* 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 روش-های سریع اما حساس و با ویژگی بالا استفاده شود. آزمایشات

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

[2] 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_amini@yahoo.com

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

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-05]

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 می‌باشد [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 افزوده‌سازی شده bp ۲۸۴ را نام برد. همچنین، ژن *oriC* و ژن *agfA* که قطعات ۳۹۴ و bp ۱۶۳ را به‌ترتیب افزوده‌سازی می‌کنند. همین‌طور 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 *mgtC*، *spi4R*، *agfA*، *invE/A* و *ttrC* *سالمونلا اینفنتیس* از نمونه‌های بالینی مدفوع با روش PCR چندگانه بوده تا بدین‌گونه میزان مقاومت این باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد نظر بررسی گردد. از جمله ژن‌های ویرولانس می‌توان به *invA*، *ttrC*، *mgtC*، *spi4R*، *agfA* 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 پاتوژنیسیته سالمونلاها به‌نام 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 *mgtC*، *spi4R*، *agfA*، *invE/A* و *ttrC* *سالمونلا اینفنتیس* از نمونه‌های بالینی مدفوع با روش PCR چندگانه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش مقطعی-توصیفی تعداد ۶۰ نمونه از نمونه‌های انسانی از بیمارستان امام خمینی(ره) 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.

جداسازی و تأیید بیوشیمیایی سالمونلا

همه ایزوله‌ها توسط روش‌های متداول بیوشیمیایی و میکروسکوپی شناسایی شدند (جدول شماره ۱)؛ بدین‌ترتیب‌که ابتدا نمونه‌ها روی محیط‌های کشت انتخابی سالمونلا-شیگلا آگار انتقال یافته و پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در ۳۷°C از روی آبگوشت برین‌هارت روی ژلوز لوریا برتانی (LB) به‌صورت خطی جهت به‌دست 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	+
سیترات	+	مانیتول	+
اورنیتین	+	سوکروز	–
vp	–	گلوکز	+
TSI	k/gas	لاکتوز	–
H2S	+	اوره‌آز	–
ONPG	–	MR	+

مراحل جداسازی 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 کنندهٔ راپاپورت واسیلیادیس (Rappaport Vassiliadis) کشت انجام شد و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C انکوبه گردید. پس از گذشت زمان مورد نظر با استفاده از لوپ در محیط‌های انتخابی-افتراقی، سالمونلا- شیگلا آگار، کروم-آگار سالمونلا، رامباخ و XLD به‌صورت خطی کشت انجام شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت از پرگنه‌های سیاه رنگ به محیط‌های بیوشیمیایی نظیر TSI، اوره، سیمون سیترات، آبگوشت MR-VP و محیط SIM انتقال صورت گرفت. بعد از تأئید بیوشیمیایی باکتری سالمونلا، در ادامه با روش استاندارد آگلوتیناسیون و استفاده از آنتی‌سرم‌های اختصاصی O و H با دستورالعمل مربوطه، سرووار باکتری تعیین شده و نیز به‌وسیله PCR چندگانه *سالمونلا اینفنتیس* تأئید شد [۶،۴].

تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی به‌روش دیسک‌دیفیوژن

آزمایش دیسک‌دیفیوژن که روش کربی‌بائر نیز نامیده می‌شود، از سال ۱۹۶۶ در آزمایشگاه‌ها به‌طور وسیعی مورد استفاده قرار می‌گیرد. اغلب آزمایشگاه‌ها برای تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی 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-

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-05]

یک از موارد فوق بایستی مطابق با معیارهای NCCLS فراهم شوند [۶]. آزمایشات صورت گرفته با روش دیسک‌دیفیوژن برای ایزوله‌های *سالمونلا اینفنتیس* با استفاده از ۵ دیسک آنتی‌بیوتیکی تهیه شده از شرکت پادتن طب که شامل: اریترومایسین، سفپیم، سفتریاکسون، سولفامتوکسازول و آموکسی‌سیلین بود، انجام گردید.

استخراج DNA از باکتری‌ها

برای استخراج DNA در این پژوهش از روش لیز NaOH نیم‌نرمال استفاده گردید؛ بدین‌صورت‌که ابتدا از ذخیره باکتریایی پس از خروج از حالت انجماد در محیط کشت لوریا-برتانی‌براث به‌مدت ۲۴-۱۸ ساعت کشت داده شد. سپس، از محیط کشت یک کلونی انتخاب شده و به میکروتیوب‌های ۷۰۰ میکرو-لیتری حاوی ۲۵ میکرولیتر NaOH نیم‌نرمال اضافه گردید تا شیرابه 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 اساسی‌ترین عامل موثر بر راندمان و اختصاصی‌شدن واکنش PCR می‌باشد. طراحی دقیق پرایمر برای به‌دست آوردن محصولات مورد نظر در مقادیر مطلوب و جلوگیری از تکثیر توالی‌های غیراختصاصی ضروری است. معمولا M ۱-۰/۱ پرایمر در هر واکنش مورد نیاز است (جدول شماره ۲).

جدول شماره ۲- پرایمرها و سویه‌های استاندارد به‌کار رفته در PCR ژن‌های مورد مطالعه [۷]

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

الکتروفورز و آنالیز محصولات PCR

آمپلیکون‌ها یا فرآورده‌های حاصل از واکنش PCR، شامل میلیون‌ها قطعه از DNA مورد هدف است که به‌طور طبیعی واجد طول مشخصی در ناحیه بین دو پرایمر می‌باشد. یکی از روش‌های شناسایی محصولات PCR الکتروفورز روی ژل آگاروز است [۶].

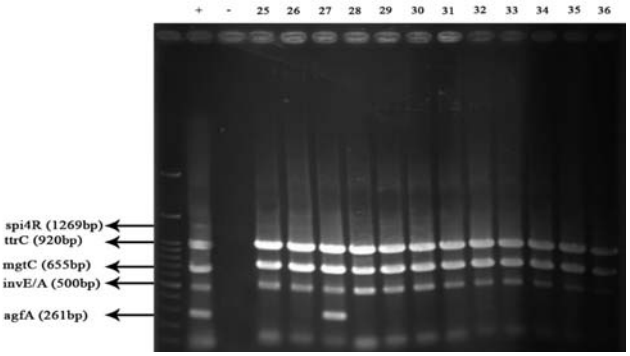
نتایج

بعد از کشت دادن نمونه‌های جمع‌آوری شده، در نهایت نمونه‌های آلوده به باکتری سالمونلا براساس آزمون‌های بیوشیمیایی جداسازی گردید. پس از کشت‌های اولیه به‌منظور بالا بردن دقت از تست‌های بیوشیمیایی استفاده شد که تست‌های بیوشیمیایی مورد استفاده ما شامل سیترات، تست TSI، تست MR/VP، SIM، و اوره بودند (جدول شماره ۱). اغلب آزمایشگاه‌ها برای تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی از روش دیسک‌دیفیوژن براساس استاندارد NCCLS استفاده می‌کنند. همچنین، باتوجه به اهمیت مقوله ایجاد مقاومت دارویی، در این مطالعه جدایه‌ها از نظر مقاومت دارویی مورد بررسی قرار گرفته که نتایج آن به‌شرح زیر است: 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 (جدول شماره ۳). امروزه افزایش به مقاومت آنتی‌بیوتیک‌ها در باکتری‌ها یک معضل جهانی است که در اثر مصرف بی‌رویه و روزافزون داروها اتفاق افتاده و متاسفانه کشور ما هم از این قاعده مستثنی نیست. نتیجه آزمایش PCR چندگانه جهت شناسایی ژن‌های *mgtC*، *spi4R*، *agfA*، *invE/A* و *ttrC* نشان داد که تمام نمونه‌ها دارای ژن‌های *mgtC* و *ttrC* بوده و ژن *spi4R* در هیچ‌کدام از ایزوله‌ها یافت نشد (شکل‌های شماره ۱ و ۲).

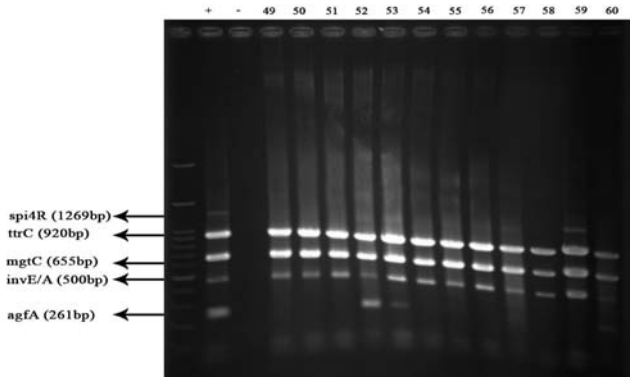
جدول شماره ۳- نتایج دیسک دیفیوژن بر حسب تعداد نمونه (R: resistance، S: sensitive و I: intermediate)

آنتی‌بیوتیک‌ها	Mm (S)	نیمه حساس (I)	Mm (R)
اریترومایسین	۲۸	۰	۳۲
سولفامتوکسازول	۵۰	۰	۱۰
آموکسی‌سیلین	۳۷	۰	۲۳
سفپیم	۶۰	۰	۰
سفتریاکسون	۵۲	۸	۰

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-05]



شکل شماره ۱- نتایج PCR چندگانه روی ژل از چپ به راست: مارکر (۱۰۰ bp)، کنترل مثبت، کنترل منفی، نمونه‌های ۳۶-۲۵ 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 ۶۰-۴۹ 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 به‌صورت بیماری‌های متفاوتی ظاهر می‌گردد. دو سرووار شایع این باکتری در حیوانات و انسان *سالمونلا انتریتیدیس* و *تیفی‌موریوم* 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 نسبت 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 تیفی‌موریوم* 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 به‌منظور بالا بردن حساسیت آزمایش پیشنهاد گردیده است. سروتایپ‌های سالمونلا از جمله سروتایپ اینفنتیس 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 اینفنتیس* 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، لینکوایپکتین، فلومکوئین و سولفامتوکسازول تری‌متوپریم بود [۱۰]. زهرایی و همکاران (۱۳۸۲) با استفاده از PCR ساده به بررسی حضور ژن *spi4D* در سروتیپ‌های 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

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-05]

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 bp ۱۵۹ این ژن تأئید شده و تعیین ژن *OmpC* با روش PCR به‌دنبال 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 جداشده از نمونه‌های مواد غذایی ۸۱ ایزوله مربوط به *سالمونلا اینفنتیس* بود که نسبت به سایر سروتیپ‌های سالمونلا بیشترین موارد جداشده از نمونه‌های مواد غذایی بود. همچنین، در سال ۲۰۰۳ در آرژانتین، *سالمونلا انتریکا* 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 فلورفنیکل و دانوفلوکساسین حساس بوده و کمترین مقاومت دارویی به آنتی‌بیوتیک‌های لووفلوکساسین، سفتازیدیم، 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 انتریتیدیس* و سایر سروتیپ‌های واجد پلاسمید حدت از روش PCR چندگانه با استفاده از آغازگرهای مربوط به ژن‌های *spi4R* و *invA* که به‌ترتیب قطعات ۲۴۴ و bp ۵۷۱ را افزوده‌سازی می‌نمایند، استفاده کرده‌اند. در این روش سروتیپ‌های واجد پلاسمید حدت نظیر *سالمونلا تیفی‌موریوم*، *سالمونلا انتریتیدیس*، *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 رتیکلواندوتلیال 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 *انتریتیدیس* 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 *cmlA/tetR*، *blaPSE-1* 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 انتریتیدیس* و ۲۲/۲ درصد *سالمونلا تیفی‌موریوم* هستند. تمام سروتیپ‌های *سالمونلا تیفی‌موریوم* برای چهار ژن *rfbj* (پادگن O)، *fliC* (پادگن H1)، *fljB* (پادگن H2) و *invA* (تهاجم) مثبت بودند. همچنین، تمام سروتیپ‌های *سالمونلا انتریتیدیس* برای ژن‌های *spi* و *SefA* (انتروتوکسین) 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 *inv A* و *ttrC* و از روش PCR ساده برای تعیین ژن‌های *mgtC* و *agfA* در *سالمونلا انتریتیدیس* استفاده کردند. آنالیز نمونه‌ها نشان داد که ژن‌های *ttrC* و *mgtC* در ۹۰ درصد از *سالمونلا انتریتیدس*های 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* *mgtC* و *inv A* نشان از شیوع بالای این ژن‌ها در گونه‌های *سالمونلا اینفنتیس* و *انتریتیدیس* می‌باشد. برخلاف نتایج حاصل از این مطالعه، در بررسی *سالمونلا تیفی‌موریوم* نشان از تفاوت زیاد در درصد فراوانی ژن‌های *inv A* و *ttrC* در مقایسه با گونه‌های تیفی‌موریوم و اینفنتیس می‌باشد.

نتیجه‌گیری

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

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-05]

نتیجه گرفت که در نهایت داروی 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 شاخص حدت بسیار حائز اهمیت می‌باشد.

تشکر و قدردانی

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

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.

[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.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-05]