مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و دوم/شماره ۲۸۹/هفته دوم مرداد ماه ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۲/۲۲
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۳/۲۶

غربالگری و شناسایی مولکولی سویه‌های سالمونلا اینفنتیس

هدیه رحمتی[۱]، دکتر رضا رنجبر[۲]، دکتر مهدی قیامی‌راد[۳]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: در میان سروتایپ‌های مختلف سالمونلا، سروتایپ اینفنتیس در زمره‌ی مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای انسان و حیوان می‌باشد که شیوع آن در حال افزایش می‌باشد. ژن‌های خانه‌دار، ژن‌هایی هستند که برای عملکرد سلول ضروری می‌باشند و به طور معمول، در تمام سلول‌ها بیان می‌شوند و می‌توانند به عنوان ژن‌های تشخیصی در غربالگری عوامل باکتریایی مد نظر قرار گیرند. از این رو، هدف از این مطالعه، بررسی ژن‌های خانه‌دار به منظور غربالگری و تشخیص مولکولی سالمونلا انتریکا سروتایپ اینفنتیس بود.

روش‌ها: در مطالعه‌ی حاضر، ۴۰ ایزوله‌ی سالمونلا انتریکا جدا شده از بیماران مشکوک به عفونت با این باکتری که از چند بیمارستان شهر تهران جمع‌آوری گردیده بودند، وارد مطالعه شد. پس از تأیید ایزوله‌های سالمونلا با استفاده از روش‌های استاندارد بیوشیمیایی و باکتریولوژیکی، از PCR (Polymerase chain reaction) با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن‌های aroC (Chorismate synthase)، purE (Phosphoribosylaminoimidazole carboxylas) و thrA (Aspartokinase + homoserine dehydrogenase) جهت غربالگری و تشخیص مولکولی سالمونلا انتریکا سروتایپ اینفنتیس استفاده گردید. از باکتری‌های شیگلا و اشرشیاکلی به عنوان سویه‌های باکتریایی شاهد استفاده شد.

یافته‌ها: ژن‌های خانه‌دار با اندازه‌ی محصول ۸۲۶ جفت باز برای ژن aroC، ۵۱۰ جفت باز برای ژن purE و ۸۵۲ جفت باز ژن thrA در تمامی نمونه‌های سالمونلا انتریکا سروتایپ اینفنتیس قابل ردیابی هستند. جهت ارزیابی اختصاصی بودن نتایج آزمون بر روی سایر باکتری‌های روده‌ای شاهد، هیچ گونه واکنش مثبتی را نشان نداد که حکایت از ویژگی مناسب این ژن‌ها در غربالگری این باکتری نسبت به سایر باکتری‌های روده‌ای دارد.

نتیجه‌گیری: ژن‌های خانه‌دار انتخاب شده، اهداف مناسبی جهت تشخیص و افتراق سویه‌های سالمونلا انتریکا سروتایپ اینفنتیس می‌باشند.

واژگان کلیدی: سالمونلا اینفنتیس، ژن‌های خانه‌دار، Chorismate synthase، Phosphoribosylaminoimidazole carboxylas، Aspartokinase + homoserine dehydrogenase

ارجاع: رحمتی هدیه، رنجبر رضا، قیامی‌راد مهدی. **غربالگری و شناسایی مولکولی سویه‌های سالمونلا اینفنتیس.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۸۹): ۸۸۸-۸۷۹

مقدمه

سالمونلوزیس یکی از مهم‌ترین بیماری‌های عفونی در میان انسان‌ها و حیوانات است که توسط باکتری سالمونلا ایجاد می‌شود. این میکروارگانیسم یکی از علل عمده‌ی بیماری‌های دستگاه گوارش در سراسر جهان است (۱). باکتری سالمونلا گرم منفی، بی‌هوازی اختیاری و متحرک با تاژه‌های پریتریش می‌باشد که متعلق به خانواده‌ی انتروباکتریاسه است و به طور گسترده‌ای در طبیعت توزیع یافته‌اند. آن‌ها اغلب می‌توانند از طریق آب آلوده یا منابع غذایی با

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروب‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اهر، اهر، ایران
۲- دانشیار، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه اله (عج)، تهران، ایران
۳- استادیار، گروه میکروب‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر، اهر، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر رضا رنجبر
Email: ranjbarre@gmail.com

منشأ حیوانی از جمله فراورده‌های گوشت، مرغ، تخم مرغ و شیر در انسان مسمومیت ایجاد کنند (۵-۲).

عفونت‌های سالمونلایی می‌توانند سبب بروز بیماری با اشکال بالینی چون گاستروآنتریت، تب روده‌ای و سپتی سمی با ضایعات موضعی شوند. این بیماری‌ها با علایمی چون تب، اسهال و دردهای ناحیه‌ی شکمی همراهند و اغلب ۸-۴ روز به طول می‌انجامند (۶). در طی موارد گزارش شده، سروتیپ‌های سالمونلا انتریتیدیس و اینفنتیس از عوامل شیوع ۹۰ درصد از عفونت‌های سالمونلوز می‌باشند که سروتایپ اینفنتیس از سروارهای شایع بروز این بیماری به ویژه در میان کودکان است (۸-۷). همچنین گزارش‌ها به دست آمده در سال‌های اخیر نشان دهنده‌ی افزایش شیوع ناگهانی سالمونلاهای غیر تیفوئیدی در برخی از کشورها آسیایی و اروپایی است (۱۰-۹). در حال حاضر، به منظور کنترل و نظارت بر گسترش این عفونت‌ها نیاز به تشخیص سریع و به موقع این باکتری در مواد غذایی و افراد مشکوک به عفونت است. تا کنون از روش‌های مختلفی همچون تکنیک‌های کشت، آزمون‌های بیوشیمیایی و الایزا برای شناسایی سالمونلای تیفوئیدی و غیر تیفوئیدی استفاده شده است که بسیار پرهزینه و با اتلاف وقت همراه بوده‌اند (۱۲-۱۱).

امروزه با وجود روش‌های نوین و سریع تشخیص مولکولی در زمان کمتری میکروارگانیسم‌ها قابل شناسایی می‌گردند؛ به طوری که از تکنیک PCR (Polymerase chain reaction) و انواع آن به منظور شناسایی پاتوژن‌ها استفاده می‌شود (۱۴-۱۳). ژن‌های خانه‌دار، ژن‌هایی هستند که به طور معمول در تمام سلول‌ها بیان می‌شوند و در تولید پروتئین‌هایی که برای عملکرد سلول ضروری می‌باشند، نقش دارند. پروتئین‌های تولید شده توسط این ژن‌ها دارای تفاوت‌هایی هستند؛ به این ترتیب که برخی در فرایندهای لازم برای بقای سلول، بعضی از ژن‌ها در حفظ عملکرد سلول و تعدادی در تعمیر و نگهداری از سلول نقش دارند. در این میان ژن‌های aroC (Chorismate synthase)، purE (Phosphoribosylaminoimidazole carboxylas)، thrA (Aspartokinase + homoserine dehydrogenase) مسؤول سنتز پروتئین‌های نام برده در سلول باکتری می‌باشند (۱۵).

هدف از این مطالعه بررسی ژن‌های خانه‌دار به منظور غربالگری و تشخیص مولکولی سالمونلا انتریکا سروتایپ اینفنتیس می‌باشد.

روش‌ها

نمونه‌های مورد استفاده در این مطالعه شامل سویه‌های سالمونلا انتریکا سروتایپ اینفنتیس بودند که از نمونه‌های بالینی مدفوع از بیماران مشکوک به عفونت سالمونلا و دارای علایم گوارشی مراجعه کننده به مرکز طبی کودکان، بیمارستان بقیه‌الله و برخی آزمایشگاه‌های سطح تهران جمع‌آوری گردیده بودند. برای جداسازی و تشخیص نمونه‌ها از روش‌های استاندارد میکروبیولوژی و سرولوژی استفاده گردید. نمونه‌های مدفوع ابتدا در سلنیت F برده شد و پس از ۱۲-۸ ساعت در محیط‌های کشت انتخابی XLD (Xylose lysine deoxycholate) و SSagar (Salmonella shigella agar) کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ ^{o}C قرار گرفتند (۱۶).

سپس، کلنی‌های مشکوک به سالمونلا با آزمایش‌های بیوشیمیایی و محیط‌های افتراقی همچون TSI (Texas success initiative)، MR-VP (Methyl red-voges proskauer)، اوره، لیزین آیرون آگار و سیمون سیترات جداسازی و مورد تأیید قرار گرفتند. به منظور مشخص نمودن آنتی ژن O با آنتی سرم مربوط، از آزمایش سروتایپینگ استفاده گردید که پس از تهیه‌ی سوسپانسیون باکتری و مجاور کردن آن با آنتی سرم، در صورت مثبت بودن به مدت ۲-۱ دقیقه آگلوتیناسیون مشاهده گردید. آنتی ژن‌های H و Vi نیز به همین ترتیب تعیین گردیدند (۱۸-۱۷). از کل ایزوله‌های سالمونلا، سویه‌های مربوط به سروتایپ اینفنتیس وارد مطالعه شدند.

پس از جداسازی ایزوله‌های باکتری‌ها با استفاده از روش‌های استاندارد باکتریولوژیک و سرولوژیک، باکتری‌ها در محیط‌هایی مانند BHI (Brain-heart infusion) و LB (Lysogeny broth) کشت داده شدند و در ادامه با استفاده از روش فنل-کلروفرم، DNA ژنومیک از ایزوله‌ها طبق استاندارد خارج شد. سلول‌های باکتریایی در معرض EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) و SDS (Sodium dodecyl sulfate) ۵ درصد و آنزیم پروتئیناز K قرار داده شد و سپس عمل استخراج توسط فنل-کلروفرم و ایزوآمیل الکل صورت گرفت و DNA به وسیله‌ی سدیم استات و اتانول مطلق رسوب داده شد. سپس DNA با اتانول ۷۰ درصد شستشو و در دمای اتاق خشک گردید و DNA به دست آمده در بافر TE (Tris-EDTA buffer) حل شد.

پس از استخراج DNA از سویه‌های مربوط، جهت شناسایی با واکنش PCR از پرایمرهای اختصاصی سه ژن thrA، pure و aroC بر اساس نتایج آنالیز آن‌ها با کمک نرم‌افزار BLAST در پایگاه ژنی NCBI، استفاده گردید که توالی پرایمرهای مورد نظر توسط Stepan و همکاران نیز مورد تأیید و استفاده قرار گرفته بود (۱۹).

همچنین به منظور اطمینان از اختصاصی بودن طراحی آن‌ها در پایگاه مرکزی ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI یا National Center for Biotechnology Information) صحت آن‌ها بررسی شد که در جدول ۱ خصوصیات ترادف هر یک از پرایمرها آمده است. در ادامه نیز برای بهینه‌سازی مواد مورد نیاز واکنش PCR، طی چند مرحله با تغییر بر روی غلظت مواد اولیه از جمله پرایمرها، (Deoxyribonucleotide triphosphate) dNTP و Taqپلیمراز، مقدار مناسب برای هر یک جهت انجام PCR انتخاب شد.

جدول ۱. توالی پرایمرهای ژن‌های مورد استفاده در این مطالعه

توالی پرایمرها	اندازه‌ی محصول PCR
thrA F ۵’ -GTC ACG GTG ATC GAT CCG GT- ۳’ thrA R ۵’ -CAC GAT ATT GAT ATT AGC CCG- ۳’	۸۲۵ bp
purE F ۵’ -ATG TCT TCC CGC AAT AAT CC- ۳’ purE R ۵’ -TCA TAG CGT CCC CCG CGG ATC- ۳’	۵۱۰ bp
aroC F ۵’ -CCT GGC ACC TCG CGC TAT AC- ۳’ aroC R ۵’ -CCA CAC ACG GAT CGT GGC G- ۳’	۸۲۶ bp

شرایط برقراری واکنش PCR برای ارزیابی این ژن‌ها در حجم استاندارد ۲۵ µl صورت پذیرفت. در این حجم ۱ µl DNA باکتری، ۲/۵ µl بافر X ۱۰، ۲/۵ واحد آنزیم Taq polymerase، پرایمر R و F هر یک ۱ pmol و آب مقطر تزریقی ۱۷ µl مورد استفاده قرار گرفت و همچنین یک واکنش با همین شرایط و استفاده از آب دیونیزه به جای ژنوم باکتری به عنوان شاهد منفی قرار داده شد. به منظور بهینه‌سازی دمای اتصال پرایمرها، بر روی سیکل‌های حرارتی و زمان انجام واکنش تغییراتی صورت پذیرفت و به ترتیب درجه‌ی حرارت ۵۲ °C، ۶۰ و ۶۵ منظور شد.

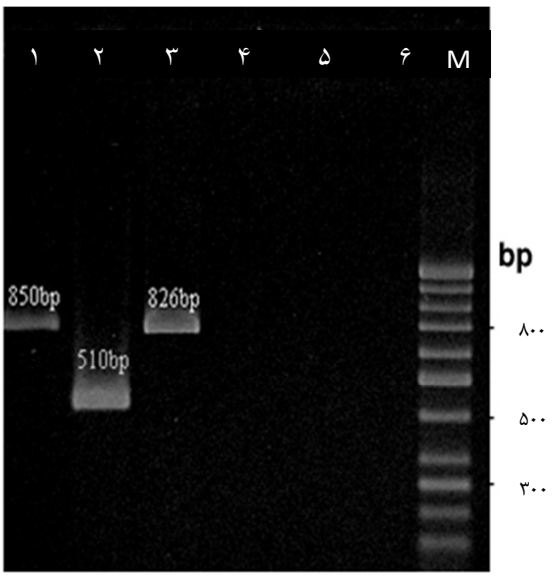
تکثیر با استفاده از دستگاه ترموسایکلر و سیکل‌های حرارتی تعیین شده و واکنش PCR در شرایط مناسب طبق جدول ۲، انجام پذیرفت و در انتها به منظور ارزیابی نتایج حاصل از PCR، مقدار ۵ µl از محصول واکنش با ۱ µl لودینگ بافر مخلوط شد و ژل الکتروفورز ایزوله‌ها در ولتاژ ۸۰ V به مدت ۴۵ دقیقه در ژل آگارز ۱/۵ درصد صورت گرفت و سپس با محلول اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی انجام شد.

جدول ۲. برنامه‌ی دمایی دستگاه ترموسایکلر برای تکثیر ژن‌های مورد بررسی

چرخه	نام مرحله	تعداد چرخه	زمان	دما
اول	واسرشت اولیه	۱ بار	۵ دقیقه	۹۴ °C
دوم	واسرشت شدن		۱ دقیقه	۹۴ °C
	اتصال پرایمرها	۳۰ بار	۱ دقیقه	۵۲ °C
	گسترش		۱ دقیقه	۷۲ °C
سوم	گسترش نهایی	۱ بار	۷ دقیقه	۷۲ °C

یافته‌ها

ژن‌های خانه‌دار با اندازه‌ی قطعه‌ی ۸۲۶ جفت باز برای ژن aro، ۵۱۰ جفت باز برای ژن pur و ۸۵۲ جفت باز برای ژن thr در تمامی نمونه‌های سالمونلا انتریکا سروتایپ اینفنتیس وجود دارند و قادرند به طور اختصاصی سالمونلا اینفنتیس را شناسایی نمایند. در آزمایش به عمل آمده بر روی سایر باکتری‌های روده‌ای اعم از اشرشیاکلی و شیگلا، هیچ گونه واکنشی مشاهده نشد. شکل ۱ باندهای اختصاصی واکنش PCR در سویه‌های سالمونلا اینفنتیس را نشان می‌دهد. بر اساس این شکل، نتایج به دست آمده نشان دهنده‌ی ویژگی اختصاصی این ژن‌ها در غربالگری این باکتری نسبت به سایر باکتری‌های روده‌ای می‌باشد.



شکل ۱. باندهای اختصاصی واکنش PCR. ردیف‌های ۱ تا ۳ به ترتیب شامل نتایج تکثیر ژن thrA (۸۲۵ جفت باز)، ژن purE (۵۱۰ جفت باز)، ژن aroC (۸۲۶ جفت باز) باکتری سالمونلا اینفنتیس و ردیف‌های ۴ تا ۶ به ترتیب مربوط به نتایج PCR بر روی سویه‌های باکتریایی اشرشیاکلی، شیگلا و نمونه‌ی شاهد منفی است. ردیف M اندازه‌ی نشانگر ۱۰۰ جفت بازی می‌باشد

بحث

در حال حاضر جنس سالمونلا بر اساس طرح کافمن وایت (Kauffmann-White) بیش از ۲۴۰۰ سروتایپ دارد که بر طبق خصوصیات آنتی ژنی O و H دسته‌بندی شده‌اند (۲۰، ۳). عفونت‌های ناشی از سویه‌های سالمونلا می‌توانند با نشانه‌هایی چون اختلالات روده‌ای که ممکن است منجر به مرگ شود، به خصوص در کودکان و بیماران دارای نقص سیستم ایمنی دیده شود. به همین منظور، نظارت مؤثر برای توسعه‌ی استراتژی‌های تشخیص و درمان منطقی این بیماری انسانی و در دسترس بودن دقیق و صحیح داده‌های مربوط به اپیدمیولوژی سالمونلا حایز اهمیت است (۲۱).

مطالعات صورت گرفته توسط Gal-Mor و همکاران در فلسطین اشغالی نشان می‌دهد که کاهش در روند عفونت سالمونلایی از ۸۶/۹ مورد در ۱۰۰۰۰۰ نفر در سال ۱۹۹۵ به ۳۱/۴ مورد در سال ۲۰۰۵ رسیده است که در این مدت، سروارهای غالب به ترتیب شامل انترتیدیس، تیفی موریوم، Vichow و Hader هستند که پس از Infantis قرار گرفتند. از سال ۲۰۰۶ بروز سالانه‌ی سالمونلای غیر تیفوئیدی شروع به افزایش نموده است و این روند به حدود ۴۴/۰ مورد در ۱۰۰۰۰۰ نفر در سال ۲۰۰۹ رسیده است که با افزایش شیوع این سروار همزمان بوده است. همچنین بیماران آلوده به سالمونلا اینفنتیس از ۱/۲ مورد در ۱۰۰۰۰۰ نفر در سال ۲۰۰۱ به ۱۴/۷ در سال ۲۰۰۹ رسیدند که افزایش ۱۲ برابری را نشان داده است. این افزایش شیب سروار از منابع انسانی و نیز با فرکانس بالای اینفنتیس جدا شده از طیور در سال ۲۰۰۶ در ارتباط است. سالمونلا اینفنتیس سروار غالب در طیور در طی سال‌های ۰۷-۲۰۰۶ مطرح شده است؛ در حالی که سروارهای دیگر کاهش را نشان داده بودند (۲۱).

امروزه جنس سالمونلا یکی از مهم‌ترین باکتری‌های عامل عفونت‌های گوارشی مشترک بین انسان و حیوانات در سراسر جهان است و به صورت مشکلی اساسی برای بهداشت عمومی مطرح می‌باشد. از این رو کنترل میکروبی مواد غذایی و پیشگیری از گسترش سالمونلا و ارایه‌ی محصولات غذایی سالم از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد (۲۲، ۳).

در مطالعه‌ای که توسط Bouchrif و همکاران در مراکش صورت گرفت، درصد کلی شیوع سالمونلا ۹۱ درصد بوده است؛ به طوری که از میان ۱۰۴ ایزوله‌ی سالمونلا انتریکای جدا شده از کشتارگاه‌ها و مواد غذایی مورد بررسی، ۲۵ ایزوله مربوط به سالمونلا اینفنتیس گزارش شده است (۲۳).

باکتری سالمونلا گونه‌ی انتریکا سروار اینفنتیس متعلق به رایج‌ترین سروارهای این پاتوژن در اروپا است؛ به طوری که در مدت سال‌های ۰۵-۲۰۰۴ سومین سروتیپ شایع جدا شده از نمونه‌های با منشأ انسانی در مجارستان تشخیص داده شده بود. همچنین سالمونلا اینفنتیس به عنوان یکی از سروتایپ‌های اصلی عامل سالمونلوز در نمونه‌های زیست محیطی ایتالیا مطرح شده است (۲۵-۲۴). در طی سال‌های ۰۳-۲۰۰۱ آلودگی به باکتری سالمونلا انتریکا سروار اینفنتیس به عنوان شایع‌ترین سروار از اطفال و نوزادان بستری شده در بیمارستان‌های آرژانتین جدا شده بود که ضرورت تشخیص به موقع این باکتری را آشکار می‌سازد (۲۶).

هم اکنون روش‌های متداول در تشخیص

پاتوژن‌های سالمونلا نیازمند زمان طولانی می‌باشد که البته کارایی چندانی ندارد؛ اما استفاده از تکنیک‌های مولکولی تشخیص همچون PCR در شناسایی و تفکیک عفونت‌های سالمونلایی از سایر اعضای خانواده‌ی انتروباکتریاسه‌ها اهمیت دارد (۲۷).

مطالعات بسیاری در داخل و خارج بر روی شناسایی سالمونلا بر پایه‌ی تکثیر اختصاصی برخی ژن‌ها انجام شده است. به عنوان مثال در مطالعه‌ای که سعادتی و همکاران بر روی بیماران مبتلا شده با استفاده از روش PCR و با طراحی پرایمر برای ژن ViB انجام دادند، محصول PCR سالمونلا تیفی با اندازه‌ی ۵۳۰ جفت باز به دست آمد. در ادامه‌ی این تحقیق، محصولات در معرض هضم آنزیم Taq ۱ قرار گرفت، نتایج این گروه نشان دهنده‌ی آن است که شناسایی ژن ViB با روش PCR به منظور تشخیص سالمونلا تیفی در نمونه‌های کلینیکی از حساسیت بالایی برخوردار است (۲۸).

Chaudhry و همکاران نیز با کمک ژن فلاژلین و استفاده از واکنش PCR به شناسایی یکی از سروتایپ‌های شایع سالمونلا و استانداردسازی در تشخیص آن پرداختند (۲۹).

نتایج دیگر از مطالعات انجام گرفته حاکی از آن است که استفاده از ژن‌های خاص با کمک تکنیک PCR دارای حساسیت مناسبی در تشخیص گونه‌های سالمونلا می‌باشد. چنانچه Cohen و همکاران با استفاده از ژن‌های SpvC و InvA در تشخیص سریع سروتایپ‌های سالمونلا اقدام نمودند (۳۰). Pathmanathan و همکاران نیز به بررسی ژن hilA در ۳۳ سویه از سالمونلا با استفاده از تکنیک PCR پرداختند (۳۱).

در تحقیقی دیگر، Kardos و همکاران به منظور شناسای سالمونلا اینفنتیس، روش PCR جدیدی را طراحی نمودند که قادر بود ژن FliB را تکثیر دهد. از آن جا که تا کنون توالی کامل ژنوم سالمونلا اینفنتیس تعیین توالی نشده است، می‌توان از توالی فوق که مسؤول تولید تاژک در باکتری است، به منظور شناسایی استفاده نمود (۳۲).

در ارزیابی‌هایی که بر روی ۱۰۰ نمونه‌ی جدا شده از گوشت و تخم مرغ با استفاده از تکنیک Real time-PCR و روش‌های سنتی انجام گرفت، انواع مختلفی از سروتایپ‌های سالمونلا از جمله سالمونلا انترتیدیس، سالمونلا اینفنتیس، سالمونلا هادار، سالمونلا لیوینگستون و سالمونلا تیفی شناسایی شدند که نتایج به دست آمده، بیانگر این بود که استفاده از تکنیک PCR در تشخیص سروتایپ‌های سالمونلا با سرعت و دقت لازم بسیار امیدوار کننده است (۳۴-۳۳).

در گزارش به دست آمده در سال‌های اخیر، اسهال‌های ناشی از سالمونلا از طیف وسیعی برخوردار شده است که این مشکل به خصوص در افراد مستعد سراسر جهان رو به افزایش می‌باشد و نیز به علت وجود فلورهای میکروبی متفاوت در نمونه‌های مدفوع بیماران، روند تحقیقات در جداسازی و تشخیص دقیق و به موقع سالمونلا دچار مشکلاتی شده است و محققان را نیازمند به افزایش توانایی در این زمینه نموده است (۳۵).

همان‌طور که اشاره شد ژن‌های کد کننده‌ی عوامل ویرولانس متعددی که به صورت جداگانه در DNA کروموزومی، باکتریوفاژی و پلاسمیدی قرار دارند و به منظور بررسی حدت و شدت بیماری‌زایی

سالمونلا مورد آزمایش قرار گرفته‌اند، در تشخیص گونه‌های این باکتری دارای کاربرد مناسبی هستند. در مطالعه‌ی حاضر، جهت بررسی پیرامون ژن‌های خانه‌دار که از اهمیت ویژه‌ای در عملکردهای سلولی برخوردارند، به منظور غربالگری مولکولی و شناسایی سالمونلا اینفنتیس استفاده گردید. این ژن‌ها در تمام سلول‌ها به طور دایم بیان می‌شوند و همچنین در تولید پروتئین‌های خاصی که برای حفظ بقا و فعالیت‌های حیاتی سلول مورد نیاز هستند، نقش دارند. به همین منظور، از سه ژن خانه‌دار (aroC، thrA و purE) با کمک طراحی پرایمر اختصاصی برای این سه ژن جهت واکنش زنجیره‌ای پلیمراز PCR استفاده گردید (۳۷-۳۶).

نتایج نشان داد ژن‌های خانه‌دار در تمامی نمونه‌های سالمونلا انتریکا سروتایپ اینفنتیس وجود دارند و قادرند به طور اختصاصی سالمونلا اینفنتیس را شناسایی نمایند. آزمایش جهت تعیین اختصاصیت روش بر روی سایر باکتری‌های روده‌ای اعم از اشرشیاکلی و شیگلا هیچ گونه واکنش متقاطعی را نشان نداد و باند مد نظر هدف در باکتری‌های شاهد و همچنین نمونه‌ی شاهد منفی تکثیر نشد.

به عنوان نتیجه‌گیری می‌توان گفت ژن‌های انتخاب شده در این تحقیق، دارای توالی مناسبی جهت تشخیص و افتراق سویه‌های سالمونلا انتریکا سروتایپ اینفنتیس می‌باشند؛ از این رو در آینده می‌توان از این ژن‌ها در جهت غربالگری سروتایپ‌های سالمونلا در آزمایشگاه مولکولی استفاده نمود.

References

1. Lesser C, Miller SI. Salmonellosis. In: Fauci F, Braunwald E, Isselbacher KJ, editors. Harrison's principles of internal medicine. 17th ed. New York, NY: McGraw-Hill; 2001.
2. Porwollik S, Boyd EF, Choy C, Cheng P, Florea L, Proctor E, et al. Characterization of Salmonella enterica subspecies I genovars by use of microarrays. J Bacteriol 2004; 186(17): 5883-98.
3. Hendriksen SW, Orsel K, Wagenaar JA, Miko A, van DE. Animal-to-human transmission of Salmonella Typhimurium DT104A variant. Emerg Infect Dis 2004; 10(12): 2225-7.
4. Naghoni A, Ranjbar R, Tabaraie B, Farshad S, Owlia P, Safiri Z, et al. High prevalence of integron-mediated resistance in clinical isolates of Salmonella enterica. Jpn J Infect Dis 2010; 63(6): 417-21.
5. Ryan K. Sherris medical microbiology. 4th ed. New York, NY: McGraw-Hill; 2006. p. 343-73.
6. Brooks GF, Butel JS, Morse SA. Jawetz, Melinick and Adelberg's medical microbiology. 23th ed. New York, NY: McGraw-Hill; 2004.
7. Miller T, Prager R, Rabsch W, Fehlhaber K, Voss M. Epidemiological relationship between Salmonella Infantis isolates of human and broiler origin. Lohmann information 2010; 45(2): 27-31.
8. 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.
9. Fonseca EL, Mykytczuk OL, Asensi MD, Reis EM, Ferraz LR, Paula FL, et al. Clonality and antimicrobial resistance gene profiles of multidrug- resistant Salmonella enterica serovar infantis isolates from four public hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. J Clin Microbiol 2006; 44(8): 2767-72.
10. Ranjbar R, Sarshar M, Sadeghifard N. Characterization of genetic diversity among clinical strains of Salmonella enterica serovar infantis by ribotyping method. J Zanjan Univ Med Sci 2012; 20(81): 75-84. [In Persian].
11. Sabbagh SC, Forest CG, Lepage C, Leclerc JM, Daigle F. So similar, yet so different: uncovering distinctive features in the genomes of Salmonella enterica serovars Typhimurium and Typhi. FEMS Microbiol Lett 2010; 305(1): 1-13.

12. Marcus SL, Brumell JH, Pfeifer CG, Finlay BB. Salmonella pathogenicity islands: big virulence in small packages. Microbes Infect 2000; 2(2): 145-56.
13. Nizami SQ, Bhutta ZA, Siddiqui AA, Lubbad L. Enhanced detection rate of typhoid fever in children in a periurban slum in Karachi, Pakistan using polymerase chain reaction technology. Scand J Clin Lab Invest 2006; 66(5): 429-36.
14. Nagamine K, Hase T, Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. Mol Cell Probes 2002; 16(3): 223-9.
15. Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95(6): 3140-5.
16. Ranjbar R, Giammanco GM, Farshad S, Owlia P, Aleo A, Mammina C. Serotypes, antibiotic resistance, and class 1 integrons in Salmonella isolates from pediatric cases of enteritis in Tehran, Iran. Foodborne Pathog Dis 2011; 8(4): 547-53.
17. Ranjbar R, Salimkhani E, Sadeghifard N, Yazdi JZ, Morovvati S, Jonaidi N, et al. An outbreak of gastroenteritis of unknown origin in Tehran, July 2003. Pak J Biol Sci 2007; 10(7): 1138-40.
18. Karami A, Ranjbar R, Z Ahmadi, Z Safiri. Rapid detection of different serovares of Salmonella entrica by multiplex PCR. Iran J Public Health 2007; 36(2): 38-42.
19. Stepan RM, Sherwood JS, Petermann SR, Logue CM. Molecular and comparative analysis of Salmonella enterica Senftenberg from humans and animals using PFGE, MLST and NARMS. BMC Microbiol 2011; 11: 153.
20. Oosterom J. Epidemiological studies and proposed preventive measures in the fight against human salmonellosis. Int J Food Microbiol 1991; 12(1): 41-51.
21. Gal-Mor O, Valinsky L, Weinberger M, Guy S, Jaffe J, Schorr YI, et al. Multidrug-resistant Salmonella enterica serovar Infantis, Israel. Emerg Infect Dis 2010; 16(11): 1754-7.
22. Liebana E, Garcia-Migura L, Clouting C, Cassar CA, Clifton-Hadley FA, Lindsay EA, et al. Investigation of the genetic diversity among isolates of Salmonella enterica serovar Dublin from animals and humans from England, Wales and Ireland. J Appl Microbiol 2002; 93(5): 732-44.
23. Bouchrif B, Paglietti B, Murgia M, Piana A, Cohen N, Ennaji MM, et al. Prevalence and antibiotic-resistance of Salmonella isolated from food in Morocco. J Infect Dev Ctries 2009; 3(1): 35-40.
24. Bakshi CS, Singh VP, Wood MW, Jones PW, Wallis TS, Galyov EE. Identification of SopE2, a Salmonella secreted protein which is highly homologous to SopE and involved in bacterial invasion of epithelial cells. J Bacteriol 2000; 182(8): 2341-4.
25. Mirold S, Rabsch W, Rohde M, Stender S, Tschape H, Russmann H, et al. Isolation of a temperate bacteriophage encoding the type III effector protein SopE from an epidemic Salmonella typhimurium strain. Proc Natl Acad Sci U S A 1999; 96(17): 9845-50.
26. Merino LA, Ronconi MC, Navia MM, Ruiz J, Sierra JM, Cech NB, et al. Analysis of the clonal relationship among clinical isolates of Salmonella enterica serovar Infantis by different typing methods. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 2003; 45(3): 119-23.
27. Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. J Clin Microbiol 1990; 28(3): 495-503.
28. Saudati M, Ghorbani N, Barati B, Nazarian Sh, Shirazi m, Salehi M, et al. Detection of Salmonella typhi based on the viab sequence by polymerase chain reaction. J Sabzevar Univ Med Sci 2009; 16(4):221-7. [In Persian].
29. Chaudhry R, Laxmi BV, Nisar N, Ray K, Kumar D. Standardisation of polymerase chain reaction for the detection of Salmonella typhi in typhoid fever. J Clin Pathol 1997; 50(5): 437-9.
30. Cohen HJ, Mechanda SM, Lin W. PCR amplification of the fimA gene sequence of Salmonella typhimurium, a specific method for detection of Salmonella spp. Appl Environ Microbiol 1996; 62(12): 4303-8.
31. Pathmanathan SG, Cardona-Castro N, Sanchez-Jimenez MM, Correa-Ochoa MM, Puthucheary SD, Thong KL. Simple and rapid detection of Salmonella strains by direct PCR amplification of the hilA gene. J Med Microbiol 2003; 52(Pt 9): 773-6.
32. Kardos G, Farkas T, Antal M, Nogrady N, Kiss I. Novel PCR assay for identification of Salmonella enterica serovar Infantis. Lett Appl Microbiol 2007; 45(4): 421-5.
33. Khan AS, Swerdlow DL, Juranek DD. Precautions against biological and chemical terrorism directed at food and water supplies. Public Health Rep 2001; 116(1): 3-14.
34. Bohaychuk VM, Gensler GE, King RK, Manninen KI, Sorensen O, Wu JT, et al. Occurrence of pathogens in raw and ready-to-eat meat and poultry products collected from the retail marketplace in Edmonton, Alberta,

Canada. J Food Prot 2006; 69(9): 2176-82.

35. Eaves DJ, Randall L, Gray DT, Buckley A, Woodward MJ, White AP, et al. Prevalence of mutations within the quinolone resistance-determining region of gyrA, gyrB, parC, and parE and association with antibiotic resistance in quinolone-resistant Salmonella enterica. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48(10): 4012-5.

36. Spanakis E. Problems related to the interpretation of autoradiographic data on gene expression using common constitutive transcripts as controls. Nucleic Acids Res 1993; 21(16): 3809-19.

37. Aabo S, Rasmussen OF, Rossen L, Sorensen PD, Olsen JE. Salmonella identification by the polymerase chain reaction. Mol Cell Probes 1993; 7(3): 171-8.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 13.03.2014
Vol. 32, No. 289, 2nd Week, August 2014
Accepted: 16.06.2014

Screening and Molecular Detection of Salmonella Infantis

Hedieh Rahmati[1], Reza Ranjbar PhD[2], Mehdi Ghiyamirad PhD[3]

Original Article

Abstract

Background: Among different Salmonella serotypes, Salmonella infantis is one of the most important causes of illnesses in humans and animals and its prevalence is increasing. House, keeping genes are required for cell performance and are typically expressed in all types of the cells. These genes can be considered as screening targets for microbial detection. Therefore, the purpose of this study was to evaluate house-keeping genes as targets for screening and molecular detection of Salmonella infantis.

Methods: Forty Salmonella infantis strains, recovered from the patients with salmonellosis hospitalized in different hospitals of Tehran, Iran, were included in this study. Identification of the strains were done using standard biochemical and bacteriological methods; polymerase chain reaction (PCR) was used by specially designed primers of housekeeping genes (aroC, purE , thrA) for screening of Salmonella infantis. Some Shigella and Escherichia coli isolates were used as control strains.

Findings: The housekeeping genes were amplified successfully with the final size of 826 bp for aroC, 510 bp for purE and 852 bp for thrA genes in all Salmonella infantis. Any positive reaction seen when the test was done on Shigella and Escherichia coli strains, indicated that the method has good specificity.

Conclusion: According to the findings achieved in the study, it might be concluded that selected housekeeping genes used in current study are suitable target genes for screening and molecular detection of Salmonella infantis.

Keywords: Salmonella infantis, Housekeeping genes, aroC, pureE, thrA

Citation: Rahmati H, Ranjbar R, Ghiyamirad M. **Screening and Molecular Detection of Salmonella Infantis.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(289): 879-88

1- MSc Student, Department of Microbiology, Islamic Azad University, Ahar Branch, Ahar, Iran
2- Associate Professor, Molecular Biology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3- Assistant Professor, Department of Microbiology, Islamic Azad University, Ahar Branch, Ahar, Iran
Corresponding Author: Reza Ranjbar PhD, Email: ranjbarre@gmail.com