Journal of Microbial World
Volume 13, No. 2, July 2020

Original Article

High resolution melting (HRM) curve analysis for rapidly and accurate determination of *Salmonella* spp. with *invA* gene

Mohammad Sadegh Saeidabadi[1], Hassan Nili[2], Seyed Ali Ghorashi[3], Habibolla Dadras[4]

[1]Assistant Professor, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Vaccine and Serum Research Institute, Department of Avian Medicine, Iran. [2]Professor, Shiraz University, Department of Clinical Studies, Shiraz, Iran.[3]Professor, School of Animal and Veterinary Sciences, Charles Strut University, Department of Microbiology, Australia. [4]Professor, Shiraz University, Department of Clinical Studies, Shiraz, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Salmonellosis is an infectious and common disease between humans and animals that is caused by different strains of *Salmonella*. Progress in molecular diagnostic methods, has led to accurate and easy detection and characterization of food microbial agent. The purpose of this research was to use HRM technique to access more accurate and rapid diagnosis of *Salmonella* bacteria by means of *invA* gene.

Material & Methods: In this study, diagnosis of *Salmonella* was done by polymerase chain reaction and high resolution melting curve (PCR-HRM) using the sequence on *invasion A* gene (*invA*) as a marker. In total 9 *Salmonella* reference strains using a specific primer pair of genes *invA* were used to detect *Salmonella*.

Results: The expected size of PCR amplified fragments of *invA* gene was determined as 284bp. All tested strains were able to show a *Salmonella* specific melting curve with high resolution at thermal interval of 87.8-87.9°C.

Conclusion: The results showed that HRM using specific primers of *invA* gene can be used as an accurate and reliable technique for diagnosis Genus of *Salmonella*.

Keywords: *invA* gene, Infectious diseases, New diagnostic technique.

Correspondence to: Hassan Nili

Tel: +98 9131211307

E-mail: nili@shirazu.ac.ir

Journal of Microbial World 2020, 13(2): 130-137.

DOI:

Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.

مجله دنیای میکروب‌ها
سال سیزهم شماره دوم (پیاپی ۴۳) تابستان ۱۳۹۹
صفحات ۱۳۷-۱۳۰

Original Article

آنالیز منحنی ذوب با شفافیت بالا (HRM) به منظور شناسایی سریع و دقیق باکتری *سالمونلا* با استفاده از ژن *invA*

محمد صادق سعید آبادی[۱]، حسن نیلی*[۲]، سید علی قریشی[۳]، حبیب ا..ه دادرس[۴]

[۱]استادیار، سازمان تحقیقات و آموزش و ترویج کشاورزی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، بخش تحقیقات بیماری های طیور،
[۲]استاد، دانشگاه شیراز، دانشکده دامپزشکی، گروه علوم درمانگاهی، [۳]استاد، دانشگاه چارلز استارت، دانشکده علوم دام و دامپزشکی، گروه میکروبیولوژی،
[۴]استاد، دانشگاه شیراز، دانشکده دامپزشکی، گروه علوم درمانگاهی.

چکیده

سابقه و هدف: سالمونلوز یکی از بیماری های عفونی و مشترک بین انسان و حیوانات است که به وسیله سویه های مختلف *سالمونلا* ایجاد می گردد. پیشرفت در روش های تشخیص مولکولی، شناسایی پاتوژن های غذایی را دقیق تر و راحت کرده است. هدف از این پژوهش استفاده از روش HRM به منظور شناسایی سریع و دقیق باکتری *سالمونلا* با استفاده از ژن *inv A* می باشد.

مواد و روش ها: در این تحقیق شناسایی باکتری *سالمونلا* با واکنش زنجیره ای پلی مراز با روش منحنی ذوب با شفافیت بالا (PCR-HRM) به وسیله توالی ژن *invA*، به عنوان یک نشانگرانجام شد.در مجموع تعداد ۹ سویه رفرانس *سالمونلا* با استفاده از یک جفت آغازگراختصاصی ژن *invA* برای تشخیص باکتری *سالمونلا* استفاده شدند.

یافته ها: قطعات موردانتظار ۲۸۴ جفت بازی پس از تکثیر ژن *invA* توسط PCR به دست آمد. تمام نمونه های مورد آزمون قادر به تولید پیک منحنی ذوب اختصاصی *سالمونلا* با شفافیت بالا در بازه دمایی ۸۷/۹ °C–۸۷/۸ بودند.

نتیجه گیری: نتایج نشان داد که روش شفافیت منحنی ذوب با استفاده از آغازگر های اختصاصی ژن *invA* می تواند به عنوان یک روش دقیق و مطمئن به منظور تعیین جنس های *سالمونلا* مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: ژن *invA*، بیماری عفونی، روش جدید تشخیص.

دریافت مقاله: بهمن ماه ۹۸ پذیرش برای چاپ: اردیبهشت ماه ۹۹

مقدمه

سالمونلا (*Salmonella*)، یکی از متداول ترین عوامل بیماری های عفونی با منشا مواد غذایی در جهان می باشد. آلودگی سالمونلایی یک مشکل و نگرانی عمومی برای سلامت و بهداشت جوامع در سراسر دنیا به حساب می آید که همواره مشکلات جدی را از نظر اقتصادی برای کشورهای صنعتی و در حال توسعه به وجود آورده است (۱). *سالمونلا* یک باکتری میله ای شکل گرم منفی و هوازی اختیاری متعلق به خانواده *انتروباکتریاسه* می باشد که تاکنون در حدود ۲۶۰۰ سویه باکتری *سالمونلا* شناسایی و ثبت شده‌اند (۲). از ویژگی های این باکتری، دامنه ی وسیع میزبانی آن از حیوانات خونسرد تا پرندگان و پستانداران و از جمله انسان است (۳). بیماری سالمونلوز ایجاد شده به وسیله گونه های مختلف باکتری *سالمونلا* یکی از عوامل عمده مرگ و میر در بین طیور می باشد که در هر دوره خسارات جبران ناپذیری را به

*) آدرس برای مکاتبه: استان البرز، کرج، حصارک، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی.
تلفن: ۰۹۱۳۱۲۱۱۳۰۷ پست الکترونیک: nili@shirazu.ac.ir

حقوق نویسندگان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد و تحت مجوز مالکیت خلاقانه (http://creativecommons.org/licenses/bync/4.0/) در فصلنامه دنیای میکروب‌ها منتشر شده است. هرگونه استفاده غیرتجاری فقط با استناد و ارجاع به اثر اصلی مجاز است.

تولید کنندگان طیور وارد می کند. برای کنترل و مبارزه با عوامل بیماریزای عفونی اولین قدم تشخیص و تعیین هویت عامل بیمارگر می باشد. روش های سنتی و قدیمی که مبتنی بر تشخیص فنوتیپی و روش های بیوشیمیایی می باشند زمان بر و طاقت فرسا بوده و در بعضی موارد تشخیص دقیقی حاصل نمی شود (۴). استفاده از محیط های کشت انتخابی و اختصاصی و همچنین تکنیک های مبتنی بر آنزیم ها، مانند الایزا نیز در تکمیل روش های سنتی، مورد استفاده قرار گرفته اند. اما با توجه به زمان بر بودن و هزینه های بالا، استفاده از آن ها محدود است (۱). برای مقابله با این باکتری و بیماری ایجاد شده به وسیله گونه های مختلف آن، نشانگرهای مولکولی متعددی برای شناسایی و تعیین هویت آن ها معرفی شده است. پیشرفت در روش های تشخیص مولکولی، شناسایی پاتوژن های غذایی را دقیق تر و راحت کرده است. روش Real time PCR روشی بسیار دقیق و قابل اطمینان برای تمایز سویه های باکتریایی بسیار نزدیک بهم و مشابه می باشد که می تواند مدیریت آزمایشگاهی، شناخت، پیشگیری و کنترل بیماری را تسهیل نماید (۲). این تکنیک همچنین در ترکیب با روش های ایمونوژنتیکی و توالی یابی قطعه کامل ژن های انتخابی، می تواند در تشخیص، تمایز و طبقه بندی باکتری های بیماریزا در طیور مفید واقع شود (۳). تاکنون بیش از ۳۰ ژن اختصاصی سالمونلا که برای PCR استفاده می شود، گزارش شده است. نشانگرهایی مانند چند شکلی قطعات هضم شده با استفاده از ژن های *fliC* و *speC* در باکتری های *سالمونلا* گالیناروم (*S. Gallinarum*) و *سالمونلا* پولوروم (*S. Pullorum*) مورد استفاده قرار گرفته است (۶). همچنین فراونی ژن های پلاسمیدی *spvB*، *spvC* و *spvR* در نمونه های آلوده به *سالمونلا* انتریتیدیس (*S.* Enteritidis) به ترتیب ۴۵/۷، ۷۶/۶ و ۶۹/۱۴ در صد گزارش شده است (۴). روش های تکمیلی مانند duplex PCR نیز برای تشخیص و تمایز گونه های این باکتری علاوه بر روش های هضم آنزیمی و واکنش زنجیره ای پلی مراز بر اساس اختلاف آلل های اختصاصی ژن *rfbS* در موقعیت ۲۳۷ و ۵۹۸ و تعیین چند شکلی های تک نوکلئوتیدی (Single Nucleotide Polymorphism=SNPs) برای تعیین هویت این گونه ها مورد استفاده قرار گرفته اند (۵). با این حال استفاده از چنین روش هایی اغلب نیاز به ترکیبی از روش های مختلف دارد و معمولاً از نظر اقتصادی نیز مقرون به صرفه نمی باشند. با استفاده از اطلاعات بدست آمده از شفافیت منحنی ذوب (High resolution melting =HRM) مربوط به نواحی مشخص ژنی در مرحله واکنش زنجیره ای پلی مراز با استفاده از روش qRT-PCR (Real-time polymerase chain reaction Quantitative) می توان علاوه بر تعیین جهش های نقطه ای در توالی های مورد بررسی جدایه های بسیار نزدیک یک گونه را نیز تشخیص داد. این روش برای گونه های قارچی و باکتریایی که دارای سویه های بسیار مشابه می باشند و تشخیص آنها با استفاده از روش های فنوتیپی و حتی متداول مولکولی، مشکل است می تواند بسیار مفید واقع شود (۶ و ۷). آنالیز منحنی ذوب با شفافیت بالا، یک روش توسعه یافته سریع و از طریق ادامه PCR جهت شناسایی باکتری ها، ویروس ها و جهش های ژنتیکی یا تغییرات در توالی اسید نوکلئیک می باشد. این روش محققین را به منظور شناسایی سریع و طبقه بندی تغییرات ژنتیکی یاری می دهد. با این تکنیک واریانت ژنتیکی جدید را می توان بدون تعیین توالی شناسایی نمود. همچنین تغییرات ژنتیکی در جمعیت ها، گوناگونی و تنوع جدایه ها و شناسایی سویه واکسن از سویه محیطی قبل از تعیین توالی قابل تشخیص است (۸). آنالیز HRM یک ابزار اقتصادی، سریع و ساده، قوی و نیرومند را برای تشخیص سریع، اختصاصی و حساس گونه های *سالمونلا* فراهم می نماید. هدف از این پژوهش، استفاده از روش HRM به منظور شناسایی سریع و دقیق باکتری *سالمونلا* با استفاده از ژن *inv A* می باشد.

مواد و روش کار

الف) جدایه های مورد آزمون: در این مطالعه تعداد ۹ سویه رفرانس سالمونلا از آزمایشگاه دانشگاه چالز استوارت

(Sturt Charls) و همچنین از آزمایشگاه بهداشت عمومی واحد تشخیص میکروبی بخش میکروبیولوژی و ایمونولوژی دانشگاه ملبورن (Melborn) تهیه گردید (جدول ۱). سویه های رفرانس روی محیط کشت نوترینت آگار در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت کشت مجدد شدند. سپس استخراج DNA با استفاده از تک کلنی جداشده از کشت تازه باکتری انجام گردید.

ب) استخراج DNA از هر سویه رفرانس *سالمونلا* یک کلنی انتخاب و با استفاده از کیت Wizard (Promega, Australia) Genomic DNA Purification, استخراج DNA انجام شد. در این روش ابتدا ۶۰۰ میکرولیتر محلول Nuclei Lysis اضافه و به آرامی مخلوط گردید. سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سلسیوس در حمام آب گرم نگاه داشته و پس از آن در دمای اتاق نگهداری شد. سپس ۳ میکرولیتر محلول Rnase اضافه و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۵ دقیقه قرار گرفت. در ادامه ۲۰۰ میکرولیتر محلول رسوب دهنده پروتین اضافه و به آرامی بهم زده و در روی یخ به مدت ۵ دقیقه قرار داده و در دور ۱۴۰۰۰ به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول روماند را به لوله دیگر حاوی ۶۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول منتقل شد و در دمای اتاق نگهداری گردید. سپس محلول را با دور ۱۴۰۰۰ g به مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژ کرده و نهایتا محلول روماند جدا شد و ۶۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد به آن اضافه و مخلوط شد و سپس به مدت ۲ دقیقه با دور ۱۴۰۰۰ g سانتریفیوژ گردید. الکل را از لوله خارج و رسوب DNA را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق خشک و در نهایت با استفاده از بافر کیت استخراج رسوب DNA حل شد. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده به ترتیب با استفاده از دستگاه طیف سنج نانودراپ (NanoDrop2000Thermo scientific Australia) و ژل الکتروفورز آگارز مورد بررسی قرار گرفت. غلظت DNA به مقدار ۵ ng/µl از استوک اولیه برای مراحل بعدی در واکنش زنجیره ای پلی مراز تهیه گردید و تا موقع استفاده در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. از آغازگرهای اختصاصی ژن *invA* شامل invA139-F (GTGAAATTATCGGCACGTTCGGGCAA) و invA141-R (TCATCGCACCGTCAAAGGAACC) استفاده گردید (۹).

ج) روش qRT-PCR واکنش زنجیره ای پلی مراز در زمان واقعی(qRT-PCR) در داخل لوله ۰/۲ میلی لیتر شفاف مخصوص واکنش بیان ژن با حجم واکنش ۲۵ میکرولیتر انجام گردید. محتویات واکنش شامل 2µl از DNA ژنوم استخراج شده (۱۰ نانوگرم در میکرولیتر)، ۱ میکرو لیتر از هر آغازگر (۱۰ میکرومولار)، $MgCl_2$ (۱/۵ میکرولیتر)، ۵ میکرولیتر dNTP (۵۰ میکرومولار)، ۵ میکرولیتر رنگ SYTO 9 green (ThermofisherScintific, Australi)، بافر 5X Go Tag GreenFlexi Reaction و یک میکرولیتر از آنزیم Go Tag DNA polymerase (Promega, Australia) بود. واکنش تکثیر با استفاده از یک دستگاه کوربت (Corbett Rotor-Gene QTM, Qiagen) شش کاناله مجهز به HRM انجام گردید. چرخه های واکنش شامل یک چرخه واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۵ $^{\circ}C$ به مدت ۵ دقیقه و به دنبال آن ۳۵ چرخه حرارتی شامل، ۹۵ $^{\circ}C$ به مدت ۲۰ ثانیه، ۵۴ $^{\circ}C$ به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ $^{\circ}C$ به مدت ۲۰ ثانیه انجام و در پایان با یک بازه دمایی ۷۲ $^{\circ}C$ برای مدت ۵ دقیقه چرخه های حرارتی خاتمه داده شد.

د) تجزیه منحنی ذوب با وضوح بالا: در ادامه و تکمیل هر چرخه از واکنش PCR، آنالیز های منحنی HRM در دستگاه Rotor–Gene Tm 6000 Thermal cycler (Qiagen, Australia) انجام گردید. اساس این روش، توجه به

جدول ۱: مشخصات سویه های باکتری *سالمونلا* مورد استفاده در این مطالعه.

نام سویه	محل نگهداری	منبع
S. typhimurium	دانشگاه چالز استوارت	سویه استاندارد/ ۲۰۱۲
S. johannesborg	دانشگاه چالز استوارت	سویه استاندارد/ ۲۰۱۲
S. montevideo	دانشگاه چالز استوارت	کشت/۲۰۱۲
S. sofia	دانشگاه چالز استوارت	کشت/۲۰۱۲
S. newport	دانشگاه چالز استوارت	سویه استاندارد/ ۲۰۱۳
S. choleraesuis	دانشگاه ملبورن	سویه استاندارد/ ۲۰۱۳
S. subsp. I ser. 4, 12: i:	دانشگاه ملبورن	کشت/ ۲۰۱۳
S. vircho	دانشگاه ملبورن	کشت/ ۲۰۱۳
S. enteritidis	دانشگاه ملبورن	سویه استاندارد/ ۲۰۱۴

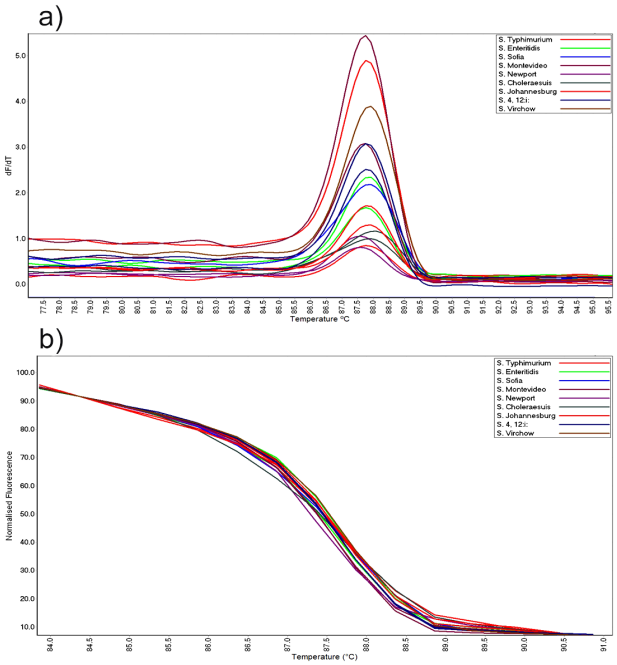
الگوی ذوب DNA دو رشته ای در دمای خاص با استفاده از رنگ فلوئورسنس با غلظت نسبتا بالا می باشد (۱۰). به منظور تعیین وضعیت ذوب مناسب، محصولات PCR در فواصل دمایی ۰/۵ درجه سلسیوس بین دمای ۷۵ درجه سلسیوس و ۹۵ درجه سلسیوس مورد بررسی قرار گرفتند. تمامی آزمون ها، ۳ مرتبه تکرار شدند و با استفاده از نرم افزار Rotor–Gene 1,7,27 (Qiagen) نمایه های ذوب آن ها آنالیز و الگوریتم HRM فراهم گردید. نواحی نرمال ۸۵–۸۴ درجه سلسیوس و ۹۱–۹۰ درجه سلسیوس برای آنالیز نمونه ها بکار گرفته شد.

یافته ها

نتایج حاصل از تکثیر قطعات ژنی مربوط به سویه های *سالمونلا* مورد آزمون نشان داد که آغازگرهای مورد استفاده توانایی سنتز اختصاصی قطعات مورد نظر مربوط به ژن *inv A* را دارا می باشند. همه سویه های سالمونلا رفرانس مورد آزمایش یک قطعه DNA با اندازه ۲۸۴bp در PCR را تولید کردند که جنس *سالمونلا* را تایید می کرد. برای بررسی منحنی ذوب حاصل از روند تکثیر قطعات در واکنش زنجیره ای پلی مراز که با استفاده از تکنیک آنالیز و مشاهده ساخت هم زمان (Real-time) انجام شد. پیک های ذوب کاملا اختصاصی با افزایش شیب دمایی و جدا شدن دو رشته DNA از همدیگر حاصل گردید. ارزیابی مشاهده ای منحنی های ذوب نرمال شده، نمایه های مشابه را در تمامی نمونه ها نشان داد. تمامی نمونه ها دارای یک منحنی ذوب با پیک واحد در بازه دمایی ۸۷/۹–۸۷/۸ درجه سلسیوس بودند (شکل ۱–a). همچنین همه نمونه ها منحنی های نرمال مشابه تولید کردند (شکل ۱–b). در این ژن هیچکدام از منحنی های HRM سویه های رفرانس از همدیگر قابل تشخیص نبودند و این عدم تشخیص و روافتادگی منحنی ها نشان از اختصاصی بودن محصولات PCR و به دنبال آن اختصاصی عمل کردن آغازگرها دارد که با توجه به این داده ها و مشاهدات عینی، می توان این آغازگرها را به عنوان نشانگر موثری در تشخیص گونه های *سالمونلا* مشکوک برای آنالیز منحنی ذوب مورد استفاده قرار داد.

بحث

استفاده از روش های مولکولی به منظور تشخیص سریع و مطمئن جدایه های باکتریایی یک ابزار بسیار مفید و کارآمد در جهت تشخیص زودهنگام و جلوگیری از همه گیری این بیماری ها می باشد. با توجه به اهمیت بیماری سالمونلوز ایجاد شده به وسیله باکتری *سالمونلا* و همچنین سختی کار با روش های رایج سنتی برای تشخیص سریع این باکتری، در این تحقیق با استفاده از تکنیک واکنش زنجیره ای پلی مراز و آنالیز منحنی ذوب ناشی از سنتز یک ناحیه ژنی مشخص با آغازگرهای اختصاصی آن ژن، توانمندی و دقت این تکنیک مورد ارزیابی قرار گرفت. با توجه به داده های بدست آمده مشخص گردید که قطعات DNA تکثیرشده PCR از ناحیه ثابت ژن *سالمونلا* ژن *invA* می باشد که این نتایج قابل انتظار بود. با این روش می توان به آسانی نمونه های مشکوک به *سالمونلا* را شناسایی کرد. زیرا تمامی باکتری های *سالمونلا* در این روش نمایه های متداول و همچنین نرمال مشابه تولید می کنند . این روش به وسیله چندین محقق برای شناسایی همه جدایه ها و سویه های سالمونلا استفاده شده است (۱۱ و ۱۲).



شکل ۱: آنالیز منحنی ذوب متداول (a) و نرمال شده (b) آمپلیکون های ژن *inv A* ۹ سویه رفرانس *سالمونلا*.

با استفاده از سه روش کشت، الایزا و PCR، فراوانی سویه های *سالمونلا* در نمونه های کشت داده شده به ترتیب ۵۵٪، ۴۷٪ و ۶۵٪ گزارش گردید. همچنین نتایج نشان داد که استفاده از روش PCR و پرایمرهای *invA* با یک مرحله غنی سازی اولیه ۲۰ ساعته در محیط BPW می توان در مدت ۲۴ تا ۳۰ ساعت با حساسیت و ویژگی ۱۰۰٪ وجود *سالمونلا* را در نمونه های غذایی مشخص نمود (۱۳). افزایش مسمومیت های غذایی از طریق عفونت سالمونلایی، ضرورت وجود یک روش قابل اعتماد به منظور تفکیک سریع جدایه های *سالمونلا* را نشان می دهد (۱۴). مطالعات نشان داده است که شایع ترین ژن هدف برای تشخیص *سالمونلا* از طریق روش های مبتنی بر PCR ژن *invA* می باشد (۱۵). مطالعات مختلفی، استفاده از ژن *invA* به عنوان یک ژن فعال در اکثر سروتیپ های سالمونلا با حساست بالا در طی مرحله تکثیر با PCR را گزارش نموده اند (۱، ۱۶–۱۸). در مطالعه حاضر مشخص گردید که استفاده از این ژن می تواند تشخیص و تمایز سویه های رفرانس *سالمونلا* را در حد جنس مورد تایید قرار دهد که با مطالعات مشابه بسیار نزدیک می باشد. استفاده ازتکنیک HRM در تشخیص های آزمایشگاهی گزارش شده است (۱۹). همچنین بر اساس روش HRM مقایسه توانایی ژن های چندگانه و ناحیه فضای بین ژنی مربوط به 16S-23S به منظور تشخیص و تمایز سویه های TS11 متعلق به گونه *مایکوپلاسما گالی سپتیکوم* (*Mycoplasma galisepticom*) جدا شده از مزرعه گزارش شده است (۲۰). مطالعات اخیر نشان داده است که با تغییر در میزان غلظت DNA مورد استفاده در واکنش Real time PCR متعلق به ۵ سویه از باکتری *سالمونلا* در مواد غذایی می توان دمای ذوب آغازگرها را از ۸۹ درجه سلسیوس به حدود ۸۱ درجه سلسیوس پایین آورد. این امر می تواند موجب تمایز سریع تر و دقیق تر سویه ها و تعیین چند شکلی بین آن ها شده است (۲۱). در مطالعه ای دیگر با استفاده از ۸ جفت آغازگر اختصاصی تشخیص و تعیین ژنوتیپ جدایه های *سالمونلا* با روش HRM مورد بررسی قرار گرفته است و نشان داده شد که این روش کارایی لازم به منظور آنالیز سروتیپ های این جنس رت دارد (۲۲). همچنین با استفاده از تکثیر نواحی ریبوزومی 16S rRNA تشخیص باکتریایی ناشی از *سالمونلا انتریتیدیس* (*S. Enteritidis*) در خون یک بیمار در مدت ۶ ساعت به روش PCR-HRM گزارش شده است (۲۳). موتاسیون ژن *gyrA* که عامل مقاومت به ترکیبات کینولون (فلوروکینولون) در باکتری های *سالمونلا* تایفی (*S.* Typhi) و *سالمونلا* پاراتایفی (*S.* Paratyphi) می باشد با استفاده از روش HRM، در سروتایپ های مختلف جنس *سالمونلا* مورد ارزیابی قرار گرفت و مشخص گردید که موتاسیون در ژن *gyrA* در این سروتیپ ها موجب کاهش GC و در نتیجه کاهش دمای ذوب در جدایه های موتاسیون یافته می شود که از این رو می تواند به سرعت از تایپ های دیگر شناسایی گردد (۸). استفاده از روش منحنی ذوب با شفافیت بالا همراه با با توالی یابی نواحی ریبوزومی 16S rRNA قادر به تشخیص و تعیین جمعیت میکروبی در ماهی های صید شده *دیسن تراکوس لابراکس* (*Dicentrarchus labrax*) در حال نگهداری در سردخانه شده است. این تکنیک قادر بوده است در بازه های زمانی کوتاه افزایش جمعیت میکروبی را تعیین نماید (۲۴). با استفاده از تکنیک منحنی ذوب با شفافیت بالا و استفاده از نشانگر SNPs تشخیص و تمایز سویه های باکتری های *سالمونلا* پولوروم و *سالمونلا* گالیناروم امکان پذیر شده است و توانسته است از اشتباهات قبلی ناشی از تشخیص فنوتیپی و سرولوژیکی جلوگیری نماید.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج بدست آمده در این تحقیق مشخص گردید که تکنیک HRM، یک روش تک مرحله ای ساده، ارزان، دقیق و سریع است که قادر به تمایزقابل توجه سویه های متعلق به یک گونه را دارد. از این رو با استفاده از این روش می توان در مطالعات اپیدمیولوژی برای تشخیص سریع و کارامد سویه های مربوط به گونه های مختلف باکتریایی در آزمایشگاه های تشخیصی استفاده نمود.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان تمامی نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده ها و داده سازی را در این مقاله رعایت کرده اند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از مدیریت و پرسنل مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی استان یزد به دلیل مساعدت و فراهم کردن شرایط جمع آوری نمونه های آزمایشگاهی و آقای دکتر سیدکاظم دانشیار گروه زیست شناسی دانشگاه یزد به دلیل همکاری در نگارش مقاله کمال امتنان را دارند.

تعارض در منافع

وجود ندارد.

References

1. Chiu C-H, Ou JT. Rapid identification of *Salmonella* serovars in feces by specific detection of virulence genes, invA and spvC, by an enrichment broth culture-multiplex PCR combination assay. Journal Clin Microbiol. 1996; 34(10): 2619-2622.
2. Nair S, Patel V, Hickey T, Maguire C, Greig DR, Lee W, Godbole G, Grant K, Chattaway MA. Real-time PCR assay for differentiation of typhoidal and nontyphoidal *Salmonella*. J Clin Microbiol. 2019; 57(8): e00167-19.
3. Hyeon J-Y, Mann DA, Wang J, Kim WK, Deng X. Rapid detection of *Salmonella* in poultry environmental samples using real-time PCR coupled with immunomagnetic separation and whole genome amplification. Poultry Sci. 2019; 98(12): 6973-6979.
4. Darushi M, Doosti A, Kargar M. The prevalence of plasmid genes spvB, spvC and spvR in Salmonella enteritidis isolated from poultry industry in Chaharmahal va Bakhtiari Province. J Microb World. 2015; 7(4): 281-288.
5. Shah DH, Park J-H, Cho M-R, Kim M-C, Chae J-S. Allele-specific PCR method based on rfbS sequence for distinguishing *Salmonella gallinarum* from *Salmonella pullorum*: serotype-specific rfbS sequence polymorphism. J of Microbiolo Meth. 2005; 60(2): 169-177.
6. Bai M, Wang C, Yin H, Tian Y, Li J. Evaluation of different reaction systems for HRM analysis in apple. Biosc Meth. 2012; 3.
7. DuBois CL, Dubois DA. Strategic HRM as social design for environmental sustainability in organization. Hum Res Manag. 2012; 51(6): 799-826.
8. Slinger R, Bellfoy D, Desjardins M, Chan F. High-resolution melting assay for the detection of gyrA mutations causing quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovars Typhi and Paratyphi. Diagn Microbiol Infect Dis. 2007; 57(4): 455-458.
9. Rahn K, De Grandis SA, Clarke RC, McEwen SA, Galan JE, Ginocchio C. Amplification of an invA gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of Salmonella. Mol Cellul Probes. 1992; 6(4): 271-279.
10. Sanders K, Shipton H, Gomes JF. Guest editors introduction: Is the HRM process important? Past, current, and future challenges. Hum Res Manag. 2014; 53(4): 489-503.
11. Bingga G, Liu Z, Zhang J, Zhu Y, Lin L, Ding S. High resolution melting curve analysis as a new tool for rapid identification of canine parvovirus type 2 strains. Mol Cellul Probes. 2014;

28(5-6): 271-278.

12. Ren X, Fu Y, Xu C, Feng Z, Li M, Zhang L. High resolution melting (HRM) analysis as a new tool for rapid identification of *Salmonella enterica* serovar Gallinarum biovars Pullorum and Gallinarum. Poultry Sci. 2016; 96(5): 1088-1093.

13. Hoseinpour M, Sabokbar A, Baklhtiari A, Parsa S. Comparison of bacterial culture, ELISA and PCR techniques for detection of *Salmonella* in poultry meat samples collected from Tehran. J Microb World. 2013; 6(6): 62-72.

14. Bell RL, Jarvis KG, Ottesen AR, McFarland MA, Brown EW. Recent and emerging innovations in *Salmonella* detection: a food and environmental perspective. Microb Biotechnol. 2016; 9(3): 279-292.

15. Rahn K, De Grandis S, Clarke R, McEwen S, Galan J, Ginocchio C. Amplification of an invA gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of Salmonella. Mol Cellul Probes. 1992; 6(4): 271-279.

16. Galan JE, Ginocchio C, Costeas P. Molecular and functional characterization of the *Salmonella* invasion gene invA: homology of InvA to members of a new protein family. J Bacteriol. 1992; 174(13): 4338-4349.

17. Nucera DM, Maddox CW, Hoien-Dalen P, Weigel RM. Comparison of API 20E and invA PCR for identification of *Salmonella enterica* isolates from swine production units. J Clin Microbiol. 2006; 44(9): 3388-3390.

18. Salehi TZ, Mahzounieh M, Saeedzadeh A. Detection of invA gene in isolated *Salmonella* from broilers by PCR method. Int J Poult Sci. 2005; 4(8): 557-559.

19. Zambounis A, Ganopoulos I, Chatzidimopoulos M, Tsaftaris A, Madesis P. High-resolution melting approaches towards plant fungal molecular diagnostics. Phytoparasitica. 2015; 43(2): 265-272.

20. Diaz MH, Winchell JM. The evolution of advanced molecular diagnostics for the detection and characterization of Mycoplasma pneumoniae. Front Microbiol. 2016; 7: 232-242.

21. Hu M, Yang D, Wu X, Luo M, Xu F. A novel high-resolution melting analysis-based method for Salmonella genotyping. J Microbiol Meth. 2020; 172: 105-110.

22. Bratchikov M, Mauricas M. Development of a multiple-run high-resolution melting assay for Salmonella spp. genotyping: HRM application for *Salmonella* spp. subtyping. Diagn Microbiol Infect Dis. 2011; 71(3): 192-200.

23. Jeng K, Yang S, Won H, Gaydos CA, Hsieh Y-H, Kecojevic A, Carroll KC, Hardick J, Rothman RE. Application of a 16S rRNA PCR–high-resolution melt analysis assay for rapid detection of *Salmonella bacteremia*. J Clin Microbiol. 2012; 50(3): 1122-1124.

24. Syropoulou F, Parlapani FF, Bosmali I, Madesis P, Boziaris IS. HRM and 16S rRNA gene sequencing reveal the cultivable microbiota of the European sea bass during ice storage. International J Food Microbiol. 2020; 327: 108-116.