شناسایی سریع سالمونلاهای تیفوئیدی و غیرتیفوئیدی در نمونه‌های طیور صنعتی با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز چندگانه (multiplex-PCR)

علی خداداده جیقه[۱]، یونس انزابی[۲و۳*]

چکیده

شناسایی سروتیپ‌های سالمونلا در نمونه‌های طیور صنعتی، با استفاده از روش-های سنتی میکروبیولوژیکی انجام می‌شود که سبب مشکلاتی در تشخیص دقیق و به‌موقع آن‌ها می‌شود، اما روش‌های تشخیص مولکولی این مشکلات را تا حدودی رفع کرده‌است. هدف از انجام مطالعه‌حاضر، ارزیابی امکان شناسائی سریع سالمونلاهای تیفوئیدی و غیرتیفوئیدی در نمونه‌های طیور، با استفاده از روشmultiplex-PCR بود. ٤٠ سالمونلای مربوط به نمونه‌های طیورصنعتی از آزمایشگاه‌های دامپزشکی شهر تبریز تهیه‌شد. بعد از انجام آزمایشات افتراقی و سرولوژیکی لازم، از بین٤٠جدایه مذکور، تعداد ۱۵جدایهء سالمونلاگالیناروم، ۷جدایهء سالمونلاانتریتیدیس، ۲جدایهء سالمونلاتایفی‌موریوم و ۳جدایهء سالمونلاپولوروم تشخیص داده‌شد. ۱۳جدایه متعلق به سالمونلاانتریکا نبودند. در ادامه با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، جهت تکثیر ژن‌های invA، rfbJ، lygD، I137_08605 و speC و به‌کمک روش multiplex-PCR، جدایه‌های فوق از لحاظ ژنوتیپی بررسی شدند. یافته‌ها نشان داد که همه ۲۷جدایه به همراه سوش‌های استاندارد هر ٤سروتیپ مذکور، ژن اختصاصی مشترک invA را دارا هستند. همچنین مشخص شد که ژنI137_08605 در همه جدایه‌ها و سوش‌های استاندارد سروتیپ‌های سالمونلاگالیناروم و سالمونلاپولوروم، ژن-های rfbJ و lygD در همه جدایه‌ها و نیز سوش‌های استاندارد سالمونلاانتریتیدیس و سالمونلاتایفی‌موریوم و ژن speC در همه جدایه‌های سالمونلاگالیناروم و برخی ازجدایه‌ها و سوش‌های استاندارد سالمونلاانتریتیدیس و سالمونلاتایفی‌موریوم حضور دارند. به‌نظر می‌رسد روش multiplex-PCR، سالمونلاگالیناروم و سالمونلاپولوروم را از همدیگر و از متداول‌ترین سالمونلاهای غیرتیفوئیدی طیور تشخیص داد که با جلوگیری از اشاعه بیشترآن‌ها، سبب جلوگیری از خسارت به صنعت طیور شود.

واژگان کلیدی: طیور ، سالمونلاهای واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

تاریخ دریافت: ۱٤۰۲/۱/۵ تاریخ پذیرش: ۱٤۰۲/۳/۳۰

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

۲*- دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، علوم پزشکی تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

۳-گروه بیوتکنولوژی میکروبی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

anzabi_y_576@iaut.ac.ir

مقدمه

باکتری‌های جنس سالمونلا از اعضای خانواده انتروباکتریاسه، باسیلی‌شکل و گرم منفی می‌باشند(۱). تاکنون بیشتر از ۲۷۰۰ سروتیپ برای سالمونلا شناسایی شده که اکثر آن‌ها در انسان، دام‌ها و پرندگان سبب عفونت می‌شوند. شواهد نشان می‌دهد که سالمونلاها از طریق مدفوع انسان، دام و پرندگان دفع شده و در نهایت باعث آلودگی محیط، غذا و آب می‌گردند(۲-٤).

مطابق جدول کافمن- وایت، سروتیپ‌های مهمی از گونه *سالمونلا اینتریکا* که در انسان، پرندگان و دام سبب بیماری می‌شوند، در گروه‌های سرمی مشخصی جای می‌گیرند که بر طبق آن، سروتیپ *سالمونلاتایفی‌موریوم* متعلق به گروه سرمیB و سروتیپ‌های *سالمونلاگالیناروم*، *سالمونلا-پولوروم* و *سالمونلااینتریتیدیس* متعلق به گروه سرمی D می‌باشند(۵). اما در نوعی از تقسیم‌بندی اپیدمیولوژیکی برای سالمونلاها، این باکتری‌ها را به ۲ گروه سالمونلاهای تیفوئیدی و سالمونلاهای غیرتیفوئیدی تقسیم‌بندی می-کنند(۵). سالمونلاهای غیرتیفوئیدی در انسان دارای اهمیت فراوانی می‌باشند چرا که در افراد خردسال یا افراد مسنی که به ضعف سیستم ایمنی بدن دچار هستند، ممکن است که منجر به شکل شدید بیماری سالمونلوزیس شوند که می-تواند سبب مرگ هم شود. از مهم‌ترین منابع آلودگی به

سالمونلاهای غیرتیفوئیدی می‌توان به سبزیجات، تخم‌مرغ، گوشت مرغ و گوشت گاو و گوسفند اشاره کرد(۳و٦) .

عفونت‌های سالمونلایی که در پرندگان مشاهده می‌شود غالبا در اثر سروتیپ‌های تیفوئیدی یعنی *سالمونلاگالیناروم* و *سالمونلا پولوروم* و نیز برخی از سالمونلاهای متحرک (سروتیپ‌های پاراتیفوئیدی و آریزوناها) ایجاد می‌شود. *سالمونلاگالیناروم* سبب بیماری تیفوئید در پرندگان، مخصوصا پرندگان بالغ با مرگ و میر بالا می‌شود. بیماری تیفوئید در پرندگان علایمی نظیر کم خونی، افسردگی، اسهال و تنفس سخت را به همراه دارد(۷)، هم‌چنین *سالمونلاپولوروم* عامل بیماری پولوروم می‌باشد که یک بیماری سیستمیک جدی با مرگ و میر بالا، مخصوصا در پرندگان جوان است. با این که این دو بیماری، در برخی از کشورهای توسعه یافته، غالبا از صنعت طیور حذف شده-است، ولی در کشورهای در حال توسعه، شیوع زیادی دارند و خسارت‌های اقتصادی فراوانی به بار می‌آورند (۸). از مهم‌ترین سالمونلاهای پاراتیفوئیدی که در طیور ایجاد بیماری می‌کنند، می‌توان به سروتیپ‌های *سالمونلااینتریتیدیس* و *سالمونلاتایفی موریوم* اشاره کرد. عفونت‌های غیرتیفوئیدی (پاراتیفوئیدی) در پرندگان اغلب بدون نشانه است اما گاها و مخصوصا در جوجه‌های جوان سبب بی‌اشتهایی، ژولیدگی پرها، اسهال، لاغری، نشانه‌های عصبی، کوری و افتادگی بال‌ها می‌شود(۵). گزارش شده که سالمونلاهای غیرتیفوئیدی پرندگان نیز برای انسان اهمیت فراوانی دارند، چرا که در افراد بالغ می‌توانند سبب تب روده‌ای و گاستروآنتریت و در افراد دارای ضعف سیستم ایمنی و خردسالان، موجب سپتی‌سمی شوند (۹). در این ارتباط عقیده بر این است که مرغ و تخم‌مرغ‌هایی که به باکتری سالمونلا آلوده هستند، از حائز اهمیت‌ترین منابع انتقال سالمونلاها به انسان می‌باشند(۱۰و۱۱).

در سال‌های اخیر، روش مولکولی واکنش زنجیره‌ای پلی-مراز(PCR=Polymerase Chain Reaction) در قیاس با روش‌های سنتی میکروب‌شناسی، برای تشخیص سریع سالمونلاها در انواع نمونه‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد چرا که روش فوق، حساس و مقرون به صرفه می‌باشد و زمان لازم برای تشخیص را کاهش می‌دهد. همچنین گزارش شده که PCR، یک روش قابل اعتماد برای شناسایی و تمایز انواع سروتیپ‌های باکتری سالمونلا از یکدیگر می-باشد (۱۰و۱۲). براساس کارهای مولکولی و برمبنای تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی، مشخص شده که ژن *invA* برای شناسایی سریع گونه *سالمونلا اینتریکا* کاربرد دارد(۱۳). هم‌چنین گزارش شده که ژن *I137_08605* فقط در ژنوم سروتیپ‌های *سالمونلاگالیناروم و سالمونلا پولوروم* حضور دارد. از طرف دیگر اعلام شده که ژن*speC*، اختصاصی سروتیپ *سالمونلاگالیناروم* می‌باشد(۸) و ژن *lygD*(*SEN 1383*) فقط در *سالمونلااینتریتیدیس*(۱۲) و ژن *rfbJ* فقط در ژنوم سروتیپ *سالمونلاتایفی‌موریوم* وجود دارد(١٤).

با توجه به مطالب ذکر شده و نظر به اهمیت آلودگی نمونه-های مربوط به طیور با برخی از سروتیپ‌های سالمونلا و با توجه به این‌که سالمونلاهای تیفوئیدی طیور (*سالمونلا گالیناروم و سالمونلا پولوروم*) در کشورهای در حال توسعه موجب خسارات جبران ناپذیر به صنعت طیور می شوند، لذا شناسایی سریع سروتیپ‌های مذکور سالمونلا با استفاده از روش‌هایی نظیر روش PCR، می‌تواند در حذف و ممانعت از شیوع عفونت‌های ناشی از *سالمونلا گالیناروم* و *سالمونلا پولوروم*، کمک کننده باشد. بنابراین در طی پژوهش حاضر به بررسی امکان شناسائی سریع سالمونلا-های تیفوئیدی (سروتیپ‌های *سالمونلاگالیناروم* و *سالمونلاپولوروم*) و غیرتیفوئیدی (سروتیپ‌های *سالمونلااینتریتیدیس و سالمونلاتایفی‌موریوم*) طیور صنعتی؛ با استفاده از روش مولکولی multiplex-PCR پرداخته‌شد.

مواد و روش‌کار

در پژوهش توصیفی – مقطعی حاضر، در یک بازه زمانی تقریبا ٤ ماهه تعداد ٤٠ جدایه حاصله از نمونه‌های مربوط به کبد، سکوم و مدفوع طیور صنعتی، از تعدادی از آزمایشگاه‌های دامپزشکی سطح شهر تبریز جمع‌آوری و تحت شرایط استاندارد و با استفاده از ظروف و وسایل استریل در کوتاه‌ترین زمان ممکن و در کنار یخ خشک و در درون ظروف مخصوص حمل نمونه‌های میکروبی(cool box)، به آزمایشگاه میکروب‌شناسی بیمارستان دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی علوم‌پزشکی تبریز انتقال یافت. در ادامه جهت اطمینان یافتن از هویت دقیق جدایه‌های مذکور، به صورت جداگانه از همه آن‌ها به اندازه کافی (بین ۳تا ۵ کلنی خالص) برداشت کرده و در شرایط استریل در سطح محیط کشت انتخابی گزیلوز لیزین دزوکسی‌کولات آگار (XLD) کشت داده و به مدت ٢٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری کردیم. در ادامه برای شناسایی فنوتیپی هویت کلنی‌هایی که رشد کرده‌بودند، از محیط‌های افتراقی لازم (همگیMerck-Germany)، براساس پروتکل ارائه شده توسط کوئین و همکاران (۱۵) و نیز آنتی‌سرم‌های پلی‌والان مربوطه (بهارافشان، تهران- ایران) استفاده گردید.

در ادامه برای تائید مولکولی و بررسی امکان شناسائی سریع همه جدایه‌های سالمونلا که از لحاظ فنوتیپی و سرولوژیکی تایید هویت شده‌بودند، از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز چندگانه (Multiplex PCR) با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن‌های *invA*، *rfbJ*، *lygD*، *I137_08605* و *speC* استفاده شد. لازم به ذکر است که همه پرایمرهایی که در پژوهش حاضر استفاده شده، پس از انتخاب از منابع معتبر (جدول۱) و نیز بلاست کردن با استفاده از نرم-افزارهای موجود در سایت NCBI، از طریق سفارش به شرکت SGB(Shanghai Generary Biotech co., Ltd)، تهیه و استفاده گردید.

جدول ۱- مشخصات پرایمرهای استفاده شده درتحقیق حاضر

نام باکتری مورد نظر	ژن هدف	توالی پرایمرهای استفاده شده (5′→3′)	اندازه محصول PCR (جفت باز)	منبع
انواع سروتیپ‌های گونه *سالمونلااینتریکا*	*invA*	F: CGAGCAGCCGCTTAGTATTGAG R: CCATCAAATTAGCGGAGGCTTC	۸۸۱	(۱۳)
سروتیپ سالمونلا تایفی‌موریوم	*rfbJ*	F: CCAGCACCAGTTCCAACTTGATAC R: GGCTTCCGGCTTTATTGGTAAGCA	٦٦۳	(۱۴)
سروتیپ سالمونلا انتریتیدیس	*lygD*	F: CATTCTGACCTTTAAGCCGGTCAATGAG R:CCAAAAAGCGAGACCTCAAACTTACTCAG	۳۳۹	(۱۲)
سروتیپ‌های سالمونلا گالیناروم و سالمونلا پلوروم	*I137_08605*	F: CACTGGAGACTCTGAGGACA R: GGGCAGGGAGTCTTGAGATT	۲۹۰	(۸)
سروتیپ سالمونلا گالیناروم	*speC*	F: GATCTGCTGCCAGCTCAA R: GCGCCCTTTTCAAAACATA	۱۷٤	(۱۲)

PCR حداقل به ۵۰ نانوگرم در میکرولیتر از DNAهای استخراج شده خالص نیاز است، لذا برای تعیین کمیت و کیفیت DNAهای استخراجی، از دستگاه نانودراپ (Nano drop Technologies, Wilmington, DE, USA) مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز استفاده شد.

-برنامه واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز چندگانه (Multiplex PCR)

برای بررسی حضور ژن‌های *invA*، *rfbJ*، *lygD*، *I137_08605* و *speC* در باکتری‌های مورد تحقیق، از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز چندگانه و نیز مواد و ترکیباتی که در جدول ۲ ارائه‌شده‌است، استفاده شد. برنامه انجام گرفته در واکنش مذکور هم به این صورت بود که عمل واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس در مدت زمان ۵ دقیقه، واسرشته‌سازی اصلی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت۱ دقیقه، مرحله اتصال آغازگر در دمای ۵۵ درجه سلسیوس و در مدت زمان ۱ دقیقه، عمل بسط در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت۴۵ ثانیه، با انجام ۳۵ چرخه تکراری و در آخر هم یک چرخهٔ بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس در مدت زمان ۱۰ دقیقه، انجام - شد.

در نهایت هم قطعات تکثیریافته در برنامه multiplex PCR انجام شده (محصولاتPCR)، برروی ژل الکتروفورز ۱درصد بارگذاری شده و با استفاده از اشعه ماورای بنفش دستگاه Box™ Gel documentation (شرکت سینژن کمبریج، انگلستان) در مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، مشاهده و عکس برداری شده و بعد از تفکیک بررسی گردید.

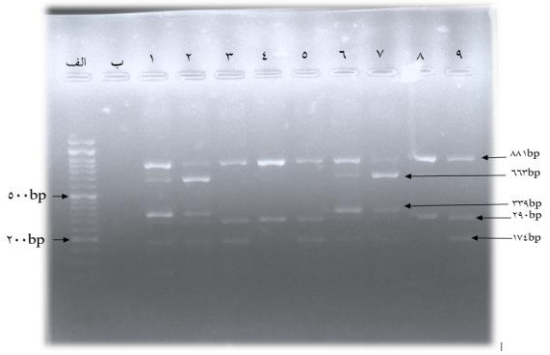
لازم به ذکر است که در مراحل مختلف پژوهش حاضر، از سوش‌های استاندارد سروتیپ‌های *سالمونلاگالیناروم* (PTCC:1093)، *سالمونلاتایفی‌موریوم* (PTCC:1709)، *سالمونلاانتریتیدیس* (PTCC:1787) و *سالمونلاپولوروم* (ATCC:19945) به عنوان کنترل‌های مثبت و سوش استاندارد باکتری *پروتئوس میرابلیس* (PTCC:1793) به عنوان کنترل منفی، که همگی از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران (تهران-ایران) تهیه شده‌بودند، استفاده می-گردید.

-استخراج DNA کروموزومی از باکتری‌های مورد آزمایش

نظر بر اینکه اولین قدم برای انجامPCR، تهیه DNA الگو است، لذا در این مرحله، برای استخراج DNA از ژنوم سالمونلاهای استاندارد و نیز جدایه‌هائی که در مرحله قبل به‌صورت فنوتیپی تایید هویت شده‌بودند، از روش جوشاندن با اندکی تغییرات استفاده‌شد. بدین منظور ابتدا از هر یک از باکتری ذکر شده، با استفاده از محیط جامد عصاره مغز و قلب (مرک-آلمان)، جداگانه کشت تازه و جوان با عمل کشت و گرمخانه‌گذاری به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس تهیه می‌شد. در ادامه به یک میکروتیوب ۲ میلی‌لیتری، مقدار ۳۰۰ میکرولیتر از بافر TE پایه(مرک-آلمان) را ریخته و زیر هود و در کنار شعله، مقدار کافی از تک کلنی‌های باکتری‌های رشد کرده در سطح محیط کشت بوسیله آنس استریل به داخل میکروتیوب مذکور منتقل می‌گردید. در ادامه محتویات میکروتیوب ورتکس شده و به مدت ۲۰ دقیقه در داخل آب جوش قرار داده‌می‌شد. سپس محتویات میکروتیوب فوق، با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه، در مدت زمان ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و ماده رویی آن، به میکروتیوب دیگر منتقل می‌گردید که حاوی DNA استخراج شده‌بود(۱۴). لازم به ذکر است، با توجه به این‌که برای انجام واکنش

جدول۲- ترکیبات مورد استفاده در واکنش Multiplex PCR انجام گرفته در تحقیق حاضر

نام ماده یا ترکیب استفاده شده	مقدار استفاده شده به ازای هر نمونه
Master mix	۱۲/۵ میکرولیتر
Primer F *inv*A	۰/۳ میکرولیتر
Primer R *inv*A	۰/۳ میکرولیتر
Primer F I*137_08605*	۰/٤ میکرولیتر
Primer R I*137_08605*	۰/٤ میکرولیتر
Primer F *spe*C	۰/۵ میکرولیتر
Primer R *spe*C	۰/۵ میکرولیتر
Primer F *rfb*J	۰/۳ میکرولیتر
Primer R *rfb*J	۰/۳ میکرولیتر
Primer F *lyg*D	۰/۳۵ میکرولیتر
Primer R *lyg*D	۰/۳۵ میکرولیتر
DNA الگو	۱ میکرولیتر
آب مقطر دوبار تقطیر	۷/۸ میکرولیتر
جمع	۲۵ میکرولیتر



نگاره۱- نمونه‌ای از نگاره ژل الکتروفورز شده محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز چندگانه که نشان‌دهنده چاهک الف) حاوی Ladder ۵۰ جفت‌باز، چاهک ب) مربوط به DNAاستخراج شده از باکتری کنترل منفی(سوش استاندارد *پروتئوس‌میرابلیس*)، چاهک۱) حاوی باندهای ۸۸۱ جفت‌بازی مربوط به ژن*invA*، ٦٦۳جفت‌بازی مربوط به ژن*rfbJ*، ۳۳۹ جفت‌بازی مربوط به ژن*lygD* و ۱۷٤ جفت‌بازی مربوط به ژن*speC* در سوش استاندارد *سالمونلا*

نتایج

در پژوهش حاضر، از بین ٤۰ جدایه منتقل شده به آزمایشگاه میکروب‌شناسی بیمارستان دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی علوم پزشکی تبریز، پس از انجام آزمایشات متداول میکروب‌شناسی تشخیصی بالینی، از نظر فنوتیپی، تعداد ۲۷ جدایه متعلق به گونهٔ *سالمونلااینتریکا* شناسائی و تعیین هویت شدند که از بین آن‌ها ۱۵ جدایهٔ سروتیپ *سالمونلا گالیناروم*، ۷ جدایهٔ سروتیپ *سالمونلاانتریتیدیس*، ۲ جدایهٔ سروتیپ *سالمونلاتایفی‌موریوم* و ۳ جدایه هم، متعلق به سروتیپ *سالمونلا پولوروم* تشخیص داده‌شدند.

هم‌چنین بعد از انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز چندگانه مشخص شد که ژن *invA* در هر ٤ سروتیپ استاندارد مورد نظر و نیز همه جدایه‌هائی که به‌صورت فنوتیپی به عنوان سروتیپی متعلق به گونهٔ *سالمونلااینتریکا* تعیین هویت شده‌بودند (۲۷ جدایه)، حضور دارد در حالی‌که ژن مذکور در همه ۱۳ جدایه‌ای که به تعلق‌شان به گونهٔ *سالمونلااینتریکا* اثبات نشد و نیز سوش استاندارد باکتری *پروتئوس‌میرابلیس* (PTCC:1793) به عنوان کنترل منفی، حضور نداشت. هم‌چنین از طرف دیگر، براساس یافته‌های ژنوتیپی تحقیق حاضر مشخص شد که ژن-های I*137_08605* و *spe*C در تمامی جدایه‌ها و سوش استاندارد سروتیپ *سالمونلا گالیناروم* حضور دارند، این درحالی است که در جدایه‌ها و سوش استاندارد سروتیپ *سالمونلا پولوروم* فقط ژن I*137_08605* وجود داشت. علاوه براین، مشخص شد که ژن‌های *rfb*J و *lyg*D در تمامی جدایه‌ها و سوش‌های استاندارد سروتیپ-های *سالمونلاانتریتیدیس* و *سالمونلاتایفی‌موریوم* و ژن *spe*C در برخی از آن‌ها حضور دارد (نگاره۱).

جدایه‌های فوق، ژن *I*137_08605 حضور نداشت درحالی‌که برخی از آن‌ها ژن *spe*C را دارا بودند. در مورد ۲ جدایه که به عنوان *سالمونلا تایفی موریوم* تایید شدند هم نتایج کاملا مشابه *سالمونلا انتریتیدس* بود به این صورت که، جدایه‌های مذکور واجد ژن‌های *inv*A، *rfb*J و *lyg*D بودند اما ژن *I*137_08605 را نداشتند، البته ژن *spe*C هم فقط در یکی از آن‌ها مشاهده گردید. از طرف دیگر، جدایه‌هائی که براساس نتایج فنوتیپی تحقیق حاضر به عنوان سروتیپ *سالمونلاپولوروم* در نظر گرفته شده‌بودند هم همگی واجد ژن‌های *inv*A و*I*137_08605 بودند ولی ژن‌های *lyg*D، *rfb*J و *speC* در آن‌ها حضور نداشت.

در قیاس با یافته‌های تحقیق حاضر، در طی پژوهشی که دا کروز روکا و همکاران در سال ۲۰۱٤ در برزیل انجام‌دادند، مشاهده‌کردند که ژن*inv*A در همه جدایه‌های سالمونلا دیده می‌شود(۱۳)که این نتیجه با یافته‌های پژوهش حاضرهمخوانی‌دارد چرا که در مطالعه حاضر نیز ژن*inv*A در همه جدایه‌ها مشاهده‌شد (نگاره۱). در مطالعه یزدی و همکاران هم مشخص شده که همه جدایه‌های سالمونلا دارای ژن *inv*A بوده‌اند که(٤) نتیجه پژوهش حاضر با یافته مطالعه مذکور در این مورد همخوانی دارد چرا که در پژوهش حاضر نیز این ژن در همه جدایه‌های *سالمونلا اینتریکا* مشاهده‌شد (نگاره۱).

از طرف دیگر در مطالعه الزغیبی و همکاران در سال ۲۰۱۸ هم مشخص شده که ژن *inv*A در ژنوم تمامی سروتیپ های سالمونلا حضور دارد ولی ژن*rfbJ* فقط در *سالمونلا-تایفی موریوم*، ژن *slg*C در سروتیپ‌های *سالمونلاگالیناروم* و *سالمونلاپولوروم* و ژن*spe*C در *سالمونلا گالیناروم* وجود دارد(١٤). مشاهده می‌شود که یافته‌های پژوهش حاضر در مورد وجود ژن‌های *inv*A و*spe*C با نتایج مطالعه مذکور همخوانی دارد ولی در مورد ژن*rfbJ* همخوانی ندارد چرا که ژن مذکور در مطالعه ما، علاوه بر *سالمونلا تایفی‌موریوم* در *تایفی‌موریوم*، چاهک۲) حاوی باندهای ۸۸۱ جفت‌بازی مربوط به ژن *inv*A، ٦٦۳جفت‌بازی مربوط به ژن*rfbJ*، ۳۳۹ جفت‌بازی مربوط به ژن*lyg*D و باند۱۷٤ جفت‌بازی مربوط به ژن*spe*C در سوش استاندارد *سالمونلاانتریتیدیس*، چاهک۳) حاوی باندهای ۸۸۱ جفت‌بازی مربوط به ژن*inv*A، ۲۹۰جفت‌بازی مربوط به ژن*I*137_08605 و ۱۷٤ جفت‌بازی مربوط به ژن*spe*C در سوش استاندارد *سالمونلاگالیناروم*، چاهک٤) حاوی باندهای ۸۸۱ جفت‌بازی مربوط به ژن*inv*A و ۲۹۰جفت‌بازی مربوط به ژن*I*137_08605 در سوش استاندارد *سالمونلاپولوروم*، چاهک٥) حاوی باندهای ۸۸۱ جفت‌بازی مربوط به ژن*inv*A، ۲۹۰جفت‌بازی مربوط به ژن*I*137_08605 و ۱۷٤جفت‌بازی مربوط به ژن*spe*C در جدایه *سالمونلاگالیناروم*، چاهک٦) حاوی باندهای ۸۸۱ جفت‌بازی مربوط به ژن*inv*A، ٦٦۳جفت‌بازی مربوط به ژن*rfbJ*، ۳۳۹ جفت‌بازی مربوط به ژن *lyg*D و ۱۷٤جفت‌بازی مربوط به ژن*spe*C در جدایه *سالمونلا تایفی‌موریوم*، چاهک۷) حاوی باندهای ۸۸۱ جفت‌بازی مربوط به ژن*inv*A، ٦٦۳جفت‌بازی مربوط به ژن*rfbJ*، ۳۳۹جفت‌بازی مربوط به ژن *lyg*D و ۱۷٤ جفت‌بازی مربوط به ژن*spe*C در جدایه *سالمونلا انتریتیدیس*، چاهک۸) حاوی باندهای ۸۸۱ جفت‌بازی مربوط به ژن*inv*A و۲۹۰جفت‌بازی مربوط به ژن*I*137_08605 در جدایه *سالمونلاپولوروم* و چاهک۹) حاوی باندهای ۸۸۱ جفت‌بازی مربوط به ژن*inv*A، ۲۹۰جفت‌بازی مربوط به ژن*I*137_08605 و باند۱۷٤ جفت‌بازی مربوط به ژن*spe*C در جدایه *سالمونلاگالیناروم*، می‌باشد

بحث

مطابق یافته‌های قسمت تشخیص ژنوتیپی تحقیق حاضر(نگاره۱)، مشخص شد که ژن*inv*A درهمه جدایه‌های *سالمونلااینتریکا* حضور دارد. همچنین در همه جدایه‌هایی که از لحاظ فنوتیپی به عنوان سروتیپ *سالمونلا گالیناروم* تشخیص داده‌شدند، ژن*inv*A حضور داشت و در عین حال، ژن‌های *rfb*J و *lyg*D در هیچ‌کدام از جدایه‌های مذکور مشاهده نشد البته در نقطه مقابل هم، ژن‌های *I*137_08605 و *spe*C در تمامی جدایه‌های فوق مشاهده گردید. همچنین جدایه‌هایی که به عنوان سروتیپ *سالمونلاانتریتیدیس* تشخیص داده شده بودند، همگی واجد ژن*inv*A بودند و نیز همگی دارای دو ژن *rfb*J و *lyg*D بودند. هم‌چنین در

انتریتیدیس و سالمونلا تایفی موریوم) دیده نشد (نگاره۱). همچنین پژوهشی که توسط پال و همکاران به انجام رسیده مشخص کرده که ژن‌های *glg*C و *spe*C در تمامی جدایه-های *سالمونلا گالیناروم* حضور دارند(۱۷) ، این یافته‌ها هم نشان دهنده همخوانی بالا با نتایج پژوهش حاضر دارد زیرا در تحقیق ما نیز ژن *spe*C در تمامی جدایه های *سالمونلا گالیناروم* مشاهده شد (نگاره۱).

مطابق یافته‌های تحقیق حاضر(نگاره۱)، مشخص شد که ژن*inv*A درهمه جدایه‌های *سالمونلااینتریکا* حضور دارد. همچنین در همه جدایه‌هایی که از لحاظ فنوتیپی به عنوان سروتیپ *سالمونلا گالیناروم* تشخیص داده‌شدند، ژن *inv*Aحضور داشت و در عین حال، ژن‌های *rfb*J و *lyg*D در هیچ‌کدام از جدایه‌های مذکور مشاهده نشد که این یافته مهم می‌تواند نشانگر این امر باشد که اگر این ۲ ژن در جدایه‌ای از سالمونلا حضور داشته‌باشد، جدایه مذکور سروتیپ *سالمونلاگالیناروم* نبوده و باید تمرکز روی سایر سروتیپ‌ها باشد، هرچند که این ادعا می‌تواند در تحقیقات بعدی مورد نقد و بررسی قرار گیرد، البته در نقطه مقابل هم، چون ژن‌های *I*137_08605 و *spe*C در تمامی جدایه-های فوق مشاهده گردید، به نظر می‌رسد که این موضوع می‌تواند به عنوان ملاک تشخیص ژنوتیپی سروتیپ *سالمونلا گالیناروم* از سایر سروتیپ‌های گونه *سالمونلا اینتریکا*باشد. همچنین جدایه‌هایی که به عنوان سروتیپ *سالمونلاانتریتیدیس* تشخیص داده شده بودند، همگی واجد ژن*inv*A بودند و نیز همگی دارای دو ژن *rfb*J و *lyg*D بودند که این یافته می‌تواند برای جداسازی *سالمونلا-انتریتیدس* (سالمونلای غیرتیفوئیدی) و *سالمونلا گالیناروم* (سالمونلای تیفوئیدی) از لحاظ ژنوتیپی استفاده شود. هم-چنین در جدایه‌های فوق، ژن *I*137_08605 حضور نداشت درحالی‌که برخی از آن‌ها ژن *spe*C را دارا بودند. در مورد ۲ جدایه که به عنوان *سالمونلا تایفی موریوم* تایید شدند هم *سالمونلا انتریتیدیس* هم دیده شد (نگاره۱). همچنین الزغیبی و همکاران در سال ۲۰۱۹ هم به این نتیجه رسیدند که ژن *inv*A در هر ٤ سروتیپ *سالمونلا انتریتیدیس*، *سالمونلاگالیناروم*، *سالمونلا پولوروم و سالمونلا دابلین* حضور دارد ولی ژن *lyg*D فقط در *سالمونلا انتریتیدیس* دیده‌میشود. ژن*slg*C هم در هر ۲ سروتیپ *سالمونلا گالیناروم و سالمونلاپولوروم* مشاهده گردید و نیز ژن *spe*C اختصاصی سروتیپ *سالمونلاگالیناروم* گزارش شد(۱۲). در پژوهش حاضر نیز مشاهده گردید که ژن *inv*A در همه جدایه‌ها حضور دارد که این امر نشان دهنده همخوانی با نتیجه مطالعه مذکور در مورد ژن مذکور می‌باشد. همچنین در مورد سایر ژن‌ها هم نتایج مطالعه مذکور با یافته‌های پژوهش حاضر همخوانی بالایی را نشان می‌دهد. البته در مورد حضور ژن*lyg*D، عدم همخوانی با یافته‌های تحقیق حاضر مشاهده می‌شود چرا که این ژن علاوه بر *سالمونلا-انتریتیدیس* در *سالمونلا تایفی موریوم* هم حضور داشت.

در طی مطالعه‌ای توسط زیونگ و همکاران در سال ۲۰۱۷ هم مشخص شده که ژن *lyg*D فقط در *سالمونلا انتریتیدیس* و ژن *flh*B فقط در سروتیپ‌های *سالمونلاگالیناروم* و *سالمونلاپولوروم* حضور دارد(١٦). ملاحظه می‌شود که نتایج پژوهش مذکور در مورد اختصاصی بودن ژن*lyg*D برای *سالمونلا انتریتیدیس* با یافته‌های مطالعه ما همخوانی ندارد چرا که ژن مذکور علاوه بر *سالمونلا انتریتیدیس در سالمونلا تایفی موریوم* هم دیده شد (نگاره۱). همچنین نتایج پژوهش زیونگ و همکاران در سال ۲۰۱۸ مشخص کرده که ژن *I*137_08605 در ژنوم هر ۲ *سروتیپ سالمونلاگالیناروم و سالمونلا پولوروم* حضور دارد(۸). این امر همخوانی بالای نتیجه بدست آمده در مطالعه مذکور با پژوهش حاضر را نشان می‌دهد چرا که ژن فوق در تحقیق ما نیز فقط در *سالمونلا گالیناروم و سالمونلاپولوروم* حضور داشت و در سایر سروتیپ های سالمونلا (*سالمونلا*

سروتیپ‌های سالمونلا ربط داشته‌باشد . به عنوان مثال ممکن است با توجه به فاصلهٔ زمانی بین پژوهش حاضر با تحقیقات مشابه دیگر، تغییراتی در ژنوم سروتیپ‌های سالمونلای مورد مطالعه در این بازه زمانی بوجودآمده‌باشد که باعث این تفاوت‌ها گردد.

با توجه به نتایج پژوهش حاضر به نظر می‌رسد که می‌توان نتیجه‌گرفت که با استفاده از روش multiplex PCR می‌توان سالمونلاهای تیفوئیدی و سالمونلاهای غیرتیفوئیدی طیور را از همدیگر در مدت زمان کوتاهی تشخیص داد، هرچند که با استفاده از ژن‌های بررسی شده در تحقیق حاضر نمی-شود به طریق ژنوتیپی سروتیپ‌های *سالمونلا انتریتیدیس و سالمونلاتایفی‌موریوم* را از همدیگر تفکیک کرد، ولی در وهله اول جداسازی ژنوتیپی سالمونلاهای تیفوئیدی و غیرتیفوئیدی طیور امکان پذیر بوده و در گام بعد می‌توان ۲ سروتیپ *سالمونلا گالیناروم* و *سالمونلاپولوروم* را از همدیگر سریعا تفکیک کرد. با توجه به این که در صورت تشخیص سالمونلای تیفوئیدی، غالبا درمان انجام نمی‌پذیرد و مبادرت به حذف گله طیور می‌شود، لذا تشخیص سریع این ۲ سروتیپ سالمونلا که عامل عفونت‌های تیفوئیدی در پرندگان هستند، می‌تواند به ریشه‌کن کردن آن‌ها در کشورهای در حال توسعه بسیار کمک کند. در واقع به نظر می‌رسد که بررسی وجود ژن‌های اختصاصی *سالمونلا-گالیناروم*، *سالمونلاپولوروم*، *سالمونلاانتریتیدیس* و *سالمونلاتایفی‌موریوم* در جدایه‌هایی که از کبد، سکوم و مدفوع طیور بدست آمده‌اند، این امکان را فراهم خواهد کرد که با استفاده از روش‌های مولکولی نظیر PCR، در مدت زمان کمتری سالمونلاهای تیفوئیدی (*سالمونلا گالیناروم و سالمونلاپولوروم*) از سالمونلاهای پاراتیفوئیدی یا همان غیرتیفوئیدی (*سالمونلا انتریتیدیس* و *سالمونلا تایفی‌موریوم*) طیور تشخیص داده‌شوند، هرچند احتمالا نتایج کاملا مشابه *سالمونلا انتریتیدس* بود به این صورت که، جدایه‌های مذکور واجد ژن‌های *inv*A، *rfb*J و *lyg*D بودند اما ژن *I*137_08605 را نداشتند، البته ژن *spe*C هم فقط در یکی از آن‌ها مشاهده گردید. از طرف دیگر، جدایه‌هائی که براساس نتایج فنوتیپی تحقیق حاضر به عنوان سروتیپ *سالمونلاپولوروم* در نظر گرفته شده‌بودند هم همگی واجد ژن‌های *inv*A و*I*137_08605 بودند ولی ژن‌های *lyg*D، *rfb*J و *speC* در آن‌ها حضور نداشت. لذا می‌توان عنوان کرد که به طور مستقیم و با استفاده از پرایمر های اختصاصی ژن*I*137_08605 مورد استفاده در این پژوهش، سالمونلاهای تیفوئیدی (*سالمونلاگالیناروم* و *سالمونلاپولوروم*) و سالمونلاهای غیرتیفوئیدی (*سالمونلا-انتریتیدس* و *سالمونلاتایفی‌موریوم*) طیور را می‌توان براساس یافته‌های ژنوتیپی از همدیگر تفکیک کرد، هم‌چنین تا حدودی هم می‌توان با تکیه بر وجود ژن *spe*C در ژنوم، سروتیپ‌های *سالمونلاپولوروم و سالمونلا گالیناروم* را از همدیگر تشخیص داد، البته این ادعا می‌تواند با تحقیق بیشتر در مطالعات آینده در مورد *سالمونلاپولوروم* قطعیت بیشتری پیدا کند ولی به نظر می‌رسد که سروتیپ‌های *سالمونلا انتریتیدیس و سالمونلا تایفی موریوم* را فقط با تکیه بر بررسی حضور ژن‌های بررسی شده در تحقیق حاضر، نمی‌توان به طور کامل و با قطعیت از همدیگر تشخیص داد.

با بررسی نتایج تحقیقات مشابه، به نظر می‌رسد که از دلایل اصلی اختلاف‌های مشاهده شده بین نتایج مطالعات مذکور با یافته‌های پژوهش حاضر، امکان دارد به علت تفاوت در منشا نمونه‌ها و مناطق جغرافیایی باشد . مثلا سالمونلاهای بررسی شده در پژوهش حاضر، از کبد، سکوم و مدفوع طیورصنعتی جدا شده‌بود که ممکن است در پژوهش‌های مشابه منبع جداشدن آن‌ها فرق داشته باشد از سویی دیگر این تفاوت‌ها احتمالا می‌تواند به تغییر در ژنوم

طراحی کیت مولکولی اختصاصی لازم به این منظور، نیاز به مطالعات بیشتری دارد.

سپاسگزاری

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته میکروبیولوژی-گرایش میکروب‌های بیماری‌زا، مصوب دانشگاه آزاداسلامی واحد تبریز می‌باشد که بدینوسیله از حمایت‌های مادی و معنوی مسئولین دانشگاه کمال تشکر را داریم.

فهرست منابع

1. Jafari R, Fazlara A, Dalirannia A. An investigation into salmonella contamination of native hens'eggs in ahvaz. Scientific-Research Iranian Veterinary Journal. 2006;2(13):58-63.
2. Azizpour A. A survey on prevalence of Salmonella enteritidis and Salmonella typhimurium serotypes in broiler flocks of Ardabil province and determination of their antibiotics resistance to five antibacterial agents widely used in the Iranian medical field. Journal of Health. 2018;9(2):143-51.
3. Azizpour A. Prevalence and antibiotic resistance of Salmonella serotypes in chicken meat of Ardabil, Northwestern Iran. Iranian Journal of Medical Microbiology. 2021;15(2):232-46.
4. Yazdi-Amirkhiz S, Anzabi Y, Mahmazi S. Evaluation of rapid detection and investigation of the presence of spv operon virulence genes in Salmonella isolates using simplex PCR and multiplex PCR molecular methods. Veterinary Clinical Pathology The Quarterly Scientific Journal. 2020;14(55):237-50.
5. Sabeghi M, Anzabi Y. Determination of serogroup and antibiotic resistance pattern of Salmonellas isolated from commercial laying poultry of Tabriz area. Veterinary Clinical Pathology. 2019;13.(۵۰)
6. Fardous J, Shamsuzzaman S. Detection of potential pathogenic aerobic bacteria from egg shell and egg contents of hen collected from poultry. Bangladesh Medical Research Council Bulletin. 2015;41(2):67-72.
7. Onuigbo E, Iseghohimhen J, Chah K, Gyang M, Attama A. Chitosan/alginate microparticles for the oral delivery of fowl typhoid vaccine: Innate and acquired immunity. Vaccine. 2018;36(33):4973-8.
8. Xiong D, Song L, Pan Z, Jiao X. Identification and discrimination of Salmonella enterica serovar gallinarum biovars pullorum and gallinarum based on a one-step multiplex PCR assay. Frontiers in microbiology. 2018;9:1718.
9. Mezal EH, Sabol A, Khan MA, Ali N, Stefanova R, Khan AA. Isolation and molecular characterization of Salmonella enterica serovar Enteritidis from poultry house and clinical samples during 2010. Food microbiology. 2014;38:67-74.
10. Azizpour A. A Study of Salmonella Spp. Contamination Rate of Eggs and Assessment of their Antibiotic Resistance Pattern in Ardabil, Iran Qom University of Medical Sciences Journal. 2020;14(1):38-50.
11. Miranzadeh H, T Salehi Z, Karimi V. The count of aerobic mesophill bacteria and isolate salmonella Spp on egg in Isfahan1389. Veterinary Researches & Biological Products. 2012;25(1):31-5.
12. Alzwghaibi AB, Yahyaraeyat R, Fasaei BN, GhalyanchiLangeroudi A, Salehi TZ. Identification and discrimination of Salmonella Enteritidis, S. Pullorum, S. Gallinarum and S. Dublin using Salmonella specific genomic regions amplification assay. Iranian Journal of Veterinary Medicine. 2019;13(2):131-42.
13. Rocha D, Marinho A, Reis M, Borges I, Ramos F, Loureiro E. Perfil epidemiológico e caracterização molecular de Salmonella Typhi isoladas no Estado do Pará, Brasil. Revista Pan-Amazônica de Saúde. 2014;5(4):10.

14. Alzwghaibi A, Yahyaraeyat R, Fasaei BN, Langeroudi AG, Salehi TZ. Rapid molecular identification and differentiation of common Salmonella serovars isolated from poultry, domestic animals and foodstuff using multiplex PCR assay. Archives of microbiology. 2018;200(7):1009-16.
15. Quinn PJ, Markey BK, Leonard FC, Hartigan P, Fanning S, Fitzpatrick E. Veterinary microbiology and microbial disease: John Wiley & Sons; 2011.
16. Xiong D, Song L, Tao J, Zheng H, Zhou Z, Geng S, et al. An efficient multiplex PCR-based assay as a novel tool for accurate inter-serovar discrimination of Salmonella Enteritidis, S. Pullorum/Gallinarum and S. Dublin. Frontiers in microbiology. 2017;8:420.
17. Pal S, Dey S, Batabyal K, Banerjee A, Joardar SN, Isore DP. Evaluation of a Multiplex PCR Assay for Rapid Diagnosis of Fowl Typhoid. Int J Curr Microbiol App Sci. 2019;8(6):2054-8.