Journal of Military Medicine
Autumn 2014 ,Volume 16, Issue 3
Pages: 125-131

The Prevalence of Virulence Sodc1 and Sope1 Genes Among the Clinical Serotypes of *Salmonella enterica* in Tehran, Iran

Ranjbar R.[1*] PhD, Mohseni A.[2] MSc, Moosavi A.[3] MSc, Sarshar M. [1] MSc
Ahmadi A.[1] MSc, Izadi M.[4] MD, Jonaidi N.[4] MD

[1] Molecular Biology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[2] Department of Microbiology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[3] Department of Microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran
[4] Health Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Aims: There is few data on the occurrence of virulence genes in the endemic strains of Salmonella in Iran. This is why the current study has aimed to investigate the presence and the prevalence of sopE1 and sodC1 genes in Salmonella enterica serotypes isolated in Tehran, Iran.
Methods: In this descriptive study carried out from December 2008 to November 2010, 95 clinical samples were collected from different hospitals in Tehran. Bacterial isolation and identification was achieved through biochemical and serological methods. The Polymerase Chain Reaction (PCR) technique was used for the detection of sodC1 and sopE1 genes among the Salmonella strains.
Results: The frequency of the sodC1 and sopE1 genes were 100% and 95.7% respectively. Serotyping results showed that the most Salmonella isolates belonged to serotypes *S. entretidis*, *S. infantis* and *S. thyphimurium*.
Conclusion: For the first time this study reports the presence and prevalence of sopE1 and sodC1 genes in Salmonella enterica strains in Iran. When compared with the other reports from other countries, the frequency of the sopE1 and sodC1 genes in the *Salmonella enterica* strains isolated from Iran is extremely high.

Keywords: *Salmonella enterica*, Prevalence, Virulence Genes

[*]Corresponding author: Ranjbar R. Email: ranjbar@bmsu.ac.ir

مجله طب نظامی
دوره ۱۶، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۳
صفحات: ۱۳۱-۱۲۵

بررسی شیوع ژن‌های بیماریزایی *sodC1* و *sopE1* در سروتایپ های سالمونلا انتریکا جدا شده از موارد بالینی در تهران

رضا رنجبر[۱*] PhD، عاطفه محسنی[۲] MSc، علی موسوی[۳] MSc ، میثم سرشار[۱] MSc، علی احمدی[۱] MSc، مرتضی ایزدی[۴] MD، نعمت الله جنیدی[۴] MD

[۱] مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران
[۲] دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
[۳] دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، قم، ایران
[۴] مرکز تحقیقات بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران

چکیده

اهداف: اطلاعات کمی از وجود و میزان ژن‌های کد کننده فاکتورهای ویرولانس در سویه‌های اندمیک سالمونلا در کشور در دست است. هدف از انجام این تحقیق، بررسی شیوع ژن‌های بیماریزایی *sodC1* و *sopE1* در سروتایپ های سالمونلا انتریکا جدا شده از برخی بیمارستان‌های تهران می‌باشد.

روش‌ها: ۹۵ نمونه بالینی از بیماران مشکوک به عفونت با سالمونلا از برخی بیمارستان‌های تهران طی سال‌های ۱۳۸۶ الی ۱۳۸۹ جمع آوری گردید. این ایزوله‌ها با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی و سرولوژیک تعیین هویت گردیدند. نهایتاً حضور ژن‌های پاتوژنیسیته *sodC1* و *sopE1* توسط روش PCR تعیین شد.

یافته‌ها: فراوانی ژن‌های *sodC1* و *sopE1* به ترتیب ۱۰۰ و ۹۵/۷ درصد بود. بیشترین ایزوله‌های دارای ژن‌های پاتوژنیسیته متعلق به سه سروتایپ مختلف سالمونلا از جمله سروتایپ‌های انتریتیدیس، اینفنتیس و تیفی موریوم بودند.

نتیجه گیری: این مطالعه برای اولین بار در کشور وجود و شیوع ژن‌های مهم بیماریزایی *sodC1* و *sopE1* را در سالمونلا انتریکا گزارش می‌دهد. در مقایسه با نتایج سایر مطالعات دیگر کشورها، یافته‌های ما نشان داد که این ژن‌های پاتوژنیسیته با فرکانس وقوع بالا و به‌طور گسترده‌ای در بین سالمونلا انتریکاهای جدا شده از نمونه‌های بالینی در تهران یافت می‌شوند.

کلیدواژه‌ها: سالمونلا انتریکا، بیماری‌زایی، ژن‌های پاتوژنیسیته

*نویسنده مسئول: رضا رنجبر. پست الکترونیک: ranjbar@bmsu.ac.ir
دریافت مقاله: ۹۱/۱/۲۷ پذیرش مقاله: ۹۳/۷/۲۷

مقدمه

باکتری سالمونلا یکی از جنس‌های خانواده انتروباکتریاسه، گرم منفی، میله‌ای شکل، بدون اسپور و اندازه‌ای در حدود ۱/۵– ۰/۷× ۵–۲ میکرون می‌باشد. این باکتری به‌طور گسترده‌ای در محیط انتشار داشته و به‌عنوان پاتوژن‌های روده‌ای، عامل طیف وسیعی از بیماری‌های تب روده‌ای، گاستروانتریت، باکتریمی و سپتی‌سمی در انسان می‌باشند که اغلب از طریق تماس مستقیم و یا مصرف غذا و آب آلوده به مدفوع انسان یا حیوان و همچنین توسط ناقلین بدون علامت منتقل می‌شوند [۱–۳]. گاستروانتریت معمولاً در اثر گونه‌های سالمونلای غیر تیفوئیدی ایجاد می‌شود. علائم بیماری معمولاً ۸ الی ۳۶ ساعت پس از مصرف غذای آلوده شروع و در اغلب موارد با تب خفیف، تهوع و استفراغ، اسهال و کرامپ‌های شکمی همراه است. در ۱۵–۳ درصد موارد سالمونلوز، سالمونلاهای غیر تیفوئیدی از مواضع غیر روده‌ای مانند ادرار، زخم، خلط، CSF و مغز استخوان جدا شده‌اند که به‌ویژه در بیماران دچار نقص سیستم ایمنی مانند نوزادان نارس، افراد مبتلا به لوسمی، سرطان، ایدز و آنمی داسی شکل دارای اهمیت می‌باشد [۱، ۳–۵].

سالمونلوز یکی از مهم‌ترین بیماری‌های ایجاد شده توسط سالمونلا می‌باشد که باعث میلیون‌ها مورد بیماری انسانی و حیوانی و همچنین خسارات اقتصادی قابل توجهی در سراسر جهان می‌شود. در سال ۱۹۹۶، سازمان بهداشت جهانی (WHO) گزارش نمود که سالانه ۱/۳ میلیارد مورد بیماری سالمونلای غیر تیفوئیدی با علامت انتریت گوارشی حاد رخ داده و سه میلیون نفر در اثر ابتلا به این بیماری می‌میرند [۶، ۷]. مطالعات صورت گرفته نشان می‌دهد که در میان سروتایپ‌های سالمونلا، سروتایپ انتریتیدیس، تیفی‌موریوم و اینفنتیس از شیوع نسبتاً بیشتری نسبت به سایر سروتایپ‌ها برخوردار بوده و این سروتایپ‌ها از مهم‌ترین عوامل بیماریزای منتقله از طریق آب و غذا و مسبب گاستروانتریت در انسان می‌باشند [۸، ۹]. این باکتری‌ها به‌عنوان یکی از عوامل مهم خرابکاری آب و مواد غذایی نیز مطرح می‌باشند [۳].

گسترش ژن‌های پاتوژنیسیته به یک مشکل مهم در درمان عفونت‌های حاصل از باکتری‌های بیماری زا تبدیل شده است. ژن‌های ویرولانس متعددی در سالمونلا شناسایی شده‌اند که هر یک به‌صورت جداگانه در DNA کروموزومی، باکتریوفاژی و پلاسمیدی این باکتری قرار دارند [۱۰]. با این وجود، بیشتر این ژن‌های ویرولانس در کلاسترهای ژنی به نام جزایر پاتوژنیسیته قرار دارند. مطالعات صورت گرفته نشان می‌دهد که تاکنون بیش از ۲۰ جزایر پاتوژنیسیته در سالمونلا شناسایی شده است که کد کننده بسیاری از ژن‌های بیماریزای سالمونلا می‌باشند [۱۱]. این جزایر پاتوژنیسیته در نواحی بزرگی از DNA ژنومی سویه‌های بیماریزا قرار دارند (حدود ۱۰ الی ۲۰۰ کیلو باز) و این در حالی است که سویه‌های غیر بیماریزای سالمونلا فاقد این نواحی می‌باشند. با این وجود انتقال ژن‌های بیماریزا از سویه‌های پاتوژن به سویه‌های غیر پاتوژن طی فرایند انتقال افقی ژن، از طریق پلاسمیدها و باکتریوفاژها، اثبات شده است [۱۲]؛ بنابراین تشخیص به‌موقع و سریع عوامل پاتوژن باکتریایی و ژن‌های مسئول در بیماریزایی عوامل میکروبی در تشخیص زود به هنگام عفونت ایجاد شده و کنترل عوارض ناشی از آن بسیار حائز اهمیت است [۱۱، ۱۲].

روش‌های رایج تشخیصی سالمونلاهای تیفوئیدی و غیر تیفوئیدی در بسیاری از آزمایشگاه‌ها کماکان بر اساس روش‌های سنتی مانند کشت و تست‌های بیوشیمیایی صورت می‌گیرد که همگی دارای محدودیت‌هایی از جمله هزینه و زمان بر بودن انجام آن‌هاست [۱۳، ۱۴]. استفاده از روش‌های مولکولی تشخیصی همانند PCR بسیاری از این محدودیت‌های روش‌های سنتی را کاهش داده و از طرفی از سرعت و اختصاصیت بالایی برخوردار می‌باشد [۸، ۱۵]. در میان ژن‌های بیماریزای سالمونلا، ژن sodC1 یکی از ژن‌های درگیر در بیماریزایی سالمونلا می‌باشد که فعالیت سوپر اکسید دیسموتازی داشته و مانع از انفجار سلولی ماکروفاژها و عملکرد محافظتی آن در سلول می‌گردد [۱۶، ۱۷].

ژن sopE1 نیز از جمله ژن‌های باکتریوفاژی سالمونلا بوده و در ورود این باکتری به سلول‌های اپیتلیال روده پستانداران نقش دارد. SopE1 از طریق سیستم ترشحی تیپ ۳ به سیتوپلاسم سلول میزبان تزریق شده و باعث بازآرایی اکتین از اسکلت سلولی میزبان می‌گردد [۱۸، ۱۹]. در کشور تاکنون مطالعه‌ای بر روی وجود و شیوع ژن‌های بیماریزایی فوق در سالمونلا به انجام نرسیده است؛ از این‌رو این مطالعه با هدف بررسی شیوع دو ژن مهم بیماریزایی sodC1 و sopE1 در سروتایپ‌های مختلف سالمونلا انتریکا جدا شده از موارد بالینی در تهران با استفاده از روش PCR به انجام رسید.

روش‌ها

سویه‌های باکتریایی: طبق روش استاندارد مجموع ۹۵ نمونه بالینی از جمله مدفوع، خون، ادرار و مایع مغزی نخاعی از بیماران مشکوک به عفونت با سالمونلا از برخی بیمارستان‌های تهران از جمله بیمارستان مرکز طبی کودکان، بیمارستان بقیه الله الاعظم و برخی آزمایشگاه‌های مختلف در تهران طی سال‌های ۱۳۸۶ الی ۱۳۸۹ جمع آوری و وارد مطالعه گردید. معیار ورود به مطالعه، بیماران مشکوک به عفونت سالمونلا با علائمی همچون دل درد، اسهال، استفراغ و تب بودند. در مورد هر نمونه اطلاعاتی مثل سن، جنس، تاریخ نمونه گیری، درجه حرارت و سابقه احتمالی ابتلا یا درمان، نوع تغـــذیه و محل سکونت اخذ و ثبت گردید. نمونه‌های بیماران بلافاصله بعد از نمونه گیری در شرایط استریل به محیط آزمایشگاه منتقل و سپس با استفاده از آزمون‌های تشخیصی تائید گردیدند.

کشت، جداسازی و تعیین هویت باکتری‌ها: پس از انتقال نمونه‌ها در شرایط استریل به آزمایشگاه مرکز تحـقیقات بیـولوژی

مولکولی، ابتـدا بر روی محیطهـای اختـصاصی و افتراقی مانند XLD agar (Xylose lysine deoxycholate agar) وSS agar (Salmonella and Shigella agar) کشت و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد [۸، ۹]. کلونی‌های مشکوک به سالمونلا به محیط کشت سلنیت F انتقال و سپس توسط تست‌ها و محیط‌های افتراقی نظیر TSI، MRVP، اوره، لیزین آیرون آگار، سیمون سیترات جداسازی و مورد تائید قرار گرفت. پس از انجام آزمون‌های بیوشیمیایی، آزمون سروتایپینگ طبق دستورالعمل شرکت سازنده آنتی‌سرم‌های پلی‌والان و منووالان سالمونلا و با استفاده از جدول کافمن-وایت انجام شد. تمامی محیط‌های فوق ساخت شرکت مرک آلمان می‌باشد [۲۰، ۲۱]. بعد از جداسازی و تعیین هویت ایزوله‌های باکتریایی با استفاده از روش‌های استاندارد بیوشیمیایی، باکتریولوژیکی و سـرولـوژیـکی، باکتری‌ها در محیطهایی نظیر LB و BHI براث در ۱۰ – ۵ میلی لیتر از محیط‌های فوق کشت داده شدند و به مدت ۱۲ ساعت در انکوباتور شیکردار انکوبه گردید. سپس کدورت لوله‌های واجد کشت مایع باکتری‌ها با استفاده از اسپکتوفتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر قرائت گردید. محیط‌های کشت واجد باکتری به میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی لیتری منتقل و با سانتریفوژ ۹۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰–۵ دقیـقه رسـوب بـاکتری از مایع رویی جدا گردید. برای استخراج DNA باکتری، همزمان از دو روش لیز قلیایی و جوشاندن استفاده گردید. در روش آلکالین لایسیس به رسوب باکتری در میکروتیوب، ۵۰ لاندا SDS ۲٪ اضافه شد. میکروتیوب‌ها ۱۰ مرتبه سر و ته گردید و ۱۰-۵ دقیقه در دمای اتاق ماند. جهت دناتوره کردن پروتئین‌ها سدیم استات ۳-۵ مولار به میزان ۳۵۰ میکرولیتر اضافه گردید و میکروتیوب‌ها، ۱۰ دقیقه در دمای اتاق نگه داشته شد. سپس میکروتیوب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه و با دور ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. در روش جوشاندن به رسوب باکتری در میکروتیوب، ۲۵۰ میکرولیتر محلول STET اضافه گردید و ۱۰ دقـیقه در دمای اتاق نگه داشته شد، سپس میکروتیوب‌ها به مدت ۳ دقیقه در آب جوش قرار داده شد و در آخر به مدت ۱۰ دقیقه و با دور ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. در این مرحله بقایای لاشه باکتری‌ها رسوب کرده و DNA آن‌ها در مایع رویی به حالت محلول در می‌آید.

تعیین ژن‌های پاتوژنیسیته سالمونلا: جهت شناسایی ژن‌های پاتوژنیسیته *sodC1* و *sopE1* سالمونلا انتریکا، از روش PCR استفاده گردید. در این مطالعه از دو جفت پرایمر اختصاصی برای شناسایی ژن‌های پاتوژنیسیته استفاده شد. خصوصیات این پرایمرها در جدول ۱ ذکر شده است. تکثیر ژن‌های مذکور مطابق شرایط معمولی و با مقادیر ذکر شده صورت پذیرفت (جدول ۲). جهت بررسی نتایج حاصل از PCR، از الکتروفورز با استفاده از ژل آگارز ۱/۵٪ و رنگ آمیزی توسط اتیدیوم برماید استفاده گردید. برنامه دمایی دستگاه ترموسیکلر برای تکثیر ژن‌های مورد نظر در جدول

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر ژن‌های sopE1 و sodC1

منبع	اندازه محصول (bp)	توالی پرایمرها ('5 to 3')	پرایمر
این مطالعه	۴۶۰	5'- ccagtggagcaggtttatcg - 3'	sodC1-F
		5'- ggtgcgctcatcagttgttc - 3'	sodC1-R
این مطالعه	۴۵۵	5'- cgggcagtgttgacaaataaag - 3'	sopE1-F
		5'- tgttggaattgctgtggagtc - 3'	sopE1-R

جدول ۲. مقادیر مورد نیاز جهت انجام واکنش PCR

مقادیر	ترکیبات (غلظت)
2.5 µl	Taq™ PCR buffer(10X)
2 µl	MgCl2(25mM)
1 µl	dNTPs(2mM)
1 µl	Taq polymerase(5U/µl)
1.5 µl	Primer F: (20 p.mol)
1.5 µl	Primer R: (20 p.mol)
2 µl	DNA
13.5 µl	Distilled water
25 µl	Total Volume

جدول ۳. برنامه‌ی دمایی دستگاه ترموسایکلر برای تکثیر ژن‌های ویرولانس در ایزوله‌های مورد بررسی

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

نتایج

نتایج مربوط به کشت، جداسازی و اطلاعات مربوط به بیماران: از مجموع ۹۵ نمونه سالمونلا جداسازی شده از بیماران، ۵۳ مورد مذکر (۵۵/۷٪) و ۴۲ مورد مؤنث (۴۴/۳٪) بودند. از نظر نوع نمونه، ۸۶٪ نمونه‌ها مدفوعی و بقیه مربوط به نمونه‌های خون و ادرار بودند.

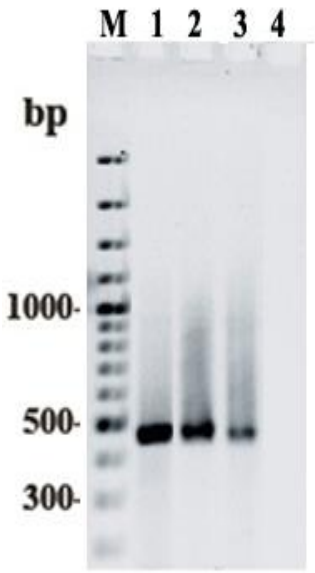
نتایج بررسی‌های سرولوژیکی با آنتی سرم‌های سالمونلا: نتایج سرولوژیکی با آنتی سرم‌های سالمونلا نشان داد که ۴۰ درصد ایزوله‌ها متعلق به سرو گروه C سالمونلا، ۱۶/۵ درصد ایزوله‌ها متعلق به سرو گروه B سالمونلا و ۴۷/۵ درصد متعلق به سرو گروه D سالمونلا بودند. نتایج سروتایپینگ ایزوله‌ها نشان داد که بیشترین فراوانی مربوط به سروتایپ‌های انتریتیدیس، اینفنتیس و تیفی‌موریوم به ترتیب با فراوانی ۴۲/۱٪، ۲۸/۸٪ و ۱۵٪ می‌باشد. همچنین ۱۴/۱٪ ایزوله‌ها مربوط به سایر سروتایپ‌ها بودند.

آنالیز و مقایسه نتایج PCR به دست آمده: ۹۵ ایزوله بالینی مورد مطالعه از نظر وجود ژن‌های پاتوژنیسیته، مورد ارزیابی و بررسی قرار گرفتند. نتایج PCR نمونه‌های بالینی از نظر وجود ژن‌های پاتوژنیسیته *sodC1* و *sopE1* در شکل‌های ۱ و ۲ نشان

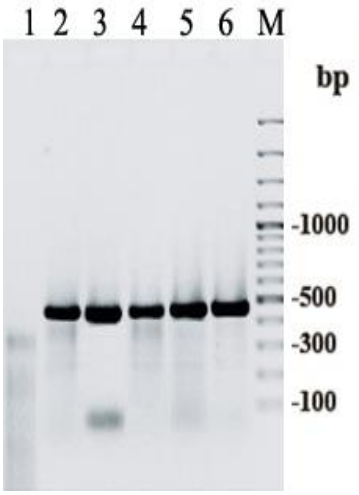
جدول ۴. فراوانی ژن‌های sodC1 و sopE1 در میان سروتایپ‌های مختلف سالمونلا انتریکا (بر اساس تعداد و درصد)

ژن بیماریزا	ژن sodC1			ژن sopE1		
سروتایپ	انتریتیدیس	اینفنتیس	تیفی‌موریوم	انتریتیدیس	اینفنتیس	تیفی‌موریوم
تعداد نمونه	۵۰	۲۸	۱۷	۵۰	۲۸	۱۷
موارد مثبت	۵۰	۲۸	۱۷	۴۷	۲۷	۱۷
درصد واجد ژن	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۹۴	۹۶/۴	۱۰۰

داده شده است. در بین ایزوله‌های موجود فراوانی ژن *sodC1* ٪۱۰۰ (۹۵ ایزوله از ۹۵ ایزوله) و ژن *sopE1* ٪۹۵/۷ (۹۱ ایزوله از ۹۵ ایزوله) مشاهده گردید. حضور این ژن‌ها در بین سروتایپ‌های مختلف سالمونلا انتریکا در جدول ۴ نشان داده شده است.



شکل ۱. نتایج حاصل از PCR مربوط به ژن sodC1 نمونه‌های بالینی ردیف‌های ۱ الی ۳ شامل تعدادی از نمونه‌های بالینی نماینده واجد ژن sodC1 می‌باشند. ردیف ۴ مربوط به کنترل منفی و ردیف M مربوط به مارکر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی می‌باشد.



شکل ۲. نتایج حاصل از PCR ژن sopE1 از نمونه‌های بالینی ردیف‌های ۲ الی ۶ تعدادی از نمونه‌های بالینی نماینده واجد ژن sopE1 می‌باشند. ردیف ۱ کنترل منفی و ردیف M مربوط به مارکر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی می‌باشد.

بحث

بیماری‌های عفونی گروه بسیار مهم و شایعی از بیماری‌ها می‌باشند که انسان از دیرباز با آن‌ها آشنا بوده و طی سالیان دراز، نسل‌های بشر به‌طور وسیعی تسلیم این بیماری‌های مرگبار شده، در حالی که حربه‌ای مؤثر نیز برای مقابله و مبارزه با این بلایا نداشته‌اند [۲۲–۲۵]. باکتری سالمونلا در سال‌های اخیر از مهم‌ترین پاتوژن‌های باکتریایی منتقله از طریق غذا با شیوع بالا و از مهم‌ترین عوامل گاستروانتریت در انسان می‌باشد [۲۶–۲۹].

طبقه بندی سالمونلاها در مقایسه با سایر اعضای انتروباکتریاسیه پیچیده‌تر می‌باشد و از موضوعات مورد بحث است. در حال حاضر در طبقه بندی کافمن وایت بیش از ۲۶۰۰ سروتایپ شرح داده شده است که بر اساس ساختمان آنتی ژنیکی دیواره سلولی (آنتی ژن O) و آنتی ژن فلاژلر (H) می‌باشد. در جدیدترین طبقه بندی که بر اساس ویژگی‌های بیوشیمیایی و هیبریدیزاسیون DNA-DNA صورت گرفته، اعضای جنس سالمونلا به دو گونه اصلی سالمونلا انتریکا و سالمونلا بونگوری تقسیم بندی می‌شوند. سالمونلا انتریکا، خود شامل شش زیر گونه است که هریک شامل سروتایپ‌های مختلفی می‌باشند. زیر گروه I آن شامل گروه عمده‌ای از سالمونلاهای جدا شده از انسان می‌باشد که با نام سالمونلا انتریکا زیر گونه انتریکا مشخص می‌شوند و در ٪۹۹ موارد در انسان بیماریزا هستند [۱، ۲، ۴، ۵]. محصولات غذایی حاصل از حیوانات از جمله گوشت مرغ، خوک و گاو از منابع اولیه آلودگی و سالمونلوز در انسان می‌باشد. این باکتری از مهم‌ترین پاتوژن‌های مشترک بین انسان و دام در اروپا می‌باشد که در سال ۲۰۰۷ حدود ۱۵۲۰۰۰ مورد بیماری از آن گزارش گردیده است [۷]. توسعه روش‌های پیشرفته مولکولی و امکان تعین توالی کامل ژنوم سالمونلا و همچنین در دسترس بودن این توالی، موجب دانش بیشتر تغییرات ژنومی و ارتباط ژنتیکی در میان سویه‌های سالمونلا انتریکا گردیده است. استفاده از روش‌های مولکولی سریع، دقیق و در عین حال کم هزینه، کمک بسیاری به مطالعات گسترده در ارتباط با روابط ژنتیکی سالمونلا می‌کند [۷، ۳۰–۳۳]. شدت بیماریزایی سویه‌های مختلف سالمونلا در انسان و حیوانات متفاوت بوده و این مسئله نشان دهنده فاکتورهای میزبانی و باکتریایی ویژه‌ای می‌باشد. ویرولوتایپینگ سویه‌های سالمونلا با هدف بررسی گوناگونی ژن‌های ویرولانس سروارهای سالمونلا منعکس کننده ویژگی‌های این باکتری، از جمله بررسی ژن‌های دخیل در بیماریزایی آن می‌باشد [۷، ۳۰، ۳۲].

آماویزیت و همکاران در سال ۲۰۰۳ به بررسی تنوع بیماری‌های ایجاد شده توسط سروتایپ‌های پاتوژن سالمونلا و ارتباط بیماریزایی با ژن‌های مستقر در جزایر پاتوژنیسیته سالمونلا پرداختند. در آن مطالعه مشخص گردید که چندین ژن بیماریزا در کروموزوم سالمونلا انتریکا به‌صورت ثابت وجود دارند که در بیماری زایی این باکتری نقش مهمی را ایفا می‌کنند [۳۴].

Huehn و همکاران نیز در سال ۲۰۱۰ ژن‌های پاتوژنیسیته سالمونلا انتریکا را در یک مطالعه گسترده از کشورهایی چون آلمان، لهستان، فرانسه، مجارستان، اسپانیا، سوئد، دانمارک و انگلستان مورد بررسی قرار داده‌اند. مطالعات این گروه نیز نشان داد که ده ژن اصلی در بیماری زایی سویه‌های مختلف سالمونلا انتریکا، وجود دارند که برخی از این ژن‌ها به‌صورت ثابت جزئی از کروموزوم باکتری بوده و در جزایر پاتوژنیسیته باکتری مستقر می‌باشند، برخی پروفاژی و تعدادی نیز پلاسمیدی هستند [۷].

در مطالعه حاضر فراوانی ژن *sopE1* در ٪۹۵/۷ از ایزوله‌های سالمونلا انتریکا مشاهده گردید که با نتایج بررسی Graziani و همکاران در سال ۲۰۱۱ در ایتالیا مشابهت دارد [۳۰]. این گروه نیز به ویرولوتایپینگ برخی ژن‌های بیماریزای سالمونلا انتریکا سروتایپ ناپولی پرداختند و نتایج بررسی آن‌ها نشان داد ژن *sopE1* در ۹۳٪ از سویه‌ها وجود دارد و ارتباط مهمی با بیماریزایی سالمونلا دارد. با این حال تنها در ۴ ایزوله ژن *sodC1* مشاهده گردید، در حالی که در مطالعه حاضر تمامی سروتایپ‌های سالمونلا اینتریکای مورد مطالعه حامل ژن *sodC1* بودند.

Malorny و همکاران در سال ۲۰۰۷ در آلمان با استفاده از روش ریزآرایه‌های الیگونوکلئوتیدی و طراحی ۱۰۹ پروب مختلف به بررسی مارکرهای اختصاصی سروتایپ‌های سالمونلا، ژن‌های مقاومت و همچنین ژن‌های دخیل در بیماریزایی سالمونلا پرداختند. از این میان چهل پروب اختصاصی جهت شناسایی چهار جزیره پاتوژنیسیته در میان ایزوله‌های بالینی سالمونلا طراحی و مورد آنالیز قرار گرفت. نتایج این گروه نشان داد که ژن‌های بیماریزای hydH، *sfbA*، *slyA* و *phoQ* در تمامی ایزوله‌های سالمونلا حضور دارند و از ژن‌های بیماریزای اختصاصی در سروتایپ‌های مختلف سالمونلا می‌باشند [۳۱].

Beutlich و همکاران در یک پروژه جهانی در سال ۲۰۱۱ به مطالعه ویرلوتایپینگ ده ژن بیماریزا در میان ۳۸ سویه مختلف سالمونلا انتریکا جمع آوری شده از نمونه‌های انسانی، حیوانی و مواد غذایی در هشت کشور اروپایی مختلف پرداختند. بررسی‌های مولکولی این گروه بر روی ژن‌های بیماریزای سالمونلا نشان داد که برخی از ژن‌های بیماریزای مستقر در جزایر پاتوژنیسیته سالمونلا همانند ژن‌های *ssaQ*، *mgtC*، *spi4-D*، *sopB* و ژن *bcfC* در تمامی ایزوله‌های سالمونلا وجود دارند. از طرفی مطالعه این گروه نشان داد که برخی از ژن‌های بیماریزا اختصاصی جنس می‌باشد. برای مثال ژن *spvC* که از ژن‌های پلاسمیدی بیماریزا می‌باشد تنها در ایزوله‌های سالمونلا تیفی‌موریوم تشخیص داده شد. ژن *sodC1* نیز که از ژن‌های باکتریوفاژی بیماریزا در سالمونلا می‌باشد تنها در ایزوله‌های سالمونلا تیفی‌موریوم، نیوپورت و پاراتیفی B مشاهده گردید. بررسی همزمان وجود چندین ژن بیماریزا در ایزوله‌های سالمونلا با استفاده از آنالیز میکرو آری نیز نشان داد که ایزوله‌هایی نیز وجود دارند که همزمان حامل چندین ژن بیماریزا می‌باشند و ایزوله‌های دارای الگوی ویرولوتایپی مشابه، از نظر ژنوتایپی و مولوکولار تایپینگ نیز به یکدیگر نزدیک می‌باشند [۳۳].

Osman و همکاران اخیراً در سال ۲۰۱۳ به بررسی یازده ژن بیماریزای سالمونلا و ارتباط هریک از این ژن‌ها در برابر برخی آنتی‌بیوتیک‌های رایج در سروتایپ‌های سالمونلا جدا شده از موارد بالینی پرداختند. نتایج این گروه نشان داد سروتایپ‌های حامل ژن‌های *sopE1* و *sodC1* مقاومت بسیار بالایی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین، لینکومایسن وکلرامفنیکل دارند [۳۵].

در مطالعه حاضر، بیشترین سروتایپ‌های جدا شده از بیماران متعلق به سالمونلا سروتایپ انتریتیدیس بود که این نتیجه با تحقیقاتی که طی سال‌های ۲۰۱۰ الی ۲۰۱۲ در آسیا و اروپا انجام گرفته، هم‌خوانی دارد [۷–۹، ۲۷، ۳۶، ۳۷]. یافته‌های ما نشان داد که وجود ژن‌های پاتوژنیسیته در ایزوله‌های سالمونلا مورد بررسی بالا بوده، به‌طوری که شیوع ژن sodC1 و *sopE1* در بین گونه‌های سالمونلا، به ترتیب ۱۰۰ و ۹۵/۷ درصد مشاهده شد.

نتیجه‌گیری

این مطالعه برای اولین بار در کشور وجود و شیوع ژن‌های مهم بیماری زایی *sodC1* و *sopE1* در بین سویه‌های سالمونلا انتریکا را گزارش می‌دهد. با مقایسه با نتایج سایر مطالعات دیگر کشورها، یافته‌های ما نشان داد که این ژن‌های پاتوژنیسیته با فرکانس وقوع بالا و به‌طور گسترده‌ای در بین سالمونلا انتریکاهای جدا شده از نمونه‌های بالینی در تهران یافت می‌شوند و حضور این ژن‌ها در سویه‌های سالمونلا به احتمال فراوان با قدرت بیماری زایی در آن سویه‌ها ارتباط دارد که نیازمند انجام مطالعات بیشتری در این زمینه می‌باشد.

تشکر و قدردانی: این مقاله برگرفته از یکی از طرح‌های تحقیقاتی انجام شده در مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) می‌باشد.

منابع

1. Lopez FE, Mercedes Pescaretti ML, Morero R, Delgado MA. Salmonella Typhimurium general virulence factors: A battle of David against Goliath? Food Res Int. 2011;45(2):842-51.
2. Hendriksen SW, Orsel K, Wagenaar JA, Miko A, Van Duijkeren E. Animal-to-human transmission of Salmonella Typhimurium DT104A variant. Emerg Infect Dis. 2004;10(12):2225-7.
3. 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.
4. Ranieri ML, Shi C, Moreno Switt AI, Den Bakker HC, Wiedmann M. Comparison of typing methods with a new procedure based on sequence characterization for Salmonella serovar prediction. J Clin Microbiol. 2013;51(6):1786-97.
5. Coburn B, Grassl GA, Finlay BB. Salmonella, the host and disease: a brief review. Immunol Cell Biol. 2007;85(2):112-8.
6. Grimont PA, Weill F-X. Antigenic formulae of the Salmonella serovars [Internet]. 9th ed. Paris: WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella, Institut Pasteur; 2007 [cited 2014 Nov 24]. Available from: http://www.pasteur.fr/ip/portal/action/WebdriveActionEvent/oid/01s-000036-089.
7. Huehn S, La Ragione RM, Anjum M, Saunders M, Woodward MJ, Bunge C, et al. Virulotyping and antimicrobial resistance typing of Salmonella enterica serovars relevant to human health in Europe. Foodborne Pathog Dis. 2010;7(5):523-35.
8. Amini K, Salehi T, Nikbakht GH, Ranjbar R, Amini J, Ashrafganjooei Sh B. 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.
9. 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.
10. Fluit AC. Towards more virulent and antibiotic-resistant Salmonella? FEMS Immunol Med Microbiol. 2005;43(1):1-11.
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, Aminharati F, Abdosamadi Z, et al. Salmonella pathogenicity islands: big virulence in small packages. Microb Infect. 2000;2(2):145-56.
13. Alvarez J, Sota M, Vivanco AB, Perales I, Cisterna R, Rementeria A, et al. Development of a multiplex PCR technique for detection and epidemiological typing of salmonella in human clinical samples. J Clin Microbiol. 2004;42(4):1734-8.
14. Cesare A, Manfreda G. Use of the automated ribotyping for epidemiological investigations. Ann Microbiol. 2002;52(2):181-90.
15. Sarshar M, Ranjbar R, Shahrokhi N, Sadeghifard N, Hassani A, Nasrabadi Z, et al. detection of Escherichia coli, Salmonella enterica and Shigella dysenteriae by analysis of 23S ribosomal DNA gene. J Isfahan Med Sch. 2013;30(219):2333-43. Persian.
16. Figueroa-Bossi N, Bossi L. Inducible prophages contribute to Salmonella virulence in mice. Mol Microbiol. 1999;33(1):167-76.
17. Doublet B, Lailler R, Meunier D, Brisabois A, Boyd D, Mulvey MR, et al. Variant Salmonella genomic island 1 antibiotic resistance gene cluster in Salmonella enterica serovar Albany. Emerg Infect Dis. 2003;9(5):585-91.
18. 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.
19. 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.
20. Ranjbar R, Sarshar M. Genetic diversity of clinical strains of Salmonella enterica serovar Typhimurium. J Mil Med. 2012;14(2):143-7.
21. 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. Persian.
22. 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.
23. Mead PS, Slutsker L, Dietz V, Mccaig LF, Bresee JS, Shapiro C, et al. Food-related illness and death in the United States. Emerg Infect Dis. 1999;5(5):607-25.
24. Smidt G P, Whichard MJ, Scallan E. Foodborne disease trends and reports. Foodborne Pathog Dis. 2007;4(2):130-5.
25. Kaferstein F, Abdussalam M. Food safety in the 21st century. Bull World Health Organ. 1999;77(4): 347-51.
26. Karami A, Ranjbar R, Ahmadi Z, Safiri Z. Rapid detection of different serovares of Salmonella entrica by multiplex PCR. Iranian J Publ Health. 2007;36(2): 38-42.
27. Eshraghi S, Soltan Dalall MM, Fardsanei F, Zahraii Salehi T, 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):876-82.
28. Ranjbar R, Giammanco GM, Aleo A, Plano MR, Naghoni A, Owlia P, et al. Characterization of the first extended-spectrum beta-lactamase-producing nontyphoidal Salmonella strains isolated in Tehran, Iran. Foodborne Pathog Dis. 2010;7(1):91-5.
29. 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.
30. Graziani C, Busani L, Dionisi AM, Caprioli A, Ivarsson S, Hedenstrom I, et al. Virulotyping of Salmonella enterica serovar Napoli strains isolated in Italy from human and nonhuman sources. Foodborne Pathog Dis. 2011;8(9):997-1003.
31. Malorny B, Bunge C, Guerra B, Prietz S, Helmuth R. Molecular characterisation of Salmonella strains by an oligonucleotide multiprobe microarray. Mol Cell Probes. 2007;21(1):56-65.
32. Baumler AJ, Tsolis RM, Ficht TA, Adams LG. Evolution of host adaptation in Salmonella enterica. Infect Immun. 1998;66(10):4579-87.
33. Beutlich J, Jahn S, Malorny B, Hauser E, Huhn S, Schroeter A, et al. Antimicrobial resistance and virulence determinants in European Salmonella genomic island 1-positive Salmonella enterica isolates from different origins. Appl Environ Microbiol. 2011;77(16):5655-64.
34. Amavisit P, Lightfoot D, Browning GF, Markham PF. Variation between pathogenic serovars within Salmonella pathogenicity islands. J Bacteriol. 2003;185(12):3624-35.
35. Osman KM, Marouf SH, Alatfeehy N. Antimicrobial resistance and virulence-associated genes of Salmonella enterica subsp. enterica serotypes Muenster, Florian, Omuna, and Noya strains isolated from clinically diarrheic humans in Egypt. Microb Drug Resist. 2013;19(5):370-7.
36. Ranjbar, Sarshar M, Morovvati S. A study of ribotype patterns of Salmonella enterica serovar Enteritidis starains isolated in Tehran. J Isfahan Med Sch. 2012;30(180):1-10. Persian.
37. Ranjbar R, Torabi R, Mirzaee A. Molecular typing of Salmonella enteritidis strains isolated from several laboratory centers in Tehran by ERIC-PCR. Scientific J Kurdistan Univ Med Sci. 2013;18(68):77-85. Persian.