مجله طب دامپزشکی جایگزین | تابستان ۱۴۰۱ | دوره ۵ | شماره ۱۳

مقاله پژوهشی

JOAVM
Journal of
Alternative Veterinary Medicine
joavm.kazerun.iau.ir

Islamic Azad University
Kazerun Branch
Fars, Iran

بررسی ژنهای حدت *سالمونلا انتریکا* جدا شده از گربه های خانگی مبتلا به عفونت گوارشی (آنتریت) به کمک تکنیک مولکولی Multiplex PCR

آرمان الحانی[۱]، حسین فتاحی[۲*]، امیر وفافر[۳]

[۱]فارغ التحصیل دکترای حرفه ای دامپزشکی، گروه درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران

[۲]استادیار گروه میکروبیولوژی،گروه دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران

[۳]استادیار گروه جراحی، دانشکده دامپزشکی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۴/۰۸ اصلاح نهایی: ۱۴۰۱/۰۵/۰۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۵/۱۱

چکیده

زمینه و هدف: سالمونلا از باکتریهای گرم منفی میله ای شکل (باسیل) از خانواده انتروباکتریاسه است و سروتیپ بسیار زیادی دارد. سالمونلا از راه غذای آلوده و یا خام، مدفوع و بزاق حیوان بیمار منتقل می‌شود. هدف از پژوهش حاضر بررسی ژنهای حدت *سالمونلا انتریکا* جدا شده از گربه های خانگی مبتلا به عفونت گوارشی (آنتریت) با تکنیک Multiplex PCR (M-PCR) بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه ۵۰ نمونه مدفوع گربه های مبتلا به اسهال از سطح کلینیک های دامپزشکی شهر شیراز جمع‌آوری گردید و با رعایت کامل نکات استاندارد به آزمایشگاه بیطاران شهر شیراز منتقل شدند. برای جداسازی اولیه از محیط کشت‌های بافرپپتون واتر، سلنیت F براث، XLD و SS آگاراستفاده گردید. جهت تایید تشخیص، از تست‌های بیوشیمیایی نظیر TSI، اوره آز، VP، اندول، سیمون سیترات و حرکت استفاده شد. کلنی های تائید شده با تست های بیوشیمیایی از روش M-PCR جهت ردیابی ژن های حدت *invA - spvC -spvR - ompC - rfs* استفاده شد.

یافته‌ها: در مطالعه حاضر ۶ جدایه باکتری سالمونلا با استفاده از روش کشت میکروبی بدست آمد اما در مقابل، با استفاده از روش M-PCR ، ۹ مورد قطعی از باکتری سالمونلا برای ژنهای حدت *invA - spvC -spvR - ompC - rfs* ردیابی شد.

نتیجه‌گیری: M-PCR نسبت به کشت میکروبی ازدقت بالاتری برخوردار بوده و همچنین روش‌های سنتی کشت میکروبی اغلب زمان‌بر، خسته‌کننده و پرهزینه است. بنابراین پیشنهاد می گردد آزمایشگاه هایی که به طور اختصاصی بر روی سالمونلاها کار می کنند به تدریج روش M-PCR را جایگزینی روشهای سنتی نمایند.

واژه‌های کلیدی: *سالمونلا، Multiplex PCR، مدفوع اسهالی، گربه، شیراز*

آرمان الحانی، حسین فتاحی، امیر وفافر. بررسی ژنهای حدت *سالمونلا انتریکا* جدا شده از گربه های خانگی مبتلا به عفونت گوارشی(آنتریت) به کمک تکنیک مولکولی Multiplex PCR . مجله طب دامپزشکی جایگزین. ۱۴۰۱؛ ۵(۱۳): ۷۸۰-۷۹۶.

* نویسنده مسئول: استادیار گروه میکروبیولوژی،گروه دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران.

Orcid: https://orcid.org/ 0000-0001-7581-5835 ، Email: Iranian_vet@yahoo.com

[Downloaded from joavm.kazerun.iau.ir on 2025-07-12]

[DOR: 20.1001.1.2717378.2022.5.13.4.6]

مقدمه

سالمونلا باسیل گرم منفی، واجد تاژک پری تریش (Peritrichous) وجزء خانواده ی انتروباکتریاسه می باشدکه گروه سالمونلاها شامل یک جنس منفرد به نام *سالمونلا انتریکا* (*Salmonella enterica*) است. این جنس شامل ارگانیسم هایی است که قبلا تحت عنوان سالمونلا و آریزونا شناخته می شدند. این باکتری از طریق حیوان و فروارده های حیوانی به انسان سرایت می کنند و موجب تب روده ای، مسمومیت های غذایی و گاستروانتریت در انسان می شوند (Riedel *et al.,* 2019).

بیش از ۵۳ سروتیپ سالمونلا از گربه و سگ جداشده که بیشترین آنها مربوط به *سالمونلا تیفی‌موریوم، سالمونلا آناتوم، سالمونلا پاناما* و *سالمونلا کرفلد* بوده است (Taşkale *et al.,* 2018). خانواده انتروباکتریاسه از تعداد زیادی باکتری باسیلی شکل گرم منفی و بدون اسپور تشکیل شده که در حالت طبیعی در روده انسان و حیوانات زندگی می کنند، فلور طبیعی روده به حساب می آیند و در برخی موارد عامل بیماریزای مهمی محسوب می شوند. اعضای این خانواده توزیع جغرافیایی وسیعی داشته و به وفور در محیط، خاک، آب و گیاهان در حال فساد یافت می شوند (Afzal *et al.,* 2021). آلودگی آب به مدفوع از طریق اثبات حضور اشرشیاکلای که زیستگاه طبیعی آن روده است مشخص می گردد.گونه های کلبسیلا شامل *کلبسیلا پنومونیه، انتروباکتر و سیتروباکتر* از سبزیجات، خاک اره و بستر اسب ها جدا شده اند. سالمون و اسمیت در سال ۱۸۸۵ موفق به جداسازی سویه *ای باسیلوس کلرا* شدند که امروزه به نام *سالمونلا انتریکا* سروار کلراسوئیس است. اولین بار توسط Wieght در سال ۱۹۲۹ و بعدا توسط Kauffman در سال ۱۹۹۱ طرح پادگنی برای رده بندی سالمونلا ارائه شد که امروزه تحت عنوان طرح کافمن- وایت شناخته می شود (Sánchez-López *et al.,* 2020; Usha Rani & Vijayalakshmi, 2016).

برخی از باکتریهای انتروباکتریاسه بیماریزا مانند سالمونلا، شگیلا و اشرشیاکلای در محیط روده سمومی ترشح می کنند که می توانند در سطح سلولهای مخاط روده کوچک تاثیر نموده و باعث جریان مایعات به سمت داخل روده و در نتیجه اسهال شوند. جنس آنتروتوکسین های مترشحه از انواع آنتروباکتریاسه ها یکسان نمی باشد و با هم تفاوت دارد. بعضی از اجزای خانواده انتروباکتریاسه جزء فلور معمولی روده نمی باشند مثل سالمونلا و شیگلا، یعنی چنان چه از کشت مدفوع به دست آیند دلیل بر بیماری و یا ناقل بودن شخص یا حیوان است (Besharati *et al.,* 2017). سویه های سالمونلا سه نوع بیماری اصلی را در جانداران ایجاد می کنند شامل گاستروانتریت، تب روده (تیفوئید) و بیماری خارج روده ای غیر حصبه همراه با باکتریمی می باشد. تجزیه و تحلیل ژنتیکی نشان می‌دهد که هر سندرم بالینی به مجموعه‌های مشخصی از ژن‌های حدت نیاز دارد و در مجموع جدایه های سالمونلا دارای تنوعی از صفات و حدت متفاوت هستند. جایگاه spv به شدت با سویه هایی مرتبط است که باعث باکتریمی غیر تیفوئیدی می شوند، اما در سویه های سالمونلای تیفوئیدی وجود ندارد. ناحیه spv شامل سه ژن مورد نیاز برای فنوتیپ حدت است که شامل ژن تنظیم کننده رونویسی مثبت *spvR* و دو ژن ساختاری *spvB - spvC* است (Priya *et al.,* 2020).

باکتریهای روده ای مسئول اغلب عفونت های بیمارستانی بوده که دراین خانواده مهمترین عوامل بیماری های گوارشی از قبیل عامل تب تیفوئید و دیسانتری باسیلی وجود دارد

[Downloaded from joavm.kazerun.iau.ir on 2025-07-12]

[DOR: 20.1001.1.2717378.2022.5.13.4.6]

(Moghadam & Nazarian, 2017). تفریق و تمایز باکتریها در خانواده انتروباکتریاسه در درجه اول بستگی به حضور یا عدم حضور ژنوم آنزیمهای متفاوت در کروموزوم باکتری مربوطه دارد، الگوی بیوشیمیایی باکتری مورد نظر به همراه تعیین هویت گونه آن حاصل خواهد شد (Hamad & Saleh, 2019). امروزه در آزمایشگاه‌های میکروب‌شناسی از سه روش رایج جهت شناسایی و تشخیص باکتری استفاده می‌شود. در روش‌های مولکولی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) یکی از رایج‌ترین روش‌های مولکولی است که بر اساس حضور ژن خاص و یا به عبارت دیگر قطعه‌ای از DNAاست در این روش قطعه‌ای از ژن هدف تشکیل شده و وجود عامل پاتوژن اثبات می‌گردد. چندین ژن هدف (*InvA, spvC, InvB, OmpC*) در سویه‌های سالمونلا وجود دارد. وجود ژنهای *OmpC* و*OmpF* در ایجاد سوراخهای کوچک و بزرگ جهت ایجاد تعدیل فشار اسمزی در سطح غشای سلولی موثر هستند (Callegari *et al.*, 2014). بررسی های پژوهشی برسون نشان دادکه ژنهای *spvR* و *spvC*مسئول حدت باکتری، *OmpC* و *rfs* مسئول افزایش تحمل به اسید و تغییرات اسمزی در سالمونلا هستند. حداقل aw جهت رشد سالمونلا ٪۹۳ می باشد. بنابراین باکتری به خوبی در مواد غذایی خشک زنده می ماند و با کاهش aw بقای باکتری افزایش می یابد. غلظت بیش از ٪۹ آب نمک اثر کشندگی بر روی سالمونلا دارد و غلظت ۳٪ تا ۴٪ نمک طعام باعث ممانعت رشد سالمونلا می شود، اگر چه افزایش درجه حرارت از ۱۰تا ۳۰ درجه مقاومت باکتری نسبت به نمک را افزایش می دهد. مقاومت به نمک سالمونلا در غذاهایی که با تغییر شرایط اتمسفریک و یا وکیوم شده نگه داری می شوند افزایش می یابد. ژن *InvA* که برای تهاجم باکتری سالمونلا و نحوه تیپ ترشحی توکسین که نوع III بوده، لازم است و بوسیله آن باکتری به قسمت‌های عمقی‌تر روده نفوذ می‌کند برای جنس سالمونلا اختصاصی است (Murray *et al.*, 2021). این مطالعه در شهر شیراز انجام شد و بررسی نمونه‌های کلینیکی (مدفوع) گربه های مبتلا به اسهال سالمونلایی با استفاده از محیط‌های اختصاصی سالمونلا انجام شد و سپس از روش مولکولی Multiplex PCR (M-PCR) برای شناسایی ژنهای پاتوژنی سالمونلا استفاده شد. هدف از این مطالعه شناسایی دقیق تر ژنهای حدت *سالمونلا انتریکا* در نمونه های کلینیکی (مدفوع) با استفاده از یافتن ژنهای *rfs - ompC - spvR -spvC - invA* به وسیله M-PCR که مقایسه روش PCR با روش های کشت سنتی برای تشخیص سالمونلا است.

مواد و روش‌ها

گردآوری نمونه های پژوهش

در این تحقیق ۵۰ نمونه اسهالی از گربه های خانگی دارای آنتریت مراجعه کننده به کلینیک های دامپزشکی شهر شیراز جمع‌آوری گردید. نمونه های مدفوع در ظرف پلاستیکی تمیز استریل، دهان‌گشاد و با درپوش محکم و فاقد نشتی جمع‌آوری شدند. نمونه‌ها در کنار یخ به آزمایشگاه بیطاران شهر شیراز منتقل گردیدند و حداکثر ظرف مدت ۲ ساعت بعد از نمونه‌گیری کشت شدند. پس از مراحل پیش غنی‌سازی در محیط بافر پپتون واتر (BPW) (مرک، آلمان) و سپس غنی‌سازی در محیط سلنیت F براث نمونه‌ها بر روی محیط‌های دزوکسی کولات آگار (XLD) و SS آگار (سالمونلا– شیگلا آگار) کشت داده شدند. در این پژوهش از محیط‌های کشت اختصاصی مانند: اوره آز،گزیلوز لیزین دزوکسی کولات آگار (XLD)- سلنیت F براث- بافر پپتون

[Downloaded from joavm.kazerun.iau.ir on 2025-07-12]
[DOR: 20.1001.1.2717378.2022.5.13.4.6]

واتر (BPW)- محیط کشت سالمونلا شیگلا آگار- محیط کشت اوره آگار- محیط کشت TSI- محیط کشت SIM (جهت بررسی حرکت باکتری)- محیط کشت اندول- محیط کشت سیمون سیترات- VP (مرک، آلمان) جهت یافتن و تایید باکتری مورد نظر استفاده شد(Andrews & Ryan, 2015).

آزمون‌های بیوشیمیایی جهت تشخیص گونه باکتری

برای شناسایی باکتری از ویژگی های بیوشیمیایی آن استفاده شد. واکنش های بیوشیمیایی میکروارگانیسم ها تحت کنترل فعالیت های آنزیمی آنها است. برای این منظور ۵ گرم نمونه مدفوع را با یک سوآب در۱۰ سی سی از محیط مایع سلنیت F قرار داده شد و سپس در دمای ۳۵ تا ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۱۸ ساعت نگهداری شد. سپس یک لوپ از محیط فوق را داخل ۲ نوع از محیط های XLD و سالمونلا شیگلا آگار تلقیح نموده و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت۲۴ساعت نگهداری شد. حداقل ۳ کلنی مشکوک به سالمونلا از هر کدام از محیطهای فوق را برداشت نموده و با استفاده از تستهای بیوشیمیایی TSI، اوره آز، VP، MR، اندول، سیمون سیترات و حرکت شناسایی آن انجام شد. تمامی محیط ها از شرکت مرک آلمان تهیه گردید. بررسی و ارزیابی محصولات نهایی واکنش های بیوشیمیایی به شناسایی سیستم های آنزیمی خاص باکتری ها، شناسایی، جداسازی و طبقه بندی میکروارگانیسم ها کمک می کند. آنزیم ها و مواد حاصل از فعالیت های آنزیمی باکتری ها به عنوان آزمون های بیوشیمیایی مورد استفاده قرار می گیرند (Tang & Stratton, 2013; Mahon *et al.,* 2023).

استخراج DNA از نمونه های تایید شده

کلنی های تائید شده از بین موارد کشت داده شده به کمک تستهای بیوشیمیایی ذکر شده، به صورت جداگانه در محیط کشت نوترینت براث تلقیح کرده، و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شد و طبق روش کیت استخراج DNA از شرکت سیناژن که شامل مراحل مختلف هست استخراج شدند. در این مطالعه برای استخراج DNA باکتری از کیت Cinna Pure DNA (سیناژن، ایران) با شماره PR881613 استفاده شد. استخراج DNA بر روی ویال های حاوی باکتری، پس از خروج از فریزر ۷۰- درجه سانتیگراد، در محیط بیرون قرار داده شد تاکاملا ذوب شود صورت گرفت. از روش تست M-PCR جهت شناسایی ژنهای *invA - spvC -spvR - ompC - rfs* انتخاب شد. مقادیر مصرفی مواد در آزمایش به حجم ۲۵ میکرولیتر که شامل ۱/۵ mMکلرید منیزیم، ۲۵۰ µmol از dNTP، ۰/۴ µmol از هر یک از پرایمرهای اختصاصی و ۱ واحد از Taq پلی مراز و ۵ میکرولیتر DNA با غلظت (۱۰ نانوگرم) الگو انجام شد. برای تهیه مخلوط اصلی (Master Mix) واکنش بر اساس حجم مورد نیاز برای ۵۰ نمونه (۵ نمونه مورد آزمایش DNA تخلیص شده – بهمراه ۱ نمونه کنترل منفی) انجام شد. ترکیب DNA تخلیص شده با حجم مورد نیاز واکنش در یک میکروتیوپ و انتقال میکروتیوپ‌ها به دستگاه ترموسایکر براساس برنامه زیر انجام شد: شرایط سیکل حرارتی برای PCR اینگونه بود که واسرشت اولیه در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، ۳۵ سیکل هرکدام شامل: واسرشت در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در ۶۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، مرحله بسط در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و نیز بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد (جدول ۱). محصولات

[Downloaded from joavm.kazerun.iau.ir on 2025-07-12]
[DOR: 20.1001.1.2717378.2022.5.13.4.6]

PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شدند و با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و تحت نور UV مشاهده و مستند سازی شدند.

عملکرد	زمان(ثانیه)	درجه حرارت (°C)	نام مرحله	
تک رشته ای شدن اولیه	۶۰	۹۵	واسرشت اولیه	
تک رشته ای شدن کل	۳۰	۹۵	واسرشت	۳۵ چرخه
اتصال آغازگر	۴۵	۶۵	اتصال	
سنتز DNA	۶۰	۷۲	بازآرایی (گسترش)	
تکمیل سنتز DNA	۶۰۰	۷۲	بازآرایی نهایی	

جدول ۱. برنامه دمایی PCR در جهت شناسایی باکتری سالمونلا (*Salmonella enterica*)

آماده سازی پرایمرها

پس از مطالعه و جستجو در مقالات مختلف پرایمرهای مناسب باکتری سالمونلا برای ژن های - *rfs - ompC - spvR* *invA - spvC* انتخاب شدند. پرایمرها در سایت (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) مقایسه و بلاست شدند و به شرکت ماکروژن، کره جنوبی سفارش داده شد. جدول ۲ توالی پرایمری و مشخصات طول قطعه تکثیری را نشان می دهد. در حال حاضر روش Multiplex PCR وجود دارد که در آن چندین ژن به عنوان هدف در نظر گرفته می‌شوند و روشی بسیار مناسب برای شناسایی سریع باکتری‌هاست (Panicker *et al.*, 2004).

پرایمر	توالی نوکلئوتیدی	ژن هدف	اندازه محصول
ST11	AGCCAACCATTGCTAAATTGGCGCA	*rfs*	۴۲۹
ST15	GGTAGAAATCCCAGCGGGTACTG	*rfs*	
S18	ACCGCTAACGCTCGCCTGTAT	*ompC*	۱۵۹
S19	AGAGGTGGACGGGTTGCTGCCGTT	*ompC*	
Sal3	TATCGCCACGTTCGGGCAA	*invA*	۲۷۵
Sal4	TCGCACCGTCAAAGG	*invA*	
Sal5	ACAGTGCTCGTTTACGACCTGAAT	*spvR*	۲۵۴
Sal5	AGACGACTGGTACTGATCGATAAT	*spvR*	
Sal6	ACTCCTTGCACAACCAAATGCGGA	*spvC*	۵۷۱
Sal6	TGTCTTCTGCATTTCGCCACCATCA	*spvC*	

جدول ۲. مشخصات پرایمر های مورد استفاده جهت یافتن ژنهای *سالمونلا انتریکا* (*Salmonella enterica*) (Lotfy et al., 2011).

[Downloaded from joavm.kazerun.iau.ir on 2025-07-12]
[DOR: 20.1001.1.2717378.2022.5.13.4.6]

آنالیز آماری

آنالیز داده ها با استفاده از نرم افزارSPSS نسخه ۱۶ انجام شد. شاخص هایی نظیر میانگین و انحراف معیار به عنوان نتایج توصیفی محاسبه شدند. برای بررسی فرضیه‌های تحقیق از آزمون کروسکال والیس که معادل ناپارامتری آنالیز واریانس یک طرفه است، استفاده شد. سطح معنی داری کمتر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد. نتایج بصورت نمودار با استفاده از نرم افزار Excel بررسی شد.

نتایج

در این پژوهش که از ۵۰ نمونه مدفوع گربه‌های مبتلا به اسهال مرجوعی به کلینیک‌های دامپزشکی شهر شیراز تهیه گردید. مرحله غنی سازی موجب افزایش نسبی تعداد سالمونلا در کل فلور میکروبی شده و این عمل با فراهم نمودن امکان تغذیه سالمونلا و محدود کردن رشد سایر میکروارگانیسم های موجود صورت می گیرد.

نتایج آزمایشات بیوشیمیایی جهت جداسازی و تشخیص *سالمونلا انتریکا*

در این مطالعه از ۵۰ نمونه مدفوع گربه‌های مبتلا به اسهال مورد بررسی ۶ جدایه *سالمونلا انتریکا* به دست آمد. پیش غنی سازی و غنی‌سازی نمونه‌ها برای استخراج مستقیم DNA در روش PCR امری ضروری است و محیط‌های غنی کننده تعداد باکتری را افزایش داده و از رشد فلور غیراختصاصی جلوگیری می‌کند. یکی از مشکلات PCR تولید باندهای غیر اختصاصی و اضافی است که استفاده از محیط های غنی کننده و انتخابی این باندها را کاهش می دهند. به همین منظور از محیط انتخابی SS Agar استفاده شد و کلنی های بی رنگ با مرکز سیاه (کلنی چشم ماهی شکل) بعنوان سالمونلا شناسایی (شکل ۱) و بعد از انجام تست های بیوشیمیایی که نتایج آن در جدول ۳ ذکر شده است *سالمونلا انتریکا* تایید هویت شد. (جدول ۳).

نتایج آزمایشات میکروبیولوژیکی M-PCR جهت تشخیص *سالمونلا انتریکا*

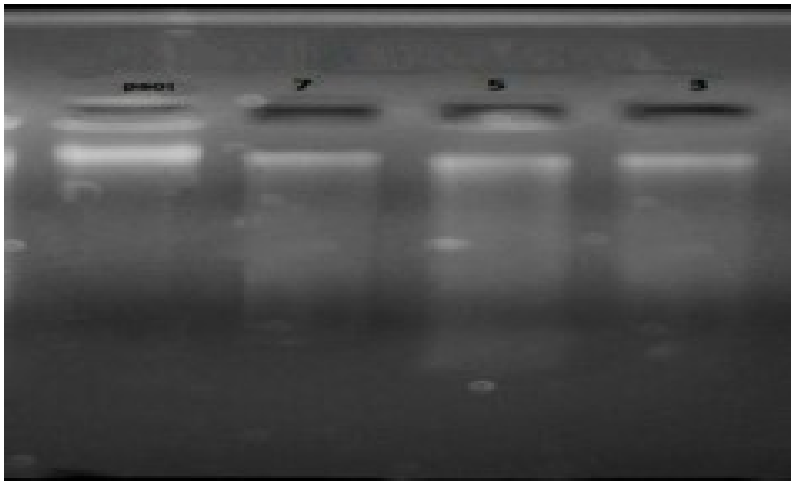
بعد از انجام تست‌های روتین میکروبیولوژی با استفاده از محیط‌های کشت جامد اختصاصی و محیط های افتراقی تعداد ۶ مورد آلوده به سالمونلا شناسایی شدند و ۴۴ نمونه از نظر وجود باکتری سالمونلا منفی بودند. بعد از استخراج DNA با استفاده از انجام آزمایش تاییدی مولتی پلکس M-PCR مشخص شد که تعداد ۴۰ مورد از نظر آلودگی به سالمونلا منفی بودند و ۹ مورد از نمونه های مدفوع، آلوده به سروارهای *سالمونلا انتریکا* بوده اند که همگی آنها با استفاده از روش مولکولی مورد تایید قرار گرفت (شکل ۲). هر ۹ مورد دارای ژن *invA* بودند. همه نمونه هایی که با روش کشت از نظر وجود سالمونلا مثبت بودند در آزمون-M PCR نیز مثبت بودند و همه نمونه هایی که در آزمون -M PCR منفی بودند در شناسایی با روش کشت نیز منفی بودند (شکل ۳ و ۴). نتایج حاصله از درصد جداسازی باکتری از محیط‌های کشت جامد اختصاصی و محیط های افتراقی (نمودار ۱) و نتایج حاصله از درصد جداسازی باکتری به روش مولتی پلکس M-PCR بصورت درصد آلودگی گزارش شده است (نمودار۲).

[Downloaded from joavm.kazerun.iau.ir on 2025-07-12]
[DOR: 20.1001.1.2717378.2022.5.13.4.6]

شکل ۱. کلنی ها با مرکز مشکی بر روی محیط SS آگار

تست	اوره آز	سیمون سیترات	اندول	حرکت	TSI	MR	VP
سالمونلا انتریکا	–	+	–	+	Alk/A+H2S	+	–

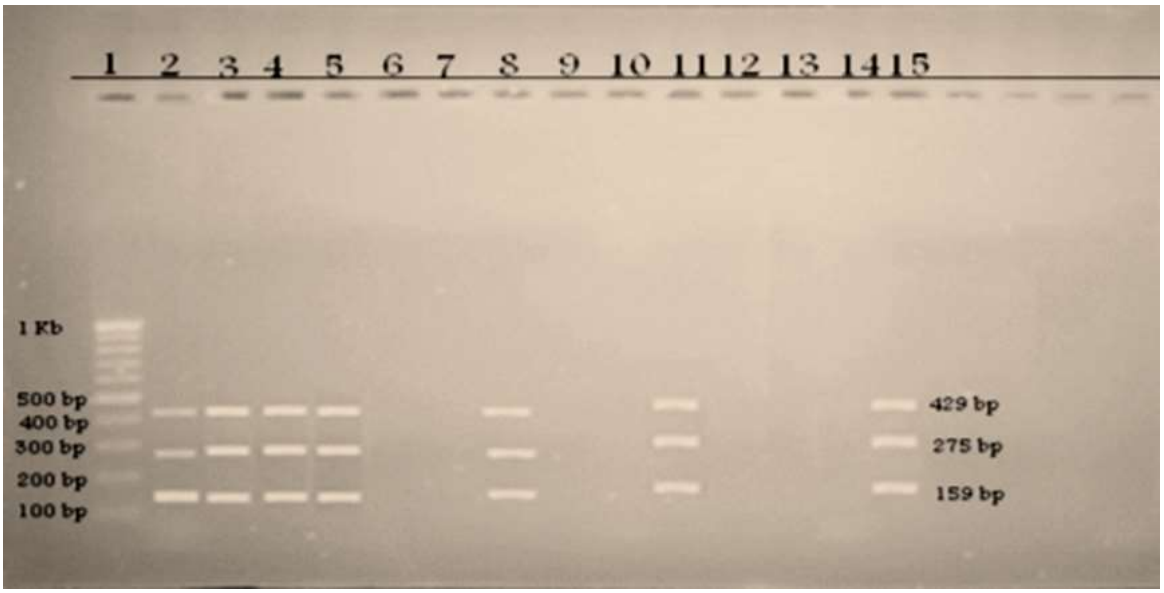
جدول۳. نتایج بیوشیمیایی سویه های *سالمونلا انتریکا* (*Salmonella enterica*)



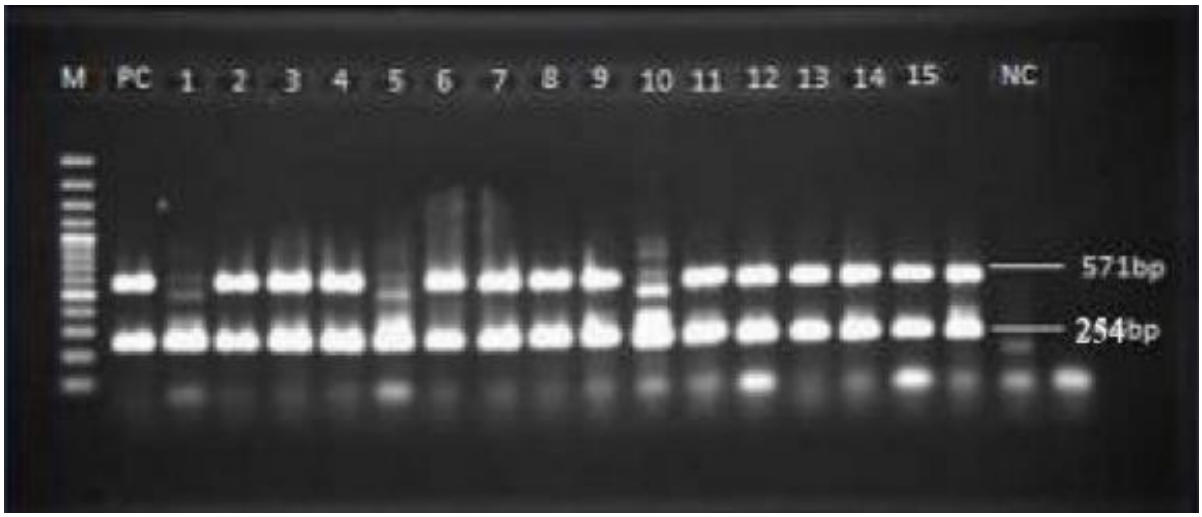
شکل ۲. تایید استخراج DNA پس از انجام تست PCR

[Downloaded from joavm.kazerun.iau.ir on 2025-07-12]

[DOR: 20.1001.1.2717378.2022.5.13.4.6]

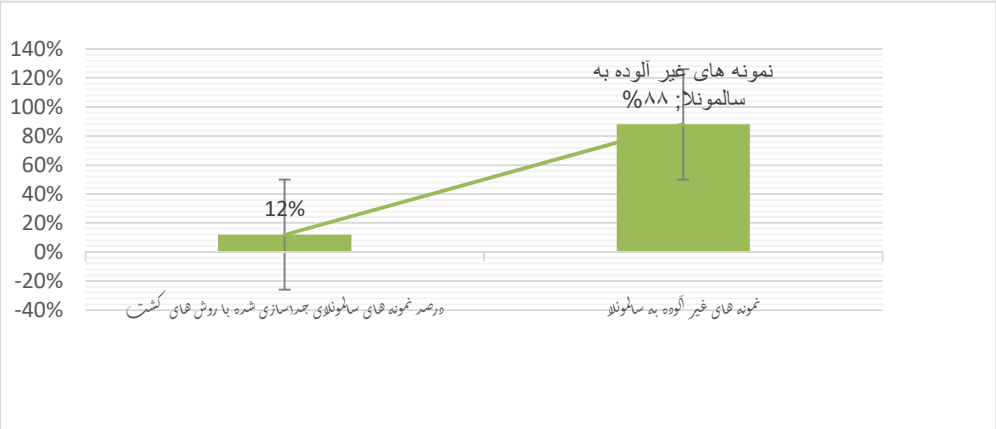


شکل ۳. نتیجه آزمایش Multiplex PCR با استفاده از پرایمر های اختصاصی ژن *invA* به طول ۲۷۵ جفت باز جنس سالمونلا، ژن *OmpC* به طول ۱۵۹ جفت باز مربوط به سروواراهای *سالمونلا انتریکا* و ژن *Rfs* به طول ۴۲۹ جفت باز مربوط به سروواراهای *سالمونلا انتریکا*. ستون ۱: نشانگر ۱Kb. ستون۲:کنترل مثبت *سالمونلا انتریتیدیس*. ستون ۳: کنترل مثبت *سالمونلا پاراتیفی B*. ستون ۴: کنترل مثبت *سالمونلا پاراتیفی C*. ستون۵: کنترل مثبت *سالمونلا تیفی موریوم*. ستون۶: کنترل منفی (آب مقطر). ستون‌های ۸ و۱۱ و ۱۵: نمونه های آلوده به باکتری سالمونلا.

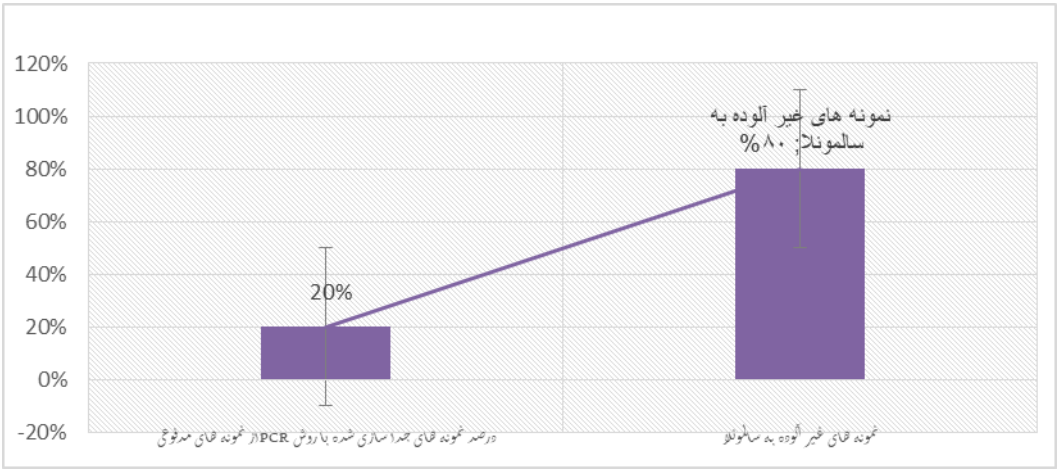


شکل ٤. نتیجه آزمایش Multiplex PCR با استفاده از پرایمر های اختصاصی ژن *spvR* به طول۲۵۴ جفت باز جنس سالمونلا، ژن *spvC* به طول ۵۷۱ جفت باز مربوط به سروواراهای *سالمونلا انتریکا*.

[Downloaded from joavm.kazerun.iau.ir on 2025-07-12]
[DOR: 20.1001.1.2717378.2022.5.13.4.6]



نمودار ۱. درصد آلودگی نمونه های مدفوع گربه ها به باکتری *سالمونلا انتریکا* به روشهای معمولی جداسازی



نمودار ۲. درصد آلودگی نمونه های مدفوع گربه‌ها به باکتری *سالمونلا انتریکا* به روش M-PCR

بحث

سالمونلا انتریکا زیر گونه انتریکا سروار انتریتیدیس با فرمول آنتی‌ژنیک ۱۲ و ۱، ۹:O و H:gm یکی از مهم ترین عوامل گاستروانتریت اپیدمیک و آندمیک درانسان و دام درسرتاسرجهان است. در ایران نیز گزارش های متعددی از اپیدمی های مربوط به سروارهای انتریتیدیس و تیفی موریوم انتشار یافته است. از سوی دیگر وجود حاملین چه در انسان وچه در حیوانات جایگاه ویژه ای در اپیدیمیولوژی این بیماری پیدا کرده است که معمولا تشخیص و شناسایی آنها با روش معمول آزمایشگاهی مشکل می باشد. در ایران دومین عامل ایجاد کننده اسهال در انسان پس از شیگلا باکتری سالمونلا می باشد. در مقابل، شیوع آن درمحل پرورش حیوانات باعث از دست رفتن تولیدات دامی، مرگ و میر، افزایش ضرر های اقتصادی می باشد. جهت جلوگیری از انتشار بیماری می بایست خیلی سریع تشخیص داده شود. روش واکنش زنجیره ای پلی مراز یا PCR از حساسیت و ویژگی بالایی برای شناسایی عوامل عفونی برخوردار است. روش PCR چندگانه‌ای یا M-PCR روشی بسیار دقیق، موثر، مناسب و با استفاده از چند آغاز گر به طور همزمان در کمتر از ۱۲ ساعت

[Downloaded from joavm.kazerun.iau.ir on 2025-07-12]
[DOR: 20.1001.1.2717378.2022.5.13.4.6]

در مورد نمونه های مشکوک به سالمونلا می توان اظهار نظر کرد. جداسازی سروتیپهای مشابه سالمونلا از انسانها و حیوانات وحشی بیانگر نقش مهم حیوانات وحشی در انتقال سالمونلا به انسان می‌باشد. از طرف دیگر مقاومت آنتی بیوتیکی سالمونلاهای جدا شده از انسانها و حیوانات یک مسأله رو به رشد بوده و مشکلات گستردهای را در درمان سالمونلوز ایجاد کرده است (Markey *et al.*, 2013).

جمعیت گربه های خانگی در ایران به عنوان یک پل ارتباطی بین حیات وحش و انسانها، می تواند نقش مهمی در انتشار سالمونلا ایفا کند. با وجود گزارشهای متعدد از انتقال سالمونلا از سگها و گربه‌های اهلی به انسان، نقش گونه‌هایی از سگها که در مناطق روستایی در تماس نزدیک‌با حیوانات و انسانها قرار دارند، در اپیدمیولوژی‌سالمونلا بسیار ناشناخته مانده است. متوسط آلودگی ۴ تا ۲۸ درصدی گربه های اهلی به سالمونلا، بیانگر میزان بالای تماس این حیوانات در محیط با باکتری سالمونلا می باشد و از طرف دیگر با توجه به دفع متناوب سالمونلا از مدفوع حیوانات آلوده و امکان تنها یکبار نمونه گیری در این تحقیق، بنظر می رسد آلودگی گربه ها در این ناحیه بالاتر از ۱۰ ٪ باشد. جداسازی باکتری سالمونلا از گربه های خانگی در بازه سنی زیر ۲ سال تا بالای ۵ سال می تواند بیانگر تماس مداوم گربه ها با این باکتری و آلودگی بالای این منطقه باشد. آلودگی توله گربه‌های زیر ۲ سال به سالمونلا نسبت به گربه هایی که سن بالاتری داشتند، فراوانتر بود. در مطالعات صورت گرفته بر جمعیت اهلی چنین نتیجه‌ای ذکر شده و علت آن کاهش اختلال در عملکرد سیستم ایمنی حیوانات جوانتر نسبت به مسن ترها ذکر شده است (Markey *et al.*, 2013). در مطالعه حاضر نیز تفاوت معنی‌داری در آلودگی به سالمونلا در دو جنس نر و ماده مشاهده نشد.

Panizzon و همکاران به تشخیص و شناسایی *سالمونلا انتریکا* سروار تیفی موریوم و اینترتیدیس در جوجه‌های گوشتی با روش M-PCR پرداختند. *سالمونلا انتریتیدیس* و *تیفی موریوم* از عوامل مهم سالمونلوز منتقله از راه مواد غذایی به انسان می‌باشند. تخمین زده شده که تقریبا ۷۵٪ از موارد عفونت سالمونلوز در انسان از طریق محصولات غذایی آلوده به سالمونلا مشتق شده از گوشت گاو وخوک و مرغ و همچنین تخم مرغ است. جهت کاهش این سطح از عفونت در میان جوامع مختلف نیاز به بررسی جدی و کنترل این سری از محصولات غذایی قبل از استفادهٔ مصرف کنندگان است. تشخیص عفونت محصولات از طریق روش های سنتی صورت گیرد نیاز به زمانی طولانی دارد و همچنین خطای این سری از تشخیص‌ها بسیار بالا است. پس استفاده از روش‌های مولکولی روز به روز در جامعه در حال افزایش است. در این تحقیق از سه جفت پرایمر جهت شناسایی استفاده شد. پرایمرها عبارت بودند از *invA* جهت شناسایی عمومی سالمونلاها، *flic* جهت شناسایی *سالمونلا تیفی موریوم* و *IE-1* جهت شناسایی *سالمونلا انتریتیدیس*. محققان در این مطالعه به این نتیجه رسیدند که روش M-PCR دارای حساسیت و اختصاصیت بالایی در مقایسه با روش های کشت معمولی و سنتی دارد و قادر به شناسایی سالمونلاها در حد جنس نیز می‌باشد و همچنین امکان شناسایی چند جنس را در آن واحد دارد و همچنین زمان شناسایی نمونه‌های آلوده را پایین می‌آورد (Panizzon *et al.*, 2015)

Ramin و همکاران ژنهای هدف متعددی جهت شناسایی سویه‌های سالمونلا معرفی گردیده است: *invA*، *RfbE*، *fliC* و *ompC* تمامی این ژنها را می‌توان با روش‌های M-PCR، Nested PCR، semi nested PCR و سایر

[Downloaded from joavm.kazerun.iau.ir on 2025-07-12]
[DOR: 20.1001.1.2717378.2022.5.13.4.6]

روش‌های PCR تکثیر کرد. (Ramin *et al.*, 1390). Saeki و همکاران از سه ژن هدف *prt*، *invA* و *Tgv* برای تشخیص سالمونلا با استفاده از تکنیک M-PCR استفاده کردند. ژن *invA* برای تهاجم سالمونلا لازم است چرا که به وسیله آن باکتری به قسمت‌های عمقی‌تر روده نفوذ می‌کند و در عین حال برای جنس سالمونلا اختصاصی است (Saeki *et al.*, 2013). Scholz و همکاران در مطالعه تجربی که هولگر و همکاران بر روی خوک انجام دادند از ژن *invA* استفاده کردند و به حساسیت ۱۰۰٪ و ویژگی ۹۶٪ برای این ژن رسیدند. اما بعضی از سالمونلاها مثل *سالمونلا لیچفیلد* و *سالمونلا سنتر برگ* توسط این پرایمر تشخیص داده نشدند. سویه غیر سالمونلایی متعلق به خانواده انتروباکتریاسه شامل کلبسیلا، شیگلا، اشرشیاکلی و پروتئوس اگر چه از لحاظ خصوصیات بیوشیمیایی به سالمونلا شبیه اند ولی از لحاظ ژن *invA* منفی هستند (Scholz *et al.*, 2001). Akiba و همکاران به تکثیر انتخابی ژنهای *Tyv*، *prt*، *viaB*، *flic* با روش M-PCR جهت شناسایی‌سالمونلا انتریکا سروار تیفی و پاراتیفیA پرداختند. در این تحقیق محققین از پرایمرهای *viaB* (ژنهای آنتی ژنی vi)، *flic* (ژنهای آنتی‌ژنی H) و *prt* (ژنهای سنتز کننده آنتی‌ژن O) جهت تشخیص همزمان و دقیق تب حصبه و تب شبه حصبه استفاده کردند. در این تحقیق مشخص گردید که پرایمرهای *prt* و *flic* جهت شناسایی سروار پاراتیفی و همچنین *پرایمرهای flic*، *viaB* و *tyv* به درستی سروارتیفی را شناسایی می کند (Akiba *et al.*, 2011). Choudhury و همکاران اعلام نمودند که ژن *invA* پروتئین‌های غشای داخلی باکتری سالمونلا که برای تهاجم به سلول‌های اپیتلیال میزبان لازم است کد کند را در اختیار دارد. Choudhury و همکاران یک جزء داخلی از ژن *invA* را که در تهاجم سالمونلا در کشت سلولی اساسی بود تعیین و معرفی نمودند. روش آنان کاملا اقتصادی‌بوده و در حساسیت و اختصاصی بودن تعیین سالمونلاها موثر بود(Choudhury *et al.*, 2016).Malorny و همکاران در ۲۰۰۳ از پرایمرهای $P_1 - P_2$ مربوط به ژن S_{18} ، S_{19} مربوط به ژن *ompC*، ST_{11} ، ST_{15} مربوط به ژن *Rfs* و $S_{139} - S_{141}$ مربوط به ژن *invA* در تشخیص سریع سروتیپ‌های سالمونلا استفاده نمودند (Malorny *et al.*, 2003). در تحقیقی که Zahraei-Salehi و همکاران انجام دادند از پرایمر *ompC* جهت شناسایی جدایه های سالمونلا در نمونه های مدفوع گاو پرداختند و به این نتیجه رسیدند که تعیین ژن *ompC* با روشPCR به دنبال غنی سازی مدفوع میتواند یک روش مناسب برای جستجوی سالمونلا ها در نمونه های مدفوع باشد(Zahraei-Salehi *et al.*, 2006). Shabnam و Kwai Lin در سال ۲۰۱۰ به جستجوی سرووارهای سالمونلا انتریکا در غذاهای خیابانی پرداختند و در این مطالعه یکی از پرایمرهای مورد استفاده *ompC* بود که در پایان به این نتیجه رسیدند که پرایمر *ompC* جهت شناسایی‌سرووارهای سالمونلا انتریکا یک پرایمر اختصاصی است (Shabnam & Kwai Lin, 2010). در این تحقیق از سه جفت پرایمر *ST_{11}, ST_{15}*، *ST_{18}, ST_{19} – Sal_3, Sal_4* استفاده شد که *S_{18}* و *S_{19}* جهت تشخیص *ompC*، *Sal_3* و *Sal_4* جهت شناسایی *invA* و *S_{11}* و *S_{15}* جهت شناسایی *rfs* بودند. قسمتی از ژن که به این پرایمرها متصل می شود به ترتیب *159bp*، *275bp* و *429bp* بود و پرایمرهای *Rfs* و *ompC* جهت شناسایی سرووارهای مختلف *سالمونلا انتریکا* بودند.

[Downloaded from joavm.kazerun.iau.ir on 2025-07-12]
[DOR: 20.1001.1.2717378.2022.5.13.4.6]

نتایج این تحقیق نیز با نتایج Soltan Dallal و همکاران و Ling و Wang همخوانی دارد و می‌توان گفت که *ompC* یک پرایمر اختصاصی جهت شناسایی سروارهای *سالمونلا انتریکا* است. پلاسمید حدت حامل اپرون *spv* شامل پنج ژن *Spv A, R, D, C, B* می‌باشد. این اپرون در ایجاد حدت و مقاومت دارویی، انتشار و عمومی شدن باکتری در بدن میزبان و سلامت جامعه به اثبات رسیده است. در این مطالعه ابتدا اقدام به جمع آوری نمونه‌های طیور کردند. از تعداد ۱۰۰۱ نمونه با روش بیوشیمیایی تعداد ۶۸ نمونه سالمونلا جدا و سپس عمل سروتایپینگ انجام شد. در این تحقیق بر آن شد که روش M-PC با سه جفت آغازگر، جنس و سروار *سالمونلا انتریتیدیس* مشخص گردند که آن پرایمرها عبارت بودند از ST_{11}-ST_{14}، S_1 -S_4 -*SEFA2* – *SEFA4* و همچنین جهت شناسایی *سالمونلا تیفی موریوم* از چهار جفت پرایمر شامل *invA*، *Rfbj*، *flic* و *flijb* استفاده کردند (Soltan Dallal *et al.*, 2007; Ling and Wang, 2001).

Lee و همکاران به تشخیص و شناسایی *سالمونلا انتریکا* و *تیفی موریوم* در گوشت مرغ با روش M-PCR پرداختند. طی تحقیقات زیادی که توسط محققین دیگر صورت گرفته بود استفاده از پرایمر *flic* جهت تشخیص و شناسایی سالمونلاتیفی موریوم مکررا صورت گرفته بود ولی در این تحقیقی از پرایمر *STM4492* جهت شناسایی *سالمونلا تیفی موریوم* استفاده شد و همچنین جهت شناسایی *سالمونلا انتریتیدیس* از پرایمر *sdf* استفاده شد و همچنین از پرایمر *invA* به عنوان آخرین پرایمر استفاده شد. حد تشخیص در مطالعه حاضر به حدود 10^5 CFu / ml رسید. این مطالعه بر روی ۱۰۲ نمونه گوشت مرغ صورت گرفته که حدود ۹۲ نمونه با استفاده از روش‌های کشت معمولی منفی بودند. طی این مطالعه به این نتیجه رسیدند که روش M-PCR دارای حساسیت ۱۰۰٪ و اختصاصیت ۹۴/۸٪ برای شناسایی سالمونلا است (Lee *et al,* 2009). تکنیک‌های متعارف میکروبیولوژیکی جهت شناسایی وقت‌گیر هستند و معمولاً در آزمایشگاه‌های مرجع صورت می‌گیرند بنابراین استفاده از روشM-PCR جهت شناسایی سالمونلا و تشخیص و افتراق سروارهای مختلف آن در زمانی کمتر از ۲۴ ساعت حائز اهمیت است. به تکثیر انتخابی ژنهای *Tyv*، *prt*، *viaB*، *flic* با روش M-PCR جهت شناسایی *سالمونلا انتریکا* سروار تیفی و پاراتیفی A انجام شد. محققین از پرایمرهای *viaB* (ژنهای آنتی ژنی vi)، flic (ژنهای آنتی‌ژنی H) و *prt* (ژنهای سنتز کننده آنتی‌ژن O) جهت تشخیص همزمان و دقیق تب حصبه و تب شبه حصبه استفاده کردند. مشخص گردید که پرایمرهای *prt* و *flic* جهت شناسایی سروار پاراتیفی و همچنین پرایمرهایflic، *viaB* و *tyv* به درستی سروار تیفی را شناسایی می کند (Saeki *et al.*, 2013). Shagufta و همکاران به تشخیص و شناسایی *سالمونلا انتریکا* سروار تیفی وسط تکثیر گزینشی ژن *invA*، *viaB*، *flic* و ژن *prt* با کمک روش M-PCR پرداختند. حصبه به صورت یک مشکل عمده بهداشتی در بسیاری از نقاط جهان بویژه کشورهای در حال توسعه می‌باشد. ژنهای *viaB*، *flic* و *prt* مسئول سنتز vi (کپسول)، H,(LPS)o (تاژک) هستند. ژن *invA* همراه با دیگر ژن های تهاجمی مسئول حمله به اپیتلیال سلول هاست و در همه انواع سالمونلا وجود دارد. در طی این مطالعه مشخص شد که روش M-PCR دارای حساسیت و اختصاصیت بالایی برای شناسایی نمونه‌های آلوده به *سالمونلا تیفی* است و نتایج را کمتر از ۲۴ ساعت در اختیار محققین

[Downloaded from joavm.kazerun.iau.ir on 2025-07-12]
[DOR: 20.1001.1.2717378.2022.5.13.4.6]

می‌گذارد (Shagufta *et al.*, 2017). Lee و همکاران به شناسایی *سالمونلا انتریکا* سروار *تیفی موریوم* و *اینترتیدیس* در گوشت با استفاده از روش M-PCR پرداختند در طی این مطالعه از پرایمرهای *flic* و *sefA* استفاده کردند. در این تحقیق مشخص گردید همان طور که انتظار می‌رفت استفاده از روش M-PCR دارای حساسیت بالا در حدود ٪۱۰۰-۹۱/۷٪ و همین طور اختصاصیت بالا در حدود ٪۱۰۰-۹۹/۱٪ جهت شناسایی سالمونلا است (Lee *et al.*, 2009).

تشخیص سالمونلاها توسط کشت میکروبی مستلزم برداشت مکرر نمونه، طول مدت کشت محیط‌های اختصاصی است. سلولهای غیرقابل کشت و مرده وقتی که در غلظت بالایی در نمونه باشند در PCR قابل شناسایی هستند در صورتی که این سلول‌ها در کشت شناسایی نمی شوند. محققین از پیش غنی‌کننده BPW و غنی کننده تتراتیونات برای جداسازی سالمونلا از غذا استفاده کردند و به این نتیجه رسیدند که جنس سالمونلا ۲ ساعت بعد از انکوباسیون در BPW خود را با شرایط محیط کشت آداپته می‌کند و زمانی که تعداد باکتری در طی این دو ساعت CFu ۱۰۴ باشد باند *bp*284 ژن *invA* ظاهر می‌شود. ۴ ساعت بعد از انکوباسیون به تعداد CFu ۱۰۳ باکتری و ۶ ساعت بعد از انکوباسیون به تعداد CFU ۱۰۲ برای مشاهده باند نیاز است و به این نتیجه رسیدند که باکتری باید حداقل ۵ تا ۶ ساعت انکوبه باشد تا استخراج DNA و انجام PCR نتیجه بخش باشد. این زمان پیشنهادی حداکثر ۲۴ ساعت است (Zahraei-Salehi *et al.*, 2006). مطالعات نشان می دهند که در مقایسه با روشهای کشت سنتی، روش M-PCR دقت تشخیصی بالاتر و همچنین بازه زمانی کمتری را شامل می شود. در این بررسی کاملا روشن است که روش M-PCR در شناسایی نسبت به روش کشت حساسیت بیشتری داشته و همچنین بیانگر این مساله است که روش M-PCR می تواند روش موفق‌تری در شناسایی این باکتری نسبت به روش کشت باشد (Malorny *et al.*, 2004). از جمله محدودیتهای این مطالعه می توان به نمونه گیری یکباره ازگربه ها و عدم تکرار پذیری نمونه گیری بواسطه نبود رضایتمندی صاحب گربه ها اشاره نمود.

نتیجه گیری

به عبارت دیگر چنانچه هدف غربالگری، تعداد زیادی از نمونه ها باشد ناگزیر استفاده از شیوه‌های مدرن مولکولی هستیم که برخلاف روش‌های سنتی، سریعترو دقیقتر بوده و احتمال خطای آزمایشگاهی نیز کاهش می یابد و همچنین یکی دیگر از معایب استفاده از روش‌های سنتی این است که سلول‌های مرده یا سلول‌هایی که نمی توانند رشد کنند توسط روش‌های کشت سنتی قابل شناسایی نیستند و احتمال خطای آزمایشگاهی در این موارد افزایش می یابد ولی در روش مولکولی PCR به راحتی قابل شناسایی هستند. با توجه به پیشرفت‌های اساسی و قابل توجهی که در این روش‌ها صورت پذیرفته است به تدریج مشکلات مربوط به جداسازی و تشخیص باکتری‌های مختلف مرتفع خواهد گردید. در بین روش‌های جدید تکنیک‌های PCR، ELISA و هیبریداسیون DNA دارای کاربرد بیشتری می باشند. جهت تشخیص سالمونلا استفاده از روش M-PCR در حال پیشرفت و عمومی شدن است. این نتایج قویا نشان می دهد که *SpvB* و *SpvC* در مراحل مختلف برای تاثیرگذاری بر یک مسیر یا فرآیند مشترک در سلول میزبان مورد نیاز بوده تا مقاومت در برابر عفونت ایجاد شود. به نظر می‌رسد آزمایشگاههایی که به طور اختصاصی روی سالمونلاها کار می‌کنند به تدریج روش M-PCR بایستی جایگزینی روشهای

[Downloaded from joavm.kazerun.iau.ir on 2025-07-12]
[DOR: 20.1001.1.2717378.2022.5.13.4.6]

سنتی و سروتایپینگ نمایند تا هم کم هزینه‌تر و سریع‌تر باشد و هم در کشوری با شرایط ایران که گاهی در معرض تحریم‌های ناخواسته قرار دارد کارها و امور مرتبط با این باکتری با اهمیت، به تعویق نیفتد.

تشکر و قدردانی

در نهایت محققین این مقاله بر خود می دانند تا از زحمات کارشناسان و متخصصین آزمایشگاه میکروب شناسی (بیطاران) شیراز و بویژه آقای دکتر نوروزی که با راهنمایی های ارزنده و گرانقدر خود در پیشبرد این پژوهش ما را یاری نمودند کمال تشکر و امتنان را داشته باشند. این مطالعه با کد اخلاق IR.IAU.KAU.REC.1400.136 در دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون ثبت گردید.

تضاد منافع

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند بیان کنند که تعارضی بین آنها وجود ندارد.

Reference

Afzal S., Shah SS., Majeed A., Sajid R., Shabbir A. and Masood F. Effects of human-pet interaction; zoonosis. PJMLS, 2021; 4(Special Is), S152-S161.

Akiba M., Kusumoto M. and Iwata T. Rapid identification of Salmonella enterica serovars, typhimurium, choleraesuis, infantis, hadar, enteritidis, dublin and gallinarum, by multiplex PCR. J Microbiol Methods, 2011; 85(1), 9-15 .

Andrews JR. and Ryan ET. Diagnostics for invasive Salmonella infections: current challenges and future directions. Vaccine, 2015; 33: C8-C15.

Besharati M., Bahrami AR., Mashreghi M., Matin M. and Bahrami M. Development of a polymerase chain reaction-temporal temperature gradient gel electrophoresis assay for identification of Salmonella enterica Subspecies enterica using a hypothetical non-specific endonucleas S. entericae gene sequence. Jundishapur J Microbiol, 2017; 10(4).

Callegari C., Palermo G., Greco M., Corrente M., Piseddu E., Auriemma E. and Zini E. Pneumonia associated with Salmonella spp. infection in a cat receiving cyclosporine. Schweiz. Arch Tierheilkd, 2014; 156(10): 499-503.

Choudhury M., Borah P., Sarma HK., Barkalita LM., Deka NK., Hussain I., et al. Multiplex-PCR assay for detection of some major virulence genes of Salmonella enterica serovars from diverse sources. Curr Sci, 2016; 1252-1258 .

Hamad R. and Saleh AA. Incidence of Some Food Poisoning Bacteria in Raw Meat Products with Molecular Detection of Salmonella in Al Beida City, Libya. Alexandria Journal for Veterinary Sciences, 61(2).

Lee SH., Jung BY., Rayamahji N., Lee HS., Jeon WJ., Choi K. S., Yoo HS. A multiplex real-time PCR for differential detection and quantification of Salmonella spp., Salmonella enterica serovar Typhimurium and Enteritidis in poultry meats. J Vet Sci, 2009; 10(1): 43-51.

[Downloaded from joavm.kazerun.iau.ir on 2025-07-12]
[DOR: 20.1001.1.2717378.2022.5.13.4.6]

in shellfish. Canadian journal of microbiology, 2004; 50(11): 911-922 .

Panizzon JP., Pilz Júnior HL., Knaak N., Ramos RC., Ziegler DR. and Fiuza LM. Microbial diversity: relevance and relationship between environmental conservation and human health. BABT, 2015; 58: 137-145 .

Priya GB., Agrawal RK., Milton AAP., Mishra M., Mendiratta S., Luke A., Kumar GR. Rapid and visual detection of Salmonella in meat using invasin A (invA) gene-based loop-mediated isothermal amplification assay. LWT, 2020; 126: 109262 .

Ramin AGH., Ahmadi M., Alizadeh F.and Ramin S. detection of *salmonella* carriers using inv a gene amplification and bacterial culture in Urmia equine feces. Scientific-Research Iranian Veterinary Journal و1390; 7(3): 50-56.

Riedel S., Morse SA., Mietzner TA. And Miller S. Jawetz Melnick & Adelbergs Medical Microbiology 28 E: McGraw Hill Professional, 2019.

Saeki EK., Alves J., Bonfante RC., Hirooka EY. and De Oliveira TCRM . Multiplex PCR (mPCR) for the detection of salmonella spp. and the differentiation of the typhimurium and e nteritidis serovars in chicken meat. J Food Saf, 2013; 33(1): 25-29.

Sánchez-López E., Gomes D., Esteruelas G., Bonilla L., Lopez-Machado AL., Galindo, R., et al. Metal-based nanoparticles as antimicrobial agents: an overview. Nanomaterials, 2020; 10(2): 292.

Scholz H., Arnold T., Marg H., Rösler U. and Hensel A. Improvement of an invA-

Ling ML. and Wang GCY. Epidemiological Analysis of Salmonella Entertidis Isolates in Singapore. J Infect, 2001; 43(3): 169-172.

Lotfy NM., Hassanein M., Abdel-Gawad F., El-Taweel G. and Bassem S. Detection of Salmonella spp in aquatic insects, Fish and Water by MPN-PCR. WJFMS, 2011; 3(1): 58-66 .

Mahon CR., Mt M. andLehman DC. Textbook of diagnostic microbiology-e-book: Elsevier Health Sciences, 2023.

Malorny B., Hoorfar J., Bunge C. and Helmuth R. Multicenter validation of the analytical accuracy of Salmonella PCR: towards an international standard. AEM, 2023; 69(1): 290-296 .

Malorny B., Paccassoni E., Fach P., Bunge C., Martin A. and Helmuth R. Diagnostic real-time PCR for detection of Salmonella in food. Appl Environ Microbiol, 2004; 70(12): 7046-52.

Markey B., Leonard F., Archambault M., Cullinane A., and Maguire D. Clinical veterinary microbiology e-book: Elsevier Health Sciences, 2013; 159-174.

Moghadam A. and Nazarian S. Evaluation of class 1, 2 and 3 integrons in clinical Salmonella enteritidis strains by PCR method. JBJ, 2017; 5(2): 1-10 .

Murray CE., Varga C., Ouckama R. and Guerin MT. Temporal study of Salmonella enterica serovars isolated from fluff samples from Ontario poultry hatcheries between 2009 and 2018. Pathogens, 2021; 11(1): 9.

Panicker G., Vickery MC. and Bej AK. Multiplex PCR detection of clinical and environmental strains of Vibrio vulnificus

[Downloaded from joavm.kazerun.iau.ir on 2025-07-12]
[DOR: 20.1001.1.2717378.2022.5.13.4.6]

based PCR for the specific detection of Salmonella typhimurium in organs of pigs. Berl Munch Tierarztl Wochenschr, 2001; 114(9-10): 401-403 .

Shabnam M. and Kwai Lin T. Isolation and molecular sub typing of Salmonella enterica from chicken, beef and street foods in Malaysia. Sci Res Essays, 2010; 5(18): 2713-2720.

Shagufta B., Sivakumar M., Kumar S., Agarwal RK., Bhilegaonkar KN., Kumar A., et al. Antimicrobial resistance and typing of Salmonella isolated from street vended foods and associated environment. J Food Sci Technol, 2017; 54(8): 2532-2539 .

Soltan Dallal MM., Taremi M., Modarressi Sh., Zolfagharian K., Zolfagharian K. and Zali MR. Determining the Prevalence of Salmonella serotypes Obtained from Meat & Chicken Samples and Their Antibiotic Resistance Pattern in Tehran. Pajoohande, 2007; 12(3): 245-252.

Tang YW., Stratton CW. and Tang YW. Advanced techniques in diagnostic microbiology: Springer, 2013.

Taşkale Karatuğ N., Yüksel FN., Akçelik N. and Akçelik M. Genetic diversity of food originated Salmonella isolates. Biotechnol Biotechnol Equip, 2018; 32(3): 638-645 .

Usha Rani P. and Vijayalakshmi P. Detection of metallo-beta-lactamase production in rare carbapenem-resistant non-fermentative gram-negative bacilli isolated in a tertiary care hospital, Visakhapatnam, India. JoMMID, 2016; 4(1): 31-36 .

Zahraei-Salehi T., Mahzoniae MR. and Ashrafi A. Amplification of invA gene of salmonella by polymerase chain reaction (PCR) as a specific method for detection of salmonella. J Fac Vet Med Univ Tehran, 2006; 61(2): 195-199.

[Downloaded from joavm.kazerun.iau.ir on 2025-07-12]

[DOR: 20.1001.1.2717378.2022.5.13.4.6]

JOAVM
Journal of Alternative Veterinary Medicine
joavm.kazerun.iau.ir

Research Article

Islamic Azad University
Kazerun Branch
Fars, Iran

Examining Virulence Genes of *Salmonella Enterica* Isolated from Domestic Cats Suffering from Gastrointestinal Infection (Enteritis) with the Help of Multiplex PCR Molecular Technique

Arman Alhani[1], Hossein Fattahi[2*], Amir Vafafar[3]

[1]Graduated Doctor of Veterinary Medicine, Clinic Department, Faculty of Veterinary Medicine, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran
[2]Assistant Professor of Microbiology Department, Department of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran
[3]Assistant Professor of Surgery Department,, Faculty of Veterinary Medicine, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran

Received: 29/Jun/2022 Revised: 28/Jul/2022 Accepted: 02/Aug/2022

Abstract

Background and aim: *Salmonella* is a rod-shaped Gram-negative bacterium (bacillus) of the Enterobacteriaceae family and has many serotypes. *Salmonella* is transmitted through contaminated or raw food, feces, and saliva of sick animals. This study aimed to investigate the virulence genes of *Salmonella enterica* isolated from domestic cats suffering from gastrointestinal infection (enteritis) by Multiplex PCR (M-PCR) technique.
Materials and Methods: In this study, 50 stool samples of cats suffering from diarrhea were collected from veterinary clinics in Shiraz city and were transported to Bitaran laboratory in Shiraz city with full compliance with standard instructions. For the primary separation, buffered peptone water, selenite F broth, XLD, and SS agar were used. To confirm the diagnosis, biochemical tests such as TSI, urease, VP, indole, Simon citrate, and movement were used. Colonies were confirmed by biochemical tests and the M-PCR method was used to detect virulence genes *rfs-ompC-spvR-spvC-invA*.
Results: In the present study, 6 isolates of *Salmonella* bacteria were obtained using the microbial culture method but in contrast, using the M-PCR method, 10 definite cases of *Salmonella* bacteria were detected for virulence genes *rfs-ompC-spvR-spvC-invA*.
Conclusion: M-PCR is more accurate than microbial culture, and traditional microbial culture methods are often time-consuming, tiring, and expensive. Therefore, it is suggested that the laboratories that work exclusively on *salmonella* gradually replace the traditional methods with the M-PCR method.

Keywords: *Salmonella, Multiplex PCR, Diarrheal feces, Cat, Shiraz*

Cite this article as: Arman Alhani, Hossein Fattahi, Amir Vafafar. Examining virulence genes of *Salmonella enterica* isolated from domestic cats suffering from gastrointestinal infection (enteritis) with the help of Multiplex PCR molecular technique. J Altrn Vet Med. 2022; 5(13): 780-796.

**** Corresponding Author***
Assistant Professor of Microbiology Department, Department of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran.
E-mail: Iranian_vet@yahoo.com, Orcid: https://orcid.org/0000-0001-7581-5835

[Downloaded from joavm.kazerun.iau.ir on 2025-07-12]

[DOR: 20.1001.1.2717378.2022.5.13.4.6]