Applied Biology, Volume 10, Issue 38, 2020

Molecular survey of *slyA, stn, sopB, Phop/Q* and *spvc* genes of *Salmonella typhimurium* isolated from clinical samples by multiplex PCR[1]

Zahra Masoumalinejad | PhD. Student, Department of Microbiology, Islamic Azad University, Sirjan Branch, Sirjan, Iran **(Corresponding Author).** zahra.masoumy6623@gmail.com
Babak Kheirkhah | Assistant Professor, Department of Microbiology, Islamic Azad University, Kerman branch, Kerman, Iran. babak.kheirkhah4@gmail.com
Fahimeh Mirzadeh | PhD. Student, Department of Microbiology, Islamic Azad University, Sirjan Branch, Sirjan, Iran. fahimeh.mirzadeh13@gmail.com

Abstract

Background: *Salmonella* is a Gram-negative intestinal organism and causes food poisoning in human. *Salmonella* has five virulence genes, *stn*, *Phop/Q*, *spvc*, *slyA* and *sopB*. These genes encode proteins in different parts of the bacteria that can confront with immune system, and the complement system and can cause death in the cell. The aim of this study was to detect *slyA*, *stn*, *sopB*, *Phop/Q* and *spvc* genes in *Salmonella typhimurium* strains isolated from clinical samples by the multiplex PCR method and to determine antibiotic resistance patterns.

Material and Methods: In this descriptive cross-sectional study, in 2016, 60 stool samples in order to identify *Salmonella typhimurium* from Alborz-Karaj Hospital were collected. After confirmation of the strains by using standard biochemical and microbiological tests, an antibiotic susceptibility test was performed on a Muller Hinton Agar medium and based on Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines. Multiplex PCR assay was performed to detect virulence genes using specific primers.

Results: The results of the antibiotic susceptibility test showed that all isolates were sensitive to imipenem, gentamicin and amikacin. Also, molecular findings showed that the prevalence rates of *Phop/Q*, *slyA* and stn genes were 100%, 98.3%, and 91.6%, respectively. While *sopB* and *Spvc* genes were not observed in isolates of *Salmonella typhimurium*.

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.

Keywords: Salmonella typhimurium, Virulence genes, Multiplex-PCR.

1. **Received:** 2019/08/01 ; **Accepted:** 2020/04/26

**Copyright © the authors

بیولوژی کاربردی، دوره ۱۰، شماره ۳۸، تابستان ۱۳۹۹

بررسی مولکولی ژن‌های *slyA*، *stn*، *sopB*، *Phop/Q* و *spvc* در *سالمونلا تیفی‌موریوم* جدا شده از نمونه‌های بالینی با روش Multiplex PCR[1]

زهرا معصومعلی‌نژاد | دانشجوی دکتری، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سیرجان، سیرجان، ایران (**نویسنده مسئول**). zahra.masoumy6623@gmail.com

بابک خیرخواه | استادیار، گروه میکروب‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرمان، کرمان، ایران. babak.kheirkhah4@gmail.com

فهیمه میرزاده | دانشجوی دکتری، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سیرجان، سیرجان، ایران. fahimeh.mirzadeh13@gmail.com

چکیده

سابقه و هدف: سالمونلا یک ارگانیسم روده‌ای گرم‌منفی و عامل بروز مسمومیت‌های غذایی در انسان می‌باشد. جنس سالمونلا دارای پنج ژن ویرولانس *stn*، *Phop/Q*، *spvc*، *slyA* و *sopB* می‌باشد. این ژن‌ها پروتئین‌هایی را در قسمت‌های مختلف باکتری کد می‌نمایند که مقابله با سیستم ایمنی، کمپلمان و مرگ داخل سلول را باعث می‌شوند. هدف از مطالعه حاضر شناسایی ژن‌های ویرولانس در سویه‌های *سالمونلا تیفی‌موریوم* جدا شده از نمونه‌های بالینی به روش Multiplex PCR و تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه توصیفی- مقطعی طی سال ۱۳۹۶ تعداد ۶۰ نمونه مدفوع به‌منظور شناسایی *سالمونلا تیفی‌موریوم* از بیمارستان البرز شهر کرج جمع‌آوری شد. آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی روی محیط مولر هینتون آگار و بر اساس استاندارد (CLSI) انجام گردید. آزمون Multiplex PCR جهت تشخیص ژن‌های ویرولانس با استفاده از آغازگرهای اختصاصی انجام شد.

نتایج: نتایج آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی نشان داد تمامی ایزوله‌ها دارای حساسیت به ایمی‌پنم، جنتامایسین و آمیکاسین بودند. همچنین، فراوانی ژن‌های *Phop/Q*، *slyA* و *stn* به‌ترتیب برابر ۱۰۰، ۹۸/۳ و ۹۱/۶ درصد بود و ژن‌های *sopB* و *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.

کلیدواژه‌ها: *سالمونلا تیفی‌موریوم*، ژن‌های ویرولانس، Multiplex PCR.

---

۱. **تاریخ دریافت:** ۱۳۹۸/۰۵/۱۰ ؛ **تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۹/۰۲/۰۷

۱. مقدمه

سالمونلاها از باکتری‌های مهم خانواده انتروباکتریاسه هستند که از نظر بیوشیمیایی و سرولوژیك بسیار متنوع می‌باشند. سالمونلا در انسان می‌تواند عامل بیماری‌هایی همچون گاستروانتریت، تب روده‌ای (تیفوئید و پاراتیفوئید) و باکتریمی باشد (۱). عفونت‌های سالمونلا یکی از معضلات اصلی صنعت دامپروری جهان و یکی از بیماری‌های مشترك انسان و دام است که هر ساله خسارات عمده‌ای به سرمایه دامی و جامعه انسانی وارد می‌سازد (۲). در حال حاضر بیش از ۲۵۵۰ سروتیپ سالمونلا شناسایی شده که برخی از آن‌ها میزبان‌های اختصاصی نداشته و در انسان و اکثر حیوانات عفونت ایجاد می‌کنند (۳).

سالمونلا انتریکا سروار انتریتیدیس از مهم‌ترین عوامل مسمومیت‌های غذایی در انسان و حیوان در جهان به‌شمار می‌رود. گاستروانتریت شایع‌ترین و متداول‌ترین عفونت سالمونلایی است که توسط این سروتیپ ایجاد می‌گردد (۴). سالمونلا پس از ورود به معده می‌تواند وارد سلول‌های M واقع در پلاك‌های پیر در بخش انتهایی روده کوچك شده و این سلول را مورد تهاجم قرار دهد. اکثر فاکتورهای ویرولانس باکتری سالمونلا توسط سیستم ترشحی تیپ III کد می‌شود (۵). چهار پروتئین اصلی SIP (A، B، C و D) توسط یك اپرون پلی‌سیسترونیك منفرد کد می‌شوند که در مجاورت موقعیت inv/spa قرار گرفته است (۶). از مهم‌ترین عوامل ویرولانس، ژن‌های پلاسمید ویرولانس یا spv می‌باشند. این اپرون واجد ۵ ژن ویرولانس *stn*، *Phop/Q*، *spvc*، *slyA* و *sopB* می‌باشد (۷). این ژن‌ها پروتئین‌هایی را در قسمت‌های مختلف باکتری کد می‌نمایند که مقابله با سیستم ایمنی، کمپلمان و مرگ داخل سلول را باعث می‌شوند. SIPها روی کروموزوم اصلی باکتری واقع شده‌اند. ژن‌های ویرولانس مستقر در این جزایر نقش بسیار با اهمیتی در عفونت‌های ناشی از این باکتری‌ها دارند و در تهاجم سالمونلاها شرکت می‌کنند. این جزایر هم از نظر اندازه و هم از نظر محتوای ژنی بسیار متفاوت به‌نظر می‌رسند (۸). ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سالمونلاها باعث مقاومت آن‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها می‌گردند. گونه‌های سالمونلا این توانایی را دارند که از راه‌های مختلف مقاومت آنتی‌بیوتیکی را کسب نمایند. کسب مقاومت آنتی‌بیوتیکی از طریق چندین مکانیسم صورت می‌گیرد: ایجاد موتاسیون‌های کروموزومی انتقال مقاومت به سایر باکتری‌ها از طریق تبادلات ژنتیکی که غالبا به‌وسیله پلاسمیدها ایجاد می‌شود، کاهش قابلیت نفوذ آنتی‌بیوتیک‌ها از دیواره سلولی، غیرفعال‌سازی آنزیماتیک آنتی‌بیوتیک‌ها، مکانیسم Efflux pump برای خارج کردن آنتی‌بیوتیک‌ها و تغییر جایگاه هدف

آنتی‌بیوتیک از جمله این مکانیسم‌ها می‌باشند (۱). در حال حاضر بروز مقاومت آنتی‌بیوتیکی به مشکلی روبه گسترش در میان گونه‌های سالمونلا تبدیل شده و معضلات بهداشتی و پزشکی زیادی را در کنترل و درمان عفونت‌های حاصل از این باکتری به‌وجود آورده است، بدین جهت بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در نمونه‌های بالینی سالمونلا بسیار حائز اهمیت می‌باشد (۹). آزمایش‌های سریع و قابل اعتماد در آزمایشگاه‌های تشخیص پزشکی، دامپزشکی و صنایع غذایی به‌منظور تشخیص سالمونلاها امری مهم و ضروری به‌نظر می‌رسد. از آن‌جا که روش‌های متداول جداسازی سالمونلاها امری پرزحمت بوده و حداقل به ۳ روز وقت نیاز دارد، امروزه سعی بر این است که از روش‌های سریع، اما حساس و با ویژگی بالا استفاده گردد. در حال حاضر، توسعه روش‌های زیست‌شناسی مولکولی این امکان را فراهم ساخته که بتوان با استفاده از این روش‌ها با دقت و سرعت زیاد به شناسایی عوامل بیولوژیك پرداخت (۱۰). در روش Multiplex PCR به دلیل استفاده از چند آغازگر، توانایی ازدیاد و شناسایی چندین ژن به‌صورت هم‌زمان وجود دارد. شناسایی ژن‌های ویرولانس به روش Multiplex PCR راهی را در جهت تشخیص سریع و ایجاد سالمونلاهای عاری از پلاسمید ویرولانس که آن را بتوان به‌عنوان واکسن عرضه نمود، هموار می‌کند. همچنین، می‌توان از نحوه انتشار و منشاء آلودگی جهت بررسی‌های اپیدمیولوژیکی مولکولی و مبارزه سریع با آن استفاده نمود. شناسایی ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی و تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی یکی از راه‌های مهم در درمان مناسب و صحیح بیماری‌های ناشی از سالمونلا و جلوگیری از به وجود آمدن سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیك می‌باشد (۲). در نتیجه شناسایی و تایید این ژن‌ها می‌تواند در بررسی اپیدمیولوژیکی وسیع، مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی، تولید واکسن، میزان حدت، پیشگیری و درمان نقش داشته باشد.

لذا، هدف مطالعه حاضر شناسایی ژن‌های *slyA*، *stn*، *sopB*، *Phop/Q* و *spvc* در سویه‌های *سالمونلا تیفی‌موریوم* جدا شده از نمونه‌های بالینی به‌روش Multiplex PCR و تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی است.

۲. مواد و روش‌ها

در این مطالعه توصیفی- مقطعی که در یك بازه زمانی ۹ ماهه از ابتدای فروردین لغایت پایان آذر ۱۳۹۶ انجام گردید، تعداد ۶۰ نمونه مدفوع (حجم نمونه با استفاده از فرمول کوکران محاسبه شد) به‌منظور شناسایی *سالمونلا تیفی‌موریوم* از بیماران مبتلا به گاستروانتریت سالمونلایی

مراجعه‌کننده به بیمارستان البرز شهر کرج جمع‌آوری شد. نمونه‌گیری از افراد، پس از مشخص نمودن هدف مطالعه برای آن‌ها و کسب رضایت کتبی آگاهانه صورت پذیرفت.[۱] به‌منظور تایید سویه‌ها، تمامی آن‌ها روی محیط *سالمونلا شیگلا* (SS) آگار منتقل شد و گرم‌خانه‌گذاری به‌مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس انجام گرفت. سپس، با استفاده از تست‌های استاندارد بیوشیمیایی و میکروبیولوژی نظیر سیمون سیترات، TSI، MRVP، SIM و تولید اوره‌آز و اندول مورد بررسی قرار گرفتند. کلونی‌های جدا شده با ویژگی بیوشیمیایی لاکتوز و اوره منفی، H2S، حرکت، سیترات و متیل رد مثبت به‌عنوان یك جدایه متعلق به جنس سالمونلا تعیین گردیدند. آزمون سروتایپینگ برای مشخص نمودن آنتی‌ژن‌های سوماتیك (O)، فلاژله‌ها (H) و کپسولی (Vi) با استفاده از آنتی‌سرم‌های پلی‌والان و مونووالان تهیه شده از شرکت بهار افشان به روش آگلوتیناسیون اسلایدی انجام گردید. از سویه استاندارد *سالمونلا انتریکا* زیرگروه انتریکا سروار تیفی‌موریوم ATCC 14028 تهیه شده از بانك میکروبی دانشگاه علوم پزشکی ایران، به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

۳. آزمون انتشار از دیسک

آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی روی محیط مولر هینتون آگار و با استفاده از روش انتشار از دیسك روی تمامی سویه‌های جمع‌آوری شده برای آنتی‌بیوتیك‌های آموکسی‌سیلین، تتراسیکلین، ایمی‌پنم، آمیکاسین، استرپتومایسین، جنتامایسین، کلرامفنیکل، تری‌متوپریم سولفومتاکسازول، آمپی‌سیلین و سفتریاکسون ب اساس دستورالعمل استاندارد آزمایشگاه و بالین (CLSI, 2015) انجام گرفت (۱۱). سوسپانسیون تهیه شده به‌وسیله سوآپ استریل پنبه‌ای روی محیط مولر هینتون آگار به‌صورت متراکم کشت داده شد. سپس، دیسك‌های آنتی‌بیوتیکی با پنس استریل در سطح محیط قرار گرفته و محیط کشت به‌مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در انکوباتور قرار داده شد. سپس، قطر هاله عدم رشد به وسیله کولیس اندازه‌گیری شد.

٤. شناسایی مولکولی ژن‌های ویرولانس

به‌منظور تکثیر ژن‌های *slyA*، *stn*، *sopB*، *Phop/Q* و *spvc* ابتدا تمامی جدایه‌ها به‌مدت

---

۱. کد اخلاق: IR.IAU.K.REC.1396.59.

۲۴ ساعت روی محیط تری‌بتی‌کیس سوی‌براث (مرك، آلمان) کشت داده شد. سپس، استخراج DNA ژنومی طبق دستورالعمل شرکت سازنده و با استفاده از کیت DNA سیناژن انجام گردید. جهت تایید درجه خلوص DNA استخراج شده، از دستگاه OD260/280nm استفاده شد. به‌منظور ردیابی ژن‌های ویرولانس در سویه‌های تحت مطالعه از روش Multiplex PCR و توالی‌های اختصاصی الیگونوکلئوتیدی پرایمرهای موجود در جدول شماره ۱ استفاده گردید (۱۲). در ابتدا جهت اطمینان از وجود ژن‌های مورد نظر در نمونه‌های مورد آزمایش و با توجه به امکان رقابت ژن‌های مورد نظر در واکنشMultiplex PCR ، برای هر ژن با استفاده از پرایمر اختصاصی آن، یک تست PCR انجام گردید. در نهایت، واکنش Multiplex PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر PCR master mix 5X (سینا کلون، ایران)، ۱ میکرولیتر از هر یك از پرایمرها به غلظت ۰/۸ میکرومولار، ۳ میکرولیتر از DNA الگو (۱۰ نانوگرم) و ۷/۵ 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 طویل‌سازی در ۷۲ درجه سلسیوس به‌مدت ۱۲۰ ثانیه. در پایان، محصولات واکنش Multiplex PCR همراه با سویه استاندارد *سالمونلا انتریکا* زیرگروه انتریکا سروار تیفی‌موریوم ATCC 14028 و *اشریشیا کلی* ATCC 25922 به‌عنوان کنترل مثبت و منفی (تهیه شده از بانك میکروبی دانشگاه علوم پزشکی ایران) روی ژل آگاروز ۱ درصد الکتروفورز گردید. به‌منظور تجزیه و تحلیل آماری اطلاعات حاصل از نتایج از نرم‌افزار آماری SPSS ویرایش ۱۸ استفاده شد.

۵. یافته‌ها

نتایج آزمون‌های کشت، بیوشیمیایی و سرولوژیك (SI، SIM، آبگوشت MR-VP، اوره، و تولید اندول) روی تمامی ۶۰ جدایه بالینی *سالمونلا تیفی‌موریوم* که از نمونه مدفوع بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان البرز شهر کرج جمع‌آوری گردید، مورد تایید و شناسایی قرار گرفتند. نتایج تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی نشان داد که تمامی ایزوله‌ها به ایمی‌پنم، جنتامایسین و آمیکاسین حساس بوده و همچنین، بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی نیز بر علیه آمپی‌سیلین (۱۶/۶درصد)، آموکسی‌سیلین (۱۴/۹ 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*

(۱۰۰ درصد) و *stn* (۹۱/۶ درصد) می‌باشد. همچنین، تمامی سویه‌ها از نظر وجود ژن‌های *sopB* و *spvc* منفی بودند (جدول شماره ۳ و شکل شماره ۱). همچنین، فراوانی ژن‌های Phop/Q، slyA و stn به ترتیب برابر ۱۰۰، ۹۸/۳ و ۹۱/۶ درصد بود و ژن‌های sopB و Spvc در جدایه‌های سالمونلا تیفیموریوم مشاهده نگردید. در این مطالعه مشخص شد که فقط یک نمونه (۱/۶۶ %) دارای یک ژن Phop/Q ، ۴ نمونه (۶/۶۶%) هم‌زمان دارای ژن‌های slyA، Phop/Q و ۵۵ نمونه (۹۱/۶%) هم‌زمان دارای ژن‌های slyA، Stn، Phop/Q بودند (جدول شماره ۴).

٦. بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که تمامی ایزوله‌ها دارای حساسیت به ایمی‌پنم، جنتامایسین و آمیکاسین هستند. همچنین، فراوانی ژن‌های *Phop/Q*، *slyA* و *stn* به‌ترتیب برابر ۱۰۰، ۹۸/۳، ۹۱/۶ درصد گزارش گردید، در حالی‌که ژن‌های *sopB* و *spvc* در جدایه‌های *سالمونلا تیفی‌موریوم* مشاهده نشد. در سال‌های اخیر شیوع *سالمونلا*های غیرتیفوییدی در جهان به‌دلیل پیدایش بسیاری از سروتایپ‌های جدید سالمونلایی که در گذشته شیوع چندانی نداشته، به‌طور وسیعی روبه افزایش است (۱۳).

براساس مدت زمان صرف شده برای تشخیص سالمونلاها، روش‌های تشخیص به دو گروه متداول و سریع طبقه‌بندی می‌شوند. روش‌های کشت متداول معمولا به دلیل استفاده از مراحل پیش‌غنی‌سازی، غنی‌سازی و متعاقب آن استفاده از محیط‌های انتخابی و تفریقی و تأئید پرگنه‌های مشکوک با آزمایشات بیوشیمیایی و در نهایت سروتایپینگ زمان‌بر بوده، به‌طوری که به ۵ الی ۱۳ روز وقت نیاز دارند (۱۲). امروزه سعی بر این است که از روش‌های سریع اما حساس و با ویژگی بالا استفاده گردد. یکی از روش‌های مهم با کارآیی بالا روش Multiplex PCR است که با استفاده از چند پرایمر در مدّت زمان کوتاهی می‌توان جنس و سروار را به‌طور هم‌زمان تشخیص داد و در اپیدمی‌های بسیار بزرگ با عوامل بیماری‌زا روش بسیار مناسبی با حساسیت و ویژگی بالا نسبت به سایر روش‌ها می‌باشد که ضرورت استفاده از آن را بیش از پیش دو چندان نموده است (۱۱).

یکی از کاربردهای مفید تحقیق حاضر استفاده از محیط Rambach Agar و Chrom Agar به‌جای سایر محیط‌های کاربردی دیگر بود که پس از غنی‌سازی کردن در محیط راپاپورت واسیلیادیس مستقیما روی این دو محیط برده شد. جالب توجه اینکه نتایج رشد کلونی قرمز رنگ

واضح در محیط Rambach Agar با نتایج بیوشیمیایی هم‌خوانی کامل داشت و استفاده از این محیط به‌دلیل ویژگی بالا، سرعت بالا و اقتصادی بودن را در اپیدیمی‌های بزرگ با منشاء غذایی و سایر موارد روده‌ای در انسان و حیوانات توصیه می‌نمائیم. ارجمند اصل و امینی در سال ۱۳۹۴ ژن‌های ویرولانس را در سویه‌های بالینی *سالمونلا تیفی‌موریوم* به‌روش Multiplex PCR شناسایی کردند. تعداد ۶۰ جدایه بالینی *سالمونلا تیفی‌موریوم* از بیمارستان شریعتی تهران جمع‌آوری شد. پس از تایید سویه‌ها با استفاده از تست‌های استاندارد بیوشیمیایی، میکروبیولوژی و آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی، آزمون Multiplex PCR جهت تشخیص ژن‌های بیماری‌زا با استفاده از آغازگرهای اختصاصی انجام شد. نتایج آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی نشان داد که تمامی ایزوله‌ها دارای حساسیت به ایمی‌پنم، جنتامایسین و تری‌متوپریم بودند و این نتایج با مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد. همچنین، فراوانی ژن‌های *Phop/Q*، *sopB*، *stn* و *slyA* به‌ترتیب برابر با ۴۳/۳، ۳/۳۳، ۳۰ و ۲۳/۳ درصد گزارش گردید، در حالی‌که ژن *spvc* در جدایه‌های *سالمونلا تیفی‌موریوم* مشاهده نشد (۱۴). این نتایج در مقایسه با مطالعه حاضر از لحاظ بیشترین توزیع فراوانی مربوط به ژن *Phop/Q* هم‌خوانی دارند و همچنین، در هر دو تحقیق، ژن *spvc* در جدایه‌های *سالمونلا تیفی‌موریوم* مشاهده نگردید. علی‌رغم اینکه ژن‌های *slyA*، *Q/phoP* و *stn* در جزایر بیماری‌زای سالمونلا قرار نگرفته‌اند، نقش مهمی در بیماری‌زایی این باکتری داشته و ترشح سالمولایزین از طریق تنظیم نسخه‌برداری ژن‌ها در داخل ماکروفاژها کد می‌شود. مطالعات پیشین اثبات کرده‌اند که عدم حضور ژن *spvc* در سالمونلاها باعث غیرمهاجم شدن این باکتری‌ها می‌گردد (۱۴،۱۵). در تحقیق حاضر نیز میزان شیوع ژن‌های *slyA*, *Q/phoP* و *stn* بیشتر بوده که کاملا با منشاء ایجاد آن و تولید توکسین باکتری در داخل روده مرتبط می‌باشد. همچنین، ژن *sopB* مشاهده نشد که این امر می‌تواند در گونه‌های مختلف بدون حضور این ژن مشاهده گردد. در مطالعه امینی و همکاران در سال ۲۰۱۰ تعداد ۲۰ نمونه *سالمونلا تیفی‌موریوم* انسانی ابتدا با تست‌های بیوشیمیایی و سرولوژی تجزیه و تحلیل شدند. نتایج Multiplex PCR نشان داد ژن‌های *spva*، *spvb* و *spvc* به‌ترتیب در ۸۵، ۱۰۰ و ۸۵ درصد از منابع انسانی قرار دارند (۱۵). اختلاف بسیاری در نتایج مطالعه کنونی با مطالعه امینی و همکاران وجود دارد که می‌تواند در نتیجه اختلاف جغرافیایی و اختلاف در نوع سروتایپ سالمونلای تحت مطالعه باشد. پلاسمیدهای ویرولانس و یا فاکتورهای ویرولانس دخالت مستقیمی 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 (۱۵،۱۴). اشراقی و همکاران در سال ۱۳۸۸ در تهران به بررسی ۱۹۵۰ نمونه مدفوع کودکان مبتلا به اسهال پرداخته 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 آنها نشان داد که بیشترین و کمترین توزیع فراوانی مربوط به ژن‌های *Phop/Q* (۴۳/۳ درصد) و *sopB* (۳/۳۳ درصد) می‌باشد (۱۶). بررسی‌ها نشان داده است که ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی و ویرولانس می‌توانند در یک پلاسمید وجود داشته و منجر به پیدایش پلاسمیدهای مقاومت—ویرولانس گردند (۱۷). وجود این پلاسمیدها در سروارهای تیفی‌موریوم، کلراسوئیس و انتریتیدیس از اسپانیا، ایتالیا، قزاقستان، تایوان و انگلیس گزارش شده است. پیدایش این پلاسمیدها یک نگرانی بزرگ است، زیرا آن‌ها می‌توانند منجر به انتخاب هم‌زمان ویرولانس و مقاومت به‌واسطه استفاده از داروهای آنتی میکروبی شوند (۱۸). زهرایی صالحی و همکاران با استفاده از پرایمرهای اختصاصی اقدام به بررسی فنوتیپی و ژنوتیپی از *سالمونلا* کردند. این محققین با استفاده از ۳ جفت آغازگر به نام‌های ST_{11}-ST_{14}، S_1-S_4 و $SEFA_2$-$SEFA_4$ با تولید قطعه ژنومی به‌ترتیب با اندازه ۴۲۹، ۲۵۰ و ۳۱۰ bp مربوط به ژن‌های با ترادف اتفاقی، پلاسمید ویرولانس و فیبمریه با روش Multiplex PCR روی ۱۰۰ جدایه *سالمونلا انتریتیدیس* آن‌ها را تأئید نمودند. علاوه بر آن، حضور ژن‌های *invA* و *spvc* به‌ترتیب در تمام جدایه‌های سروار تیفی موریوم و انتریتیدیس نیز تائید گردید (۱۹). Soto و همکاران در سال ۲۰۰۶ به این نتیجه دست یافتند که در همه ۸۰ نمونه بالینی جدا شده ژن‌های ویرولانس *slyA*، *phoP/Q* و *stn* حضور داشته و با شیوع بیماری ناشی از *سالمونلا* کاملا مرتبط می‌باشد (۲۰). نتیجه تحقیق فوق با نتیجه مطالعه حاضر از نظر تئوری عدم حضور ژن *spvc* در این گونه *سالمونلا* هم‌خوانی دارد. Pan و Liu در سال ۲۰۰۲ جدایه‌های *سالمونلا اینتریتیدیس* را به روش PCR و Multiplex PCR در تایوان شناسایی کردند. نمونه‌ها از مدفوع گاستروانتریت غذایی طی سال‌های ۱۹۹۲ تا ۱۹۹۸ جمع‌آوری شده بودند. در این آزمایش از سه جفت پرایمر استفاده شد. یک قطعه ۴۲۹ bp اختصاصی برای جنس *سالمونلا*، یک قطعه ۲۵۰ bp برای ژن *spv* و یک قطعه ۳۱۰ bp برای ژن *sefA* اختصاصی *سالمونلا اینتریتیدیس* انتخاب شد. ژن *sefA* در تمام ۲۷ سویه

S. enteritidis با روش PCR شناسایی شد. با روش Multiplex PCR هر ۳ ژن در تمام سویه‌ها شناسایی شد، اما در دو سویه ژن *spv* شناسایی نشد. این داده‌ها نشان می‌دهد که با توجه به ویژگی و حساسیت PCR و Multiplex PCR می‌توان از این دو روش به‌عنوان ابزار بالقوه و ارزشمند برای تشخیص و شناسایی عفونت *S. enteritidis* استفاده کرد (۲۱).

با توجه به محدودیت‌های مطالعه حاضر مانند کم بودن شمار نمونه‌ها و مقطعی بودن آن، انجام بررسی‌هایی با حجم نمونه بیشتر و انجام بررسی‌های مداخله‌ای پیشنهاد می‌شود. همچنین، با توجه به اهمیت مقاومت آنتی‌بیوتیک در *سالمونلا تیفی‌موریوم* رابطه مقاومت آنتی‌بیوتیکی با حضور ژن‌های ویرولانس بسیار اهمیت دارد و نیازمند مطالعه بیشتر است.

۷. نتیجه‌گیری

بررسی ژن‌های حدت و انتروتوکسین باکتری *سالمونلا تیفی‌موریوم* جدا شده از نمونه‌های مدفوع در این تحقیق نشان داد که اولاً از حیث میزان حضور ژن‌ها و کارایی و ثانیاً از نظر ارزیابی انتقال بین گونه‌ای این ژن‌ها، روش مولتی‌پلکس در بررسی‌های اپیدمیولوژی می‌تواند مفید باشد.

۸. تشکر و قدردانی

پژوهشگران از مدیریت و پرسنل محترم موسسه واکسن و سرم‌سازی رازی که در پیش‌برد این تحقیق همکاری ارزنده و سودمند داشته‌اند، قدردانی می‌نمایند.

References

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
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. Mao X, Hu J, Liu X. Estimation on disease burden of foodborne non-typhoid salmonellosis in China using literature review method. *Chinese J Disease Control Prevention***.** 2011; 15(7): 622-5.
7. Abdollahi A, Najafipour S, Kouhpayeh SA, Meshkibaf MH, Naghdi M. Salmonella enterica: Serotyping, Drug Resistance & Extended Spectrum of β-Lactamase (ESBLs). *J Fasa Univ Med Sci*. 2011; 1(1): 38-44.
8. Hur J, Choi YY, Park JH, Jeon BW, Lee HS, Kim AR, et al. Antimicrobial resistance, virulence-associated genes, and pulsed-field gel electrophoresis profiles of Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium isolated from piglets with diarrhea in Korea. *Can J Vet Res*. 2011; 75(1): 49-56.
9. Glynn MK, Bopp C, Dewitt W, Dabney P, Mokhtar M, Angulo FJ. Emergence of Multidrug-Resistant Salmonella enterica Serotype Typhimurium DT104 Infections in the United States. *N Engl J Med*. 1998; 338(19): 1333-9.
10. Yang SJ, Park KY, Kim SH, No KM, Besser TE, Yoo HS, et al. Antimicrobial resistance in Salmonella enterica serovars Enteritidis and Typhimurium isolated from animals in Korea: comparison of phenotypic and genotypic resistance characterization. *Vet Microbiol*. 2002; 86(4): 295-301.
11. Wayne PA. Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 20th informational supplement. CLSI document M100-S20. 2010.
12. Guerra B, Laconcha I, Soto SM, González-Hevia MÁ, Mendoza MC. Molecular characterisation of emergent multiresistant Salmonella enterica serotype [4, 5, 12: i:−] organisms causing human salmonellosis. *FEMS Microbiol Lett*. 2000; 190(2): 341-7.
13. Switt AIM, 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.

14. 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. [In Persian]
15. Aminia K, Nazarib Z, Mokhtaric A. Molecular detection of inv A and spv virulence genes in Salmonella typhimurium isolated from human and animals in Iran. *Sci J Microbiol*. 2015; 4(7) 49-57.
16. Eshraghi S, Dalall MM, Fardsanei F, Salehi TZ, Ranjbar R, Nikmanesh B, et al. Salmonella enteritidis and antibiotic resistance patterns: a study on 1950 children with diarrhea. *Tehran Univ Med J*. 2010; 67(12).
17. Chu C, Chiu CH, Wu WY, Chu CH, Liu TP, Ou JT. Large drug resistance virulence plasmids of clinical isolates of Salmonella enterica serovar Choleraesuis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001; 45(8): 2299-303.
18. Herrero A, Mendoza M, Threlfall EJ, Rodicio M. Detection of Salmonella enterica serovar Typhimurium with pUO-StVR2-like virulence-resistance hybrid plasmids in the United Kingdom. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2009; 28(9): 1087-93.
19. Madadgar O, Salehi TZ, Tadjbakhsh H, Mahzounieh M, Feizabadi M. Genomic and phenotypic evaluation of Salmonella typhimurium and Salmonella enteritidis in Iran. *Comp Clin Pathol***.** 2008; 17(4): 229-35.
20. 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.
21. 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.

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

ژن‌ها		توالی پرایمر	محل یا عملکرد	اندازه محصول ژن
slyA	F	GCCAAAACTGAAGCTACAGGTG	Transcriptional regulator	۷۰۰
	R	CGGCAGGTCAGCGTGTCGTGC		
spvc	F	ACTCCTTGCACAACCAAATGCGGA	Virulence plasmid	۴۲۴
	R	TGTCTTCTGCATTTCGCCACCATCA		
stn	F	TTAGGTTGATGCTTATGATGGACACCC	Enterotoxin	۶۱۷
	R	CGTGATGAATAAAGATAC TCATAGG		
sopB	F	GATGTGATTAATGAAGAAATGCC	SPI5	۱۱۷۰
	R	GCAAACCATAAAAACTACACTCA		
Phop/Q	F	ATGCAAAGCCCGACCATGA CG	Regulatory System	۲۹۹
	R	GTATCGACCACCACGATGGTT		

جدول ۲- نتایج آنتی‌بیوگرام سویه‌های *سالمونلا تیفی‌موریوم* مورد مطالعه (n=۶۰)

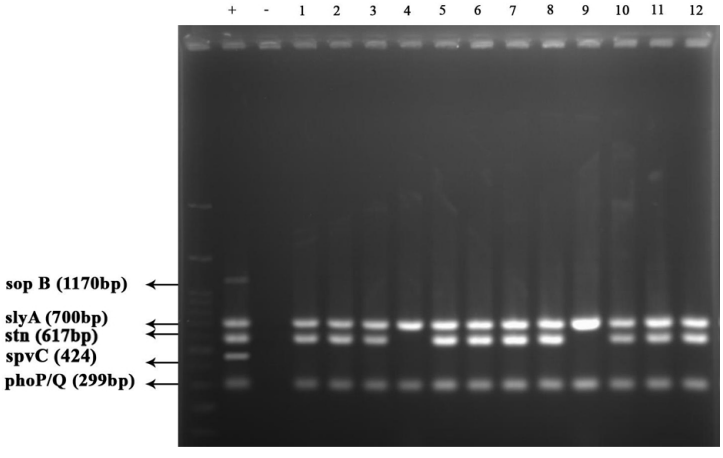
آنتی‌بیوتیک	حساس (٪)	نیمه‌حساس (٪)	مقاوم (٪)
آموکسی‌سیلین	۵۱ (۸۴/۶)	۰	۹ (۱۴/۹)
تتراسایکلین	۵۰ (۸۳)	۳ (۴/۹)	۷ (۱۱/۶)
ایمی‌پنم	۶۰ (۱۰۰)	۰	۰
آمیکاسین	۶۰ (۱۰۰)	۰	۰
استرپتومایسین	۵۸ (۹۶/۳)	۲ (۳/۳)	۲ (۳/۳)
جنتامایسین	۶۰ (۱۰۰)	۰	۰
کلرامفنیکل	۵۸ (۹۶/۳)	۴ (۶/۶)	۰
تریمتوپریم سولفومتاکسازول	۵۴ (۸۹/۶)	۰	۶ (۹/۹)
آمپی‌سیلین	۴۸ (۷۹/۶)	۲ (۳/۳)	۱۰ (۱۶/۶)
سفتریاکسون	۵۸ (۹۶/۳)	۰	۲ (۳/۳)

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

ژن مورد مطالعه سویه	(*slyA*) ۷۰۰bp	(*spvc*) ۴۲۴bp	(*stn*) ۶۱۷bp	(*sopB*) ۱۱۷۰bp	(*Phop/Q*) ۲۹۹bp	تعداد کل نمونه‌ها
سالمونلا تیفی‌موریوم تعداد (درصد)	۵۹ (۹۸/۳)	۰	۵۵ (۹۱/۶)	۰	۶۰(۱۰۰)	۶۰

جدول ٤- فراوانی ژن‌های مورد مطالعه در سویه‌های سالمونلا تیفی موریوم به طور هم‌زمان

ژن‌های مورد مطالعه سویه	فقط ژن Phop/Q	دو ژن Phop/Q ،slyA	سه ژن Phop/Q ،Stn ،slyA
سالمونلا تیفی موریوم٪ (تعداد)	٪۱/۶۶ (۱)	٪۶/۶۶ (۴)	٪۹۱/۶ (۵۵)



شکل ۱- نتیجه آزمایش PCR روی تعدادی از جدایه‌های مثبت. به‌ترتیب از چپ به راست: مارکر ۱۰۰bp، + کنترل مثبت (سالمونلا انتریکا سروار تیفی موریوم ATCC 14028) ، - کنترل منفی (اشرشیا کلی ATCC 25922) ، محصول ژن *Phop/Q* با طول باند ۲۹۹bp، ژن *Spvc* با طول باند ٦۱۷bp، ژن stn با طول باند ٦۱۷bp، ژن *slyA* با طول باند ۷۰۰bp و ژن *sopB* با طول باند ۱۱۷۰bp.
نمونه‌های شماره ۱، ۲، ۳، ۵، ٦، ۷، ۸، ۱۰، ۱۱و ۱۲ دارای سه ژن slyA ،stn و Phop/Q می‌باشند.
نمونه‌های شماره ٤ و ۹ دارای دو ژن slyA و Phop/Q هستند.
در این شکل هیچ کدام از نمونه‌ها دارای ژن‌های sopB و Spvc نمی‌باشند.

استناد به این مقاله:

معصومعلی‌نژاد، زهرا؛ خیرخواه، بابک؛ میرزاده، فهیمه (۱۳۹۹). بررسی مولکولی ژن‌های slyA، stn، sopB، Phop/Q و spvc در سالمونلا تیفی‌موریوم جدا شده از نمونه‌های بالینی با روش Multiplex PCR. *بیولوژی کاربردی*، دوره ۱۰، شماره ۳۸، ص ۶۳-۷۶.