Archive of SID

مجله علوم پزشکی رازی دوره ۲۷، شماره ۷، مهر ۱۳۹۹ http://rjms.iums.ac.ir

مقاله پژوهشی

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 9:12 IRST on Sunday February 21st 2021

مطالعه مولکولی ژن اینتگرون سالمونلا تیفی موریوم جدا شده از منابع غذایی و تاثیر پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم بیفیدوم بر بیان آن با روش Real time PCR

احسان استبرقی: دکترای تخصصی میکروبیولوژی، گروه دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهربابک، ، شهربابک، ایران

کیومرث امینی: دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران (* نویسنده مسئول) dr_kumarss_amini@yahoo.com

بهروز شجاعی سعدی: استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی ،واحد اراک ، اراک، ایران

سعید اقدامیان: کارشناس ارشد مهندسی کشاورزی، گروه کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ابهر، زنجان، ایران

چکیده

زمینه و هدف: باکتری *سالمونلا* از خانواده *انتروباکتریاسه* باکتری روده‌ای، گرم منفی، بی هوازی اختیاری است. *سالمونلا* طیف وسیعی از مهره‌داران را تحت تأثیر قرار داده عمدتاً از طریق تماس مستقیم و غیرمستقیم با منشأ آلوده منتقل می‌شود. سالمونلوزیس بیماری خطرناک عفونی و بیماری مشترک انسان و حیوانات است. ژن اینتگرون (*int*) در مقاومت دارویی و انتشار باکتری در بدن میزبان موثر و عامل مهم در مقاومت دارویی باکتریها است. هدف بررسی مولکولی ژن *اینتگرون سالمونلا تیفی موریوم* جدا شده از منابع غذایی و تاثیر پروبیوتیک *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* بر بیان آن با روش Real time PCR می‌باشد.

روش کار: در این پروژه ۱۳۸ نمونه مواد غذایی (شیر، گوشت، مرغ، ماهی و غیره) از شهر اراک جداسازی گردید. در ظرف استریل و درپوش دار مخصوص با رعایت شرایط دمایی به آزمایشگاه میکروب شناسی منتقل شد. در آزمایشگاه جهت آماده سازی نمونه ها پس از سانتریفوژ از مایع فوقانی در ظرف استریل جهت آزمایشات نگهداری شد. محیط‌های انتخابی افتراقی مک کانکی آگار (MC) *سالمونلا-شیگلا* (SS) آگار، بیسموت سولفیت آگار برای ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت.

یافته‌ها: از بین ۱۳۸ نمونه موادغذایی با روش بیوشیمیایی تعداد ۱۲ جدایه *سالمونلا* تیفی موریوم جدا گردید، روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز جهت افتراق و بررسی حضور ژن اینتگرون انجام گرفت. *سالمونلا تیفی موریوم* دارای بیشترین اهمیت بیماری‌زایی در انسان و دام و طیور است که عامل رایج منتقله از طریق مدفوع و مواد غذایی جهانی می‌باشد.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه میزان Fold Change برای ژن *intI* برابر ۱/۱۳- که بیانگر انست که این ژن در گروه تیمار شده نسبت به گروه غیر تیمار ۱/۱۳ برابر کاهش دارد و این عمل اثر ضد میکروبی پروبیوتیک *بیفیدو باکتریوم بیفیدوم* بر بیان ژن اینتگرون نشان داد. در واقع درمان ترکیبی پروبیوتیک *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* با داروهای ضد میکروبی رایج، اثرات ضد باکتری خوبی را علیه گونه‌های *سالمونلا* نشان می‌دهند.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت کننده: حامی مالی نداشته است.

کلیدواژه‌ها

سالمونلا تیفی موریوم،

حساسیت آنتی بیوتیکی،

Real time PCR

تاریخ دریافت: ۹۹/۰۴/۱۰

تاریخ چاپ: ۹۹/۰۷/۰۹

شیوه استناد به این مقاله:

Estabergi E, Amini K, Shojaee Saadi B, Arak S. Molecular study of Salmonella typhimurium integrons gene isolated from food sources and the effect of probiotic Bifidobacterium bifidum on its expression by Real time PCR. Razi J Med Sci. 2020;27(7):65-77.

*انتشار این مقاله به‌صورت دسترسی آزاد مطابق با CC BY-NC-SA 3.0 صورت گرفته است.

www.SID.ir

Archive of SID

Razi Journal of Medical Sciences. 2020;27(7):65-77. http://rjms.iums.ac.ir

Original Article

Molecular study of Salmonella typhimurium integrons gene isolated from food sources and the effect of probiotic Bifidobacterium bifidum on its expression by Real time PCR

Ehsan Estabergi, Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, shahrebabak Branch, kerman, Iran
Kumarss Amini, Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran (*Corresponding author) dr_kumarss_amini@yahoo.com
Behrooz Shojaee Saadi, Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Arak Branch, Arak, Iran
Saeed Eghdamian, MSc in Microbiology, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Arak Branch, Arak, Iran

Abstract

Background: Salmonella have general characteristics of the Enterobacteriaceae family, gram-negative bacilli, voluntary anaerobes, non-acid fast and without spores, a large group of bacteria. Salmonella typhimurium is one of the most important causes of food poisoning in humans in the world. This organism is one of the most common pathogens that can be transmitted from animals to humans. Gastroenteritis is the most common Salmonella infection caused by these serotypes. Salmonella is transmitted through the consumption of contaminated food, which has led to increased public health concerns. Antibiotic resistance genes in Salmonella cause them to become resistant to antibiotics. Salmonella species have the ability to acquire antibiotic resistance in a variety of ways. The emergence of antibiotic resistance has now become a growing problem among Salmonella species and has created increasing health and medical problems in the control and treatment of infections caused by this bacterium. Therefore, the pattern of antibiotic resistance in samples Salmonella is clinically very important. Rapid and reliable tests in medical, veterinary and food laboratories for the diagnosis of Salmonella are important and necessary. Salmonella affects a wide range of vertebrates and Salmonella infections in humans occur mainly through the consumption of substances contaminated with this bacterium. The disease must be diagnosed very quickly. Invasion of the intestinal mucosa is an important and fundamental step in the pathogenesis of Salmonella. Salmonella typhimurium is mainly transmitted through direct and indirect human contact with an infected source. Salmonella carries chromosomal and plasmid genes that play a major role in the virulence and invasion of this bacterium. One of the most important virulence factors is the Salmonella Vir, Inv, and Int genes. Bifidobacterium bacteria can be named as the most important probiotics used in food products. Bifidobacterium (Langum, Catnulatum, Bruch, Bifidum) are gram-positive bacteria that are the dominant and normal intestinal microflora in 80% of children and 25% of adults is considered. Due to the probiotic effects of Bifidobacteria, these bacteria as living microorganisms that have a positive effect on the treatment of pathogenic conditions, our findings showed that the integron I gene has a high prevalence among Salmonella species. Bifidobacterium is one of the most important species of probiotics known and today extensive efforts are being made to use them in food products. Probiotics are in fact food supplements containing living microorganisms that affect the health of their host by balancing the microbial flora of the gastrointestinal tract.
Yogurt is the most common dairy product containing probiotics, and other ingredients such as cheese, fermented and non-fermented milk, and fruit juices can also be used as probiotics. Dietary supplements can generally also contain probiotics. The aim of this study was to molecularly investigate Salmonella typhimurium integron gene isolated from food sources

Keywords
Salmonella typhimurium,
integron I, II, III,
Probiotic,
Real time PCR

Received: 30/06/2020
Published: 30/09/2020

www.SID.ir

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 9:12 IRST on Sunday February 21st 2021

Archive of SID

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 9:12 IRST on Sunday February 21st 2021

and the effect of Bifidobacterium bifidum probiotic on its expression by Real time PCR.

Methods: In the present study, 138 food samples (milk, meat, chicken, fish, etc.) were collected to advance the project and transferred to a microbiology laboratory in a sterile container with a special lid at 4° C. In the laboratory for preparation, samples were precipitated with a uniform solution of phosphatase phosphate and then solid particles and woody substances in food, using a centrifuge at 3000 rpm for 5 minutes and the upper liquid in another sterile container. Stored at 4° C for subsequent experiments. Culture and Isolation: After culturing and growing the samples, Salmonella-Shigla agar (MC) agar, hectone, bismuth sulfite agar were transferred to differentiated mediums of McConkey Agar (MC) and placed at 37° C for 24 hours. Suspected Salmonella colonies (green colonies with black halo or without black halo) to confirm the diagnosis by biochemical tests and differential media TSI, SIM, Simon citrate, urease, MRVP, lysine iron agar, Broth malonate, IMViC was performed. After culturing in solid medium, BHI was refrigerated at 4° C. Isolated bacteria that had a + - + - reaction in the IMViC test and an alkaline / acid reaction in TSI medium were selected and isolated with suspicion of oxidase and ONPG colonies suspecting Salmonella and by comparing the results with tables Biochemical, biochemical confirmation of bacteria was performed. After extracting DNA from isolated Salmonella typhimurium isolate, the polymerase chain reaction was performed using the necessary materials and a suitable program, the presence of II, Int, Int III IntI genes was investigated with a specific primer. Determination of intI gene expression under the influence of Bifidobacterium bifidum probiotic. Before performing the polymerase chain reaction, 0.1 mg / ml gram of Bifidobacterium bifidum probiotic was infused in 20 ml of BHI and half of McFarland was added to Bifidobacterium bifidum intI positive. After 15 hours of incubation (Late log phase) is the best step for RNA extraction. After 15 hours, RNA extraction was performed. Bacterial suspension (bacteria with intI gene and determined by their MIC in the presence of probiotic Bifidobacterium bifidum, which are in the logarithmic phase of growth) (OD = 0.4-0.6 = 600-4) was used. The Qiagen DNase kit was used to remove genomic DNA. cDNA synthesis was performed using Reverse AMV enzyme at a concentration of 25 l / unit (Roche) then to calculate the expression of integron gene and draw diagrams Corresponding software was determined and the amount of target gene expression was calculated. Expression rate analysis was performed by relative measurement of mRNA expression compared to standard strains.

Results: In this study, Salmonella typhimurium integron virulence gene isolated from clinical cases under the influence of bifidum probiotic was identified by Real time PCR technique. From 138 food samples, 12 Salmonella strains were isolated, all of which had integron I gene. And the effect of antimicrobial agent on gene expression and according to the research done in this study, the Fold Change rate for intI gene is -1.13, which indicates that this gene in the treated group compared to the untreated group /13. Decreased 1 times. Which indicates a decrease in the expression and relative inhibitory effect of Bifidobacterium bifidum and a 1.13% decrease in the expression of the gene under the influence of probiotic treatment.

Conclusion: In fact, combination treatment of Bifidobacterium bifidum probiotics with common antimicrobial drugs showed good antibacterial effects against Salmonella species and the rate of increased bacterial growth was dependent on the probiotic concentration. As a result, low-dose probiotics can be a viable alternative to single-drug treatment for Salmonella infections, with benefits such as preventing adverse effects during treatment, saving on medication, and reducing costs.

Conflicts of interest: None
Funding: None

Cite this article as:

Estabergi E, Amini K, Shojaee Saadi B, Arak S. Molecular study of Salmonella typhimurium integrons gene isolated from food sources and the effect of probiotic Bifidobacterium bifidum on its expression by Real time PCR. Razi J Med Sci. 2020;27(7):65-77.

*This work is published under CC BY-NC-SA 3.0 licence.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 9:12 IRST on Sunday February 21st 2021

مقدمه

سالمونلاها دارای ویژگی‌های عمومی خانواده *انتروباکتریاسه*، باسیل‌های گرم منفی، بی هوازی اختیاری ، غیر اسید فست و بدون اسپور، گروه بزرگی از باکتریها به شمار می روند. *سالمونلا تیفی موریوم* از مهم‌ترین عوامل مسمومیت های غذایی در انسان در جهان به شمار می رود. این ارگانیسم یکی از شایع ترین پاتوژن‌های قابل انتقال از حیوانات به انسان می‌باشد. گاستروانتریت شایع ترین و متداول ترین عفونت *سالمونلایی* است که توسط این سروتیپ ها ایجاد می‌گردد. باکتری *سالمونلا* از طریق مصرف مواد غذایی آلوده انتقال می‌یابد که منجر به افزایش نگرانی در سطح بهداشت عمومی شده است (۱).

ژن‌های مقاومت آنتی بیوتیکی در *سالمونلاها* باعث مقاومت آنها نسبت به آنتی بیوتیک‌ها می‌گردند.گونه های *سالمونلا* این توانایی را دارند که از راه های مختلف مقاومت های آنتی بیوتیکی را کسب نمایند. بروز مقاومت آنتی بیوتیکی هم اکنون به مشکلی رو به گسترش در میان گونه‌های *سالمونلا* تبدیل شده و معضلات بهداشتی و پزشکی رو افزایشی را در کنترل و درمان عفونت های حاصل از این باکتری به وجود آورده است بدین جهت بررسی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در نمونه های بالینی *سالمونلا* بسیار حائز اهمیت می‌باشد. آزمایش های سریع و قابل اعتماد درآزمایشگاه‌های تشخیص پزشکی، دامپزشکی و صنایع غذایی به منظور تشخیص *سالمونلاها* امری مهم و ضروری به نظر می‌رسد (۲).

سالمونلا طیف وسیعی از مهره‌داران را تحت تأثیر قرار داده و عفونت‌های *سالمونلایی* در انسان عمدتاً از راه مصرف مواد آلوده به این باکتری رخ می‌دهد در ایران دومین عامل ایجادکننده اسهال در انسان ، پس از *شیگلا* باکتری *سالمونلا* می‌باشد که جهت جلوگیری از انتشار می‌بایست بیماری خیلی سریع تشخیص داده شود.تهاجم به مخاط روده مرحله مهم و اساسی در بیماری‌زایی *سالمونلاها* می‌باشد. *سالمونلا تیفی موریوم* عمدتاً از طریق تماس مستقیم و غیرمستقیم انسان با منشأ آلوده منتقل می‌شود. *سالمونلا ها*، حامل ژن‌های کروموزومی و پلاسمیدی هستند که در حدت و تهاجم این باکتری نقش عمده و اساسی دارند از مهم‌ترین عوامل حدت، ژن‌های *Vir* , *Inv*, *Int*, *سالمونلا* می‌باشد (۳، ۴).

اینتگرون‌ها واحدهای ژنتیکی بوده که در انتشار کاست های ژنی متحرک در میان میکروارگانیسم‌های گرم منفی شرکت دارند. تحرک *اینتگرون‌ها* با پلاسمیدها و ترانسپوزون‌ها تسهیل می‌شود. *اینتگرون‌ها* از طریق ترانسپوزون ها و پلاسمید ها انتشار ژنهای مقاومت در میان باکتری ها را امکان پذیر می کنند. به نظر می رسد که حضور *اینتگرون* در سویه ها موجب افزایش مقاومت آن‌ها نسبت به انواع باکتری های رایج می‌شود. اینتگرون‌های کلاس I نقش مهمی در ایجاد این مقاومت‌های چندگانه دارند. رایج ترین کاست *اینتگرون* حاوی ژن‌های مرتبط با مقاومت در برابر طیف وسیعی از عوامل ضد میکروبی، آنتی‌بیوتیک‌ها، آنتی‌سپتیک‌ها، دزانفکتانت‌ها است (۵).

Resistance Integrons بر اساس توالی ژن اینتگراز (*int*) دسته های اینتگرون‌ها IV، III، II، I و اخیراً V که در ارتباط با IS ترانسپوزون ها و پلاسمیدهای مختلف بوده و در صورت فراهم آمدن شرایط مناسب از یک باکتری به باکتری دیگر به صورت درون گونه ای و برون گونه ای منتقل می‌شوند (۶، ۷).

اینتگرون های کلاس I معمولاً در باکتری های گرم منفی به ویژه *انتروباکتریاسه* وجود دارند. آن ها در بسیاری از نقاط دنیا در ایزوله های *سالمونلا* دیده شده اند(۸). تا کنون بیش از ۱۰۰ کاست ژنی مختلف در اینتگرون ها و ۵۰ کاست در ارتباط با اینتگرون های کلاس I توصیف شده است که موجب مقاومت به تمامی آنتی بیوتیک های بتالاکتام، تمام آمینوگلیکوزیدها، کلرامفنیکل، تری متوپریم، ریفامپین، اریترومایسین، فسفومایسین، استرپتومایسین، لینکومایسین، ترکیبات چهارتایی آمونیوم و دیگر آنتی سپتیکها می شوند، بنابراین در ایجاد مقاومت آنتی بیوتیکی نقش بسیار مهمی دارند (۹).

اینتگرون های دسته اول در ۵۹-۲۲٪ از جدایه‌های کلینیکی باکتری های گرم منفی وجود دارند. بیشتر اینتگرون‌های دسته اول که روی کروموزوم باکتری ها واقع شده‌اند در جدایه های خارج بیمارستان به وجود می آیند اما آن هایی که روی پلاسمید و ترانسپوزون‌ها قرار دارند اکثراً در محیط های کلینیکی و بیمارستان‌ها

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 9:12 IRST on Sunday February 21st 2021

شکل می‌گیرند (۱۰).

این اینتگرون‌ها از دو قسمت با توالی ثابت و یک قسمت متغیر تشکیل شده اند. بخش ثابت سمت که شامل آنزیم اینتگراز (*int* I، *att* I (Attachement site) و پروموتورژن اینتگراز (Pint) و بخش ثابت دیگر سمت که معمولاً دارای ژن‌های *qacE* (ژن مقاومت به ترکیبات چهارتایی آمونیوم مانند اتیدیوم بروماید و ستریماید) و ژن *sul* I (ژن مقاومت به ترکیبات سولفونامیدی) است. در بین دو قطعه اینتگرون یک ناحیه متغیر داخلی وجود دارد که حاوی یک یا چند کاست ژنی مقاومت به آنتی بیوتیک است که تحت بیان همزمان پروموتور قدرتمند PC قرار می‌گیرند (۱۱). مطالعات زیادی از حضور اینتگرون‌های کلاس I در باکتری های گرم مثبت نیز ارائه شده است. اینتگرون های کلاس I در *سالمونلاها* می توانند درون ترانسپوزون ها، کروموزوم و پلاسمید قرار گیرند (۱۲، ۱۳).

از باکتری های *بیفیدوباکتریوم* می توان به عنوان مهم ترین پروبیوتیک های مورد استفاده در محصولات غذایی نام برد *بیفیدوباکتریوم ها (لانگوم، کاتنولاتوم، بروه، بیفیدوم)* از باکتری های گرم مثبتی هستند که میکروفلور غالب و طبیعی روده ۸۰ درصد از کودکان و ۲۵ درصد بزرگسالان محسوب می‌شود. با توجه به اثرات پروبیوتیکی *بیفیدوباکتریوم ها*، این باکتری ها به عنوان میکروارگانیسم های زنده که اثری مثبت بر درمان شرایط بیماری‌زایی دارند یافته های ما نشان داد که ژن *اینتگرون I* دارای شیوع بالایی در بین گونه های *سالمونلا* است. *بیفیدوباکتریوم ها* از مهم ترین گونه های پروبیوتیک شناخته شده هستن (۱۴) و امروزه تلاش های وسیعی در جهت استفاده از آنها در محصولات غذایی در حال انجام است. پروبیوتیک ها در حقیقت های مکمل غذایی های حاوی میکروارگانیسم زنده هستند که با ایجاد تعادل در فلور میکروبی دستگاه گوارش، روی سلامتی میزبان خود تاثیر می‌گذارند (۱۵).

ماست، معمول‌ترین ماده لبنی حاوی پروبیوتیک‌هاست و از دیگر ترکیبات مانند پنیر، شیرهای تخمیر شده و غیرتخمیری، آب میوه نیز می‌توان به‌عنوان پروبیوتیک استفاده کرد. عموماً مکملهای غذایی نیز می‌توانند حاوی پروبیوتیکها باشند (۱۴). هدف این مطالعه، بررسی مولکولی ژن *اینتگرون سالمونلا تیفی موریوم* جدا شده از منابع غذایی و تاثیر پروبیوتیک *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* بر بیان آن با روش Real time PCR می‌باشد.

روش کار

نمونه برداری: در مطالعه حاضر جهت پیشبرد پروژه ۱۳۸ نمونه مواد غذایی (شیر، گوشت، مرغ، ماهی و غیره) جمع آوری و در ظرف استریل و درپوش دار مخصوص در دمای ۴ درجه سانتی گراد به آزمایشگاه میکروب شناسی منتقل شد. در آزمایشگاه جهت آماده سازی، نمونه ها با محلول فسفات بافرسالین یکنواخت و سپس ذرات جامد و مواد خشبی موجود در مواد غذایی، با استفاده از سانتریفوژ با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه رسوب داده شد و مایع فوقانی در ظرف استریل دیگری در ۴ درجه سانتی گراد جهت آزمایشات بعدی نگهداری شد.

کشت و جداسازی: بعد از کشت و رشد نمونه‌ها، در محیط های انتخابی افتراقی مک کانکی آگار (MC) *سالمونلا-شیگلا* (SS) آگار، هکتون، بیسموت سولفیت آگار انتقال و به مدت۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند (۱۶) پرگنه‌های مشکوک به *سالمونلا* (کلنی‌های سبز با هاله سیاه و یا بدون هاله سیاه) را جهت تایید تشخیص به روش تست‌های بیوشیمیایی و محیط های افتراقی TSI، SIM، سیمون سیترات ، اوره آز، MRVP، لیزین ایرون آگار، مالونات براث، IMViC صورت گرفت. پس ازکشت در محیط جامد BHI در یخچال ۴ درجه سانتی گراد قرار گرفت. باکتری‌های جدا شده که دارای واکنش + – + – در آزمایش IMViC و واکنش آلکالین/اسید در محیط TSI بودند انتخاب شدند و با تست های اکسیداز و ONPG کلنی مشکوک به *سالمونلا* را جدا کرده(۱۶) و با مقایسه نتایج بدست آمده با جداول بیوشیمیایی،تایید بیوشیمیایی باکتری صورت گرفت.

آماده سازی DNA: استخراج DNA الگو یا Template برای انجام واکنش PCR طی دومرحله صورت پذیرفت. ابتدا ۱۳۸ نمونه مواد غذایی سویه *سالمونلا تیفی موریوم* جدا شده از بیماران را در لوله‌های مخصوص ۲ µl قرار داده شد، در این حالت، باید تعداد باکتریها در هر mg کدورتی معادل ۲×۱۰^{۹}

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 9:12 IRST on Sunday February 21st 2021

جدول ۱- پرایمرهای ژن اینتگرون مورد مطالعه (۱۷)

نام آغازگر	توالی	دما	اندازه bp
Int I	F:CAGTGGACATAAGCCTGTTC R:CCCGAGGCATAGACTGTA	۵۹	۱۶۰
Int II	F:CACGGATATGCGACAAAAAGGT R:GTAGCAAACGAGTGACGAAATG	۵۹	۷۸۸
Int III	F:GCCTCCGGCAGCGACTTTCAG R:ACGGATCTGCCAAACCTGAC	۵۹	۹۷۹

جدول ۲- برنامه تنظیم درجه حرارت و زمان برای انجام مراحل *PCR*

مرحله	دما(درجه سیلسیوس)	زمان(ثانیه)	تعداد سیکل
واسرشت اولیه	۹۵	۶۰۰	-
واسرشت	۹۵	۳۰	-
اتصال	۵۵	۴۰	-
بازآرایی(گسترش)	۷۲	۶۰	-
بازآرایی نهایی(گسترش)	۷۲	۶۰۰	۳۵

داشته باشد. سپس نمونه ها را به مدت ۵ دقیقه در دور موتور ۴۰۰۰ rpm سانتریفیوژ کرده. سپس ۱۰۰ µl از بافر Prelysis برای حل کردن دیواره باکتریها و ۱۰ µl از Ribotynase را به لوله مخصوص اضافه شد. در هر مرحله اضافه کردن نمونه ها خوب هم زده شد (۱۷، ۱۸).

مطابق دستور العمل کارخانه استخراج DNA انجام گردید. در مرحله بعد به وسیله Vortex لوله مخصوص را خوب هم زده سپس در Hot plate در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت. سپس ۱۰۰ µl از محلول که کاملا لزج است به لوله‌های مخصوص انتقال داده شد .این آخرین مرحله روند آماده سازی می‌باشد.

ارزیابی کمی وکیفی DNA غلظت DNA در نمونه های استخراج شده با استفاده از روش فلورومتر بررسی شد. زمان اندازه گیری سریع در کمتر از ۵ ثانیه، قابلیت اندازه گیری مقادیر بسیار کم DNA و تعیین غلظت‌های بالاتر بدون نیاز به رقیق سازی صور گرفت.

آماده سازی پرایمرها: طبق مطالعات انجام شده، ۳ جفت پرایمر مناسب انتخاب و جهت تهیه به شرکت Bioneer سفارش داده شد (جدول ۱).

واکنش زنجیره ای پلیمراز چندگانه Multiplex (PCR): پس از استخراج DNA از *سالمونلا تیفی موریوم* ایزوله شده واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از مواد لازم و برنامه مناسب ، بررسی حضور ژنهای *IntI , Int III ,Int II* با پرایمر اختصاصی صورت گرفت. مواد لازم برنامه مناسب و پرایمرهای اختصاصی در زیر آورده شده است. پس از آماده شدن نمونه، مخلوط حاصل در حجم نهایی ۲۵ µl به دستگاه ترموسایکلر ساخت کشورآلمان، Gradient Masterrcycler Eppendorf که از قبل روشن و درجه حرارت آن برای مراحل مختلف تنظیم شد، انتقال یافت. برنامه تنظیم درجه حرارت و زمان برای انجام مراحل PCR سالمونلا تیفی موریوم با استفاده از پرایمرهای فورواردF و ریورسR براساس جدول ۲ بود.

الکتروفورز ژل آگاروز، روشی استاندارد برای بررسی و تفکیک قطعات DNA حاصل از PCR می‌باشد. مزایای این روش ساده و سریع بودن انجام آن و توانایی جداسازی قطعات DNA است. موقعیت و محل در ژل توسط رنگ آمیزی با غلظت های پایین محلول رنگ اریتروژل و مشاهده مستقیم آن تحت تأثیر تابش نور ماورای بنفش مشخص می‌شود. برای جدا کردن DNA با طول کوچک از غلظت بالای ژل آگارز استفاده شده و در حالی که برای تفکیک DNA هایی با طول بزرگ غلظت های پایین آگاروز مورد استفاده قرار گرفت.

بررسی اثر ضد میکروبی پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم بیفیدوم بر بیان ژن اینتگرون: از کلنی تازه کشت شده (۱۶ تا ۲۴ ساعت) برداشت کرده و در سرم فیزیولوژی استریل حل شد. کدورت سوسپانسیون ۰/۵ مک فارلند بود، برای تطابق از سرم

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 9:12 IRST on Sunday February 21st 2021

فیزیولوژی استریل استفاده شد تا کدورتی مشابه با ۰/۵ مک فارلند ایجاد گردد(۱۶).

تعیین MIC پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم بیفیدوم: ابتدا در محیط مغذی غلظتهای صفر، ۱/۲، ۱/۴، ۱/۸، ۱/۱۶ و غیره تهیه گردید. به هر یک از رقت-های تهیه شده، ۲۰ µl سوسپانسیون باکتری (معادل ۵×۱۰^{۵}cfu/ml) اضافه شد. سپس لوله ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۵ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری شدند و کدورت و یا عدم کدروت در لوله ها و میزان حداقل غلظت بازدارندگی تعیین گردید. مطابق با استاندارد(NCCLS) حداقل غلظت مهار کننده (MICs) *سالمونلا تیفی موریوم* در محیط مولر هینتون کشت داده شد. سپس کدورت آن ها با ۰/۵ مک فارلند مورد سنجش قرار گرفت (۱۶). از سویه *سالمونلا تیفی موریوم* به عنوان شاهد مثبت در این تست استفاده شد. سوسپانسیون *سالمونلا تیفی موریوم* از ترکیب لیوفیلیزه آن با غلظت ۲۰۴۸ µg در یک سی سی حلال DMSO ساخته شد. برای گذاشتن MIC در چاهک ۹۶ خانه، در مرحله اول ۱۰۰ µl از محیط کشت مولر هینتون براث در چاهک ها ریخته، در مرحله دوم سوسپانسیون *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* ریخته و تا چاهک دهم رقت سازی شد.

در مرحله سوم ۱۰۰ µl نیم مک فارلند به چاهک ها به طور ثابت اضافه شد به این صورت که پس از مخلوط نمودن سوسپانسیون پروبیوتیک در داخل چاهک های میکروپلیت به مدت ۱۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه در داخل انکوباتور قرار داده شد. پس از گذشت این زمان کدورت‌های تشکیل شده درون چاهک ها که بر اثر رشد *باکتری سالمونلا تیفی موریوم* به وجود آمده مشاهده شد و رقت MIC خوانده شد با مشاهده ایجاد کدورت در هر چاهک، چاهک قبلی به عنوان حدقل غلظت مهارکنندگی در نظر گرفته شد، بعد از گرماگذاری نمونه‌ها به مدت ۲ الی ۳ ساعت در محیط مولر هینتون آگار به صورت چمنی کشت داده شد(۱۶). از نمونه های مقاوم به *پروبیوتیک* برای استخراج RNA و بررسی میزان بیان ژن ها استفاده شد.

تعیین میزان بیان ژن intI تحت تاثیر پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم بیفیدوم: قبل از انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز به میزان ۰/۱ mg/ml گرم *پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* در حجم ۲۰ ml از BHI براث ریخته و معادل نیم مک فارلند به آن *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم intI* مثبت اضافه شد. پس از ۱۵ ساعت انکوبه گذاری (Late log phase) بهترین مرحله برای استخراج RNA است. پس از گذشت ۱۵ ساعت استخراج RNA به شرح ذیل انجام شد(۱۹).

استخراج RNA: برای این منظور از RNA کلی برای واکنش های تکثیر پرایمر استفاده شد. برای استخراج RNA از میکروکیت RNeasy (شرکت Qiagen) استفاده شد. سوسپانسیون باکتریایی (باکتری های واجد ژن *intI* بودند و با تعیین MIC آن ها در حضور *پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* که در فاز لگاریتمی رشد قرار دارند) ($OD_{۶۰۰}$= ۰/۴-۰/۶) مورد استفاده قرار گرفت. برای حذف DNA ژنومی از کیت DNase Qiagen استفاده شد.

سنتز cDNA سنتز cDNA با استفاده از آنزیم AMV Reverse با غلظت ۲۵µl/unit (شرکت Roche) انجام شد. بدین ترتیب RNA استخراج شده برای مدت ۳ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد انکوبه شد. سپس نسخه برداری معکوس (RT) در در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ دقیقه با ۲ µl از Random Primer، ۰/۸ µl از آنزیم AMV Reverse Transcriptase، ۲ µl از ۱۰dNTP میلی مولار، ۱ میکرولیتر Rnase inhibitor و ۲ µl بافر x۱۰ آنزیم AMV انجام شد. سپس آنزیم AMV در دمای ۹۹ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه انکوبه و غیرفعال شد.

انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز Real-Time-PCR: واکنش زنجیره ای پلیمراز در حجم ۲۰ µl با استفاده از کیت شرکت Genet bio CAT. NO:) Q9210) کره جنوبی انجام شد (۱۵) سپس برای محاسبه میزان بیان ژن *اینتگرون* و رسم نمودارهای مربوطه از نرم افزار مشخص و مقدار بیان ژن هدف محاسبه شد. آنالیز میزان بیان با اندازه گیری نسبی بیان mRNA در مقایسه با سویه استاندارد انجام شد.

یافته‌ها

نتایج آزمایشات بیوشیمیایی و میکروبیولوژیکی جهت جداسازی و تشخیص *سالمونلا تیفی موریوم*: در این مطالعه از ۱۳۸ نمونه مواد غذایی مورد بررسی ۱۲ جدایه *سالمونلا تیفی موریوم* به دست آمد (جدول ۳).

www.SID.ir

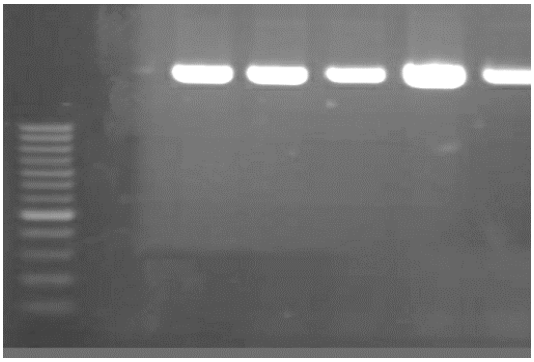
Archive of SID

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 9:12 IRST on Sunday February 21st 2021

شکل ۱- کلنی‌ها با مرکز سیاه بر روی محیط SS آگار

جدول ۳- نتایج بیوشیمیایی سویه های *سالمونلا تیفی موریوم*

تست	اوره آز	سیمون سیترات	اندول	حرکت	TSI	MR	VP
سالمونلا تیفی موریوم	-	+	-	+	Alk/A+H2S	+	-



شکل ۲- تائید استخراج DNA

نتایج استخراج DNA ایزوله‌های سالمونلا تیفی موریوم در شکل ۲ آمده است. نتایج الکتروفورز PCR جهت بررسی حضور ژن‌های *اینتگرون I,II,II* در شکل ۳ آمده است. با توجه به نتایج بدست آمده از ۱۲ جدایه *سالمونلا تیفی موریوم* استخراج شده همگی حامل ژن *Int I* بودند و هیچ کدام واجد ژن *III* , *IntII* نبودند. نتایج در نمودار جدول ذیل قابل مشاهده است (جدول ۴). نتایج مربوط به آزمون Real time PCR نیز درشکل ۴ تا ۶ آمده است.

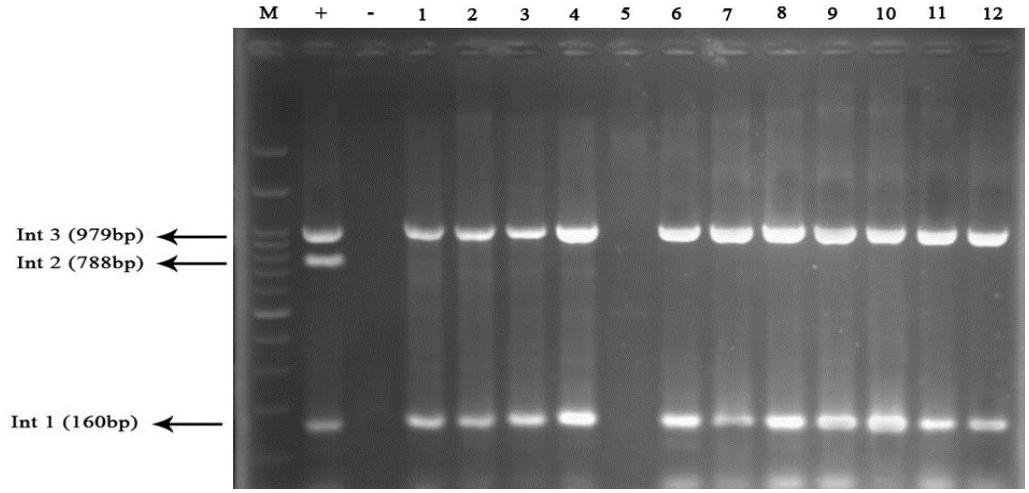
جدول ۵ بیانگر نتیجه T-Test برای داده‌های مورد بررسی می‌باشد. در ستون p-value سطح معنی داری برای هر ژن مشخص شده است. سطح معنی داری ۰/۰۵ به عنوان سطح معنی داری اصلاح شده جهت تعیین معنی داری نتایج استفاده گردید. در جدول فوق میزان P-value برای ژن intI از میزان ۰/۰۵ کمتر می‌باشد که بیانگر معنادار بودن اختلاف بیان این دو ژن در بین دو گروه تیمار شده و تیمار نشده می‌باشد.

ردیف Difference (A-B log scale) بیانگر میزان - ddct برای ژن‌ها در گروه تیمار نشده نسبت به گروه تیمار شده می‌باشد. ردیف Fold change نیز بیانگر میزان Fold change گروه تیمار نشده نسبت به گروه تیمار شده می‌باشد. میزان Fold Change برای ژن *intI* برابر ۱/۱۳- که بیانگر این است که این ژن در گروه تیمار شده نسبت به گروه غیر تیمار شده ۱/۱۳ برابر کاهش یافته است. ردیف Count بیانگر تعداد نمونه مورد بررسی می‌باشد.ردیف Mean بیانگر میانگین در دو نمونه است. ردیف STDEV df بیانگر انحراف معیار از میانگین می‌باشد. اگر انحراف معیار مجموعه‌ای از داده‌ها نزدیک به صفر باشد، نشانه آن است که داده‌ها نزدیک به میانگین هستند و پراکندگی اندکی دارند؛ در

www.SID.ir

Archive of SID

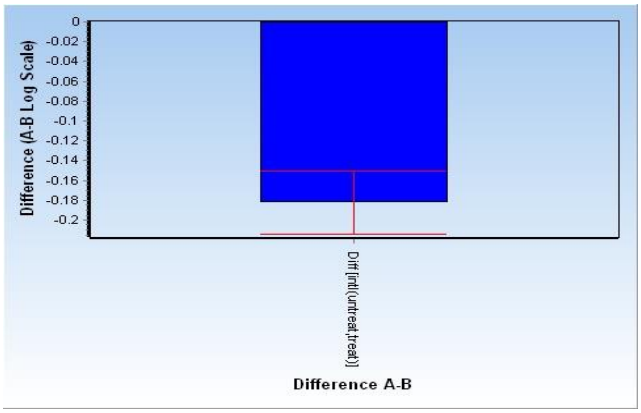
Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 9:12 IRST on Sunday February 21st 2021



شکل ۳- نتایج آزمون M-PCR از چپ به راست : Ladder 100bp – کنترل مثبت+ کنترل منفی- ژنهای *Int I Int II Int III* قابل مشاهده است.

جدول ٤- فراوانی ژن های اینتگرون در ایزوله های *سالمونلا تیفی موریوم*

ژن	فراوانی	درصد
Int I	۱۲	٪۱۰۰
IntII	۰	۰
IntIII	۰	۰



شکل ٤- نمودار تغییرات Fold change

حالی که انحراف معیار بزرگ بیانگر پراکندگی قابل توجه داده‌ها می‌باشد. ردیف Confidence Level بیانگر ضریب اطمینان آماری می‌باشد که با ضریب اطمینان ٪۹۵ محاسبه شده است.

بحث

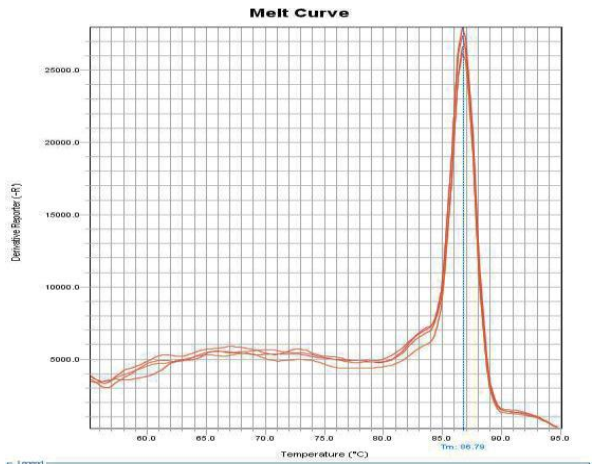
امروزه کنترل بهداشت مواد غذایی در جوامع بشری از اهمیت ویژه ای برخوردار می‌باشدکه همواره شیوع بیماری های ناشی از مصرف مواد غذایی آلوده یکی از مشکلات مهم به ویژه در جوامع دارای سطح بهداشت پایین تر تلقی می گردد. *سالمونلاها* باسیلهای گرم منفی هستند که از طریق آب و مواد غذایی به انسان منتقل و باعث بروز مسمومیت های غذایی، سپتی سمی و تب روده‌ای (حصبه یا تیفوئید) می‌گردند. این ارگانیسم یکی از شایع ترین پاتوژن‌های قابل انتقال از حیوانات به انسان می‌باشد. گاستروانتریت شایع ترین و متداول ترین عفونت *سالمونلایی* است که توسط این سروتیپ‌ها ایجاد می‌گردد (۲۰، ۲۱).

بروز مقاومت آنتی بیوتیکی هم اکنون به مشکلی رو به گسترش در میان گونه های *سالمونلا* تبدیل شده و

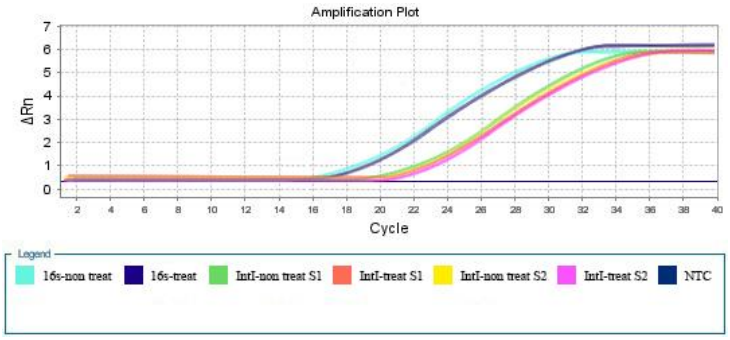
www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 9:12 IRST on Sunday February 21st 2021



شکل ۵- منحنی ذوب بدست آمده از تست Real-Time-PCR



شکل ۶- نتایج منحنی تکثیر Real Time PC

جدول ۵- جدول نتایج تست t.test

	intI (untreat)	intI (treat)	Diff [intI (untreat,treat)
Sample1	۳/۰۶۵	۳/۲۴۵	-۰/۱۸
Sample 2	۳/۳۹۵	۳/۵۸	-۰/۱۸۵
count	۲	۲	۲
Mean	۳/۲۳	۳/۴۱	-۰/۱۸۲
STDEV	۰/۲۳۳	۰/۲۳۶	۰/۰۰۳
P-Value			۰/۰۰۸
Confidence Level(CI)			٪۹۵
Difference (A-B log scale)			-۰/۱۸۲
Fold Change			-۱/۱۳

معضلات بهداشتی و پزشکی رو به افزایشی را در کنترل و درمان عفونت های حاصل از ایـن بـاکتری بـه وجـود آورده است . بدین جهت بررسی الگـوی مقاومـت آنتـی بیوتیکی و همچنین بررسی اثرات عوامل ضـد میکروبـی مختلف از جمله پروبیوتیک ها در نمونه هـای *سـالمونلا* حامل ژن‌هـای حـدت بسـیار حـائز اهمیـت مـی‌باشـد. آزمایش های سریع و قابـل اعتمـاد در آزمایشـگاه هـای تشخیص پزشکی ، دامپزشکی و صنایع غذایی به منظور تشـخیص *سـالمونلاها* امـری مهـم و ضـروری بـه نظـر می‌رسد (۴). روش های متـداول جداسـازی *سـالمونلاها* امری پر زحمت بوده و حداقل به ۳ روز وقـت نیـاز دارد. امروزه سعی بر این اسـت کـه از روش‌هـای سـریع، امـا حساس و با ویژگی بالا اسـتفاده گـردد. در حـال حاضـر توسعه روش‌های زیست شناسی مولکولی ایـن امکـان را فراهم ساخته است که بتوان با ایـن روش‌هـا بـا دقـت و سرعت زیـاد بـه شناسـایی عوامـل بیولوژیـک پرداخـت (۲۲).

حیدری و همکاران در سال ۱۳۹۰، در پژوهشی جهت

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 9:12 IRST on Sunday February 21st 2021

بررسی اثرات پروبیوتیک های *لاکتوباسیل اسیدوفیل و بیفیدوباکتریوم بیفیدیوم* بر تغییر بیان ژن گروهی از ژن‌ها در شهر دامغان پرداختند که مشخص شد *پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم* تغییرات معنی داری نسبت به *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* ایجاد کرده و در بیان ژن‌های موثردر کلون تاثیرگذار تر بوده در حالی که در بافت کبد هر دو پروبیوتیک تاثیرگذار بودند که با تحقیق حاضر هم خوانی دارد و مطابق است (۲۳).

ضیغمی و همکاران در سال ۱۳۹۲ در مقاله‌ای تحت عنوان *اینتگرون ها* و نقش آن ها در بروز مقاومت آنتی بیوتیک در شهر زنجان پرداختند و با بررسی کامل *اینتگرون های کلاس I , II , III* ، سوپر اینتگرون‌ها و کاست‌های ژنی و شرح کامل نقش اینتگرون ها در انتقال مقاومت های آنتی بیوتیکی، اهمیت مطالعه و شناسایی آنها جهت اجرای برنامه های کنترل عفونت و ممانعت از انتشار سویه های مقاوم را مطرح کردند (۲۴).

David G. White و همکاران ۲۰۰۳، جدایه سالمونلا به دست آمده از خوک بیمار از نظر ژنتیکی برای بررسی حضور مکانیسم های ویژه مقاومت ضد میکروبی مشخص شدند. ۲۰ نمونه از این جدایه ها به عنوان سویه های *S. Typhimurium* شناخته شده و تمام سویه ها شامل اینتگرون *I, II* کروموزومی بودند که این دو *اینتگرون* به ترتیب مقاومت به استرپتومایسین و آمپی سیلین را رمزگذاری می‌کنند. این تحقیق نشان می دهد که اینتگرون ها به مقاومت ضد میکروبی در میان سروتیپ‌های *سالمونلا* کمک می کنند. با این حال، آن‌ها به عنوان گسترده در میان سروتیپ *سالمونلا* غیر *تیفی موریوم* نیز همانطور که قبلاً تصور می‌شد حضور دارند (۲۵).

منصوری نژند و همکاران در سال ۱۳۹۱ در کرمان ۱۵ نمونه *سالمونلا انتریتیدیس* از سطح بیمارستان های ۱۵ جدایه از مرغداری های استان کرمان مورد بررسی قرارگرفت جدایه ها پس از تایید در دمای ۳۰ درجه در محیط مایع لوریا برتانی براث به همراه ۳۰ درصد گلیسرول نگه داری شدند آزمایش PCR برای بررسی حضور *اینتگرون کلاس* یک جدایه ها انجام شد ۳۰ جدایه جدا شد که ۲۳ جدایه دارای *اینتگرون کلاس* ۱ بودند ۸ جدایه از طیور و ۱۵ جدایه از انسان مثبت بود. فراوانی بالای حاملان *اینتگرون* مثبت در بین *سالمونلا انتریتیدیس* انسان و طیور را نشان می دهد و این قضیه می تواند به علت درصد بالای *سالمونلا* های مقاوم چندین آنتی بیوتیک باشد (۲۶) در تحقیق حاضر نیز فراوانی بیشتر *اینتگرون I* نسبت به سایر ژن ها مشهود بود.

Thobeka P. Mthembu و همکاران ۲۰۱۹، در مجموع ۳۶۱ نمونه به طور تصادفی از حیوانات مختلف جمع آوری شد. گونه *سالمونلا* با استفاده از روش های میکروبیولوژیکی و مولکولی DNA جدا شده و شناسایی شدند. ۲۹ سویه (۳۰/۲ درصد) سالمونلا ها که متعلق به گونه سالمونلا انتریکا بودند ، ژن‌های حدت که از *سالمونلا* مرتبط مورد بررسی قرار گرفتند ، *شامل invA، iroB، spiC، pipD و int1 بودند*. از نظر آماری ارتباط معنی داری بین ژن‌های حدت ، محل نمونه گیری ، میزبان حیوانات و همچنین فصلی که نمونه ها جمع آوری شد، علاوه بر این، بین اکثر ژن‌های حدت مورد بررسی ، همبستگی مثبت و معنادار مشاهده شد. یکی از مطالعات اخیر برای کشف و بررسی گونه های *سالمونلا* مرتبط با دام بود که خطرات بالقوه بیماری‌زایی *سالمونلا ها* و به ویژه انتقال بیماری های ناشی از غذا آلوده به *سالمونلا* را با استفاده از رویکرد جهانی نشان داد (۶).

صفری و همکاران در سال ۱۳۹۴، در مطالعه ای توصیفی_مقطعی بر روی ۱۰۰ ایزوله *استافیلوکوک اورئوس* مقاوم به متیسیلین با روش Real time PCR پرداختند پس از کشت ،ایزوله ها با تست های بیوشیمیایی مختلف تایید شدند سپس آزمون PCR برای ژن *mec* جهت تایید ایزوله ها و در نهایت شناسایی *اینتگرون های I،II* و کاست های ژنی بر روی ایزوله های *mecA* صورت گرفت. از ۱۰۰ ایزوله ۴۱ ایزوله مولد ژن *mecA* شدند ۳۸ و ۳ ایزوله به ترتیب مولد *اینتگرون کلاس I و II* بودند (۱۸).

همانند مطالعه Santos و Park و همکارانش۲۰۰۸ که نشان دادند روش PCR تکنیکی مناسب جهت شناسایی سالمونلاها در مواد غذایی به خصوص شیر و مرغ است (۲۷)، این مطالعه نیز نشان داد که تاثیر پروبیوتیک *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* بر بیان ژن اینتگرین با بررسی توسط تکنیک Real time PCR در مقایسه با سایر روشها ثربخشی بهتری دارد.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 9:12 IRST on Sunday February 21st 2021

نتیجه‌گیری

نتیجه آنکه در این مطالعه به شناسایی ژن حدت *اینتگرون سالمونلا تیفی موریوم* جدا شده از موارد بالینی تحت تاثیر *پروبیوتیک بیفیدوم* با تکنیک Real time PCR پرداخته شد. از تعداد ۱۳۸ نمونه موادغذایی ۱۲ سویه *سالمونلا* جداسازی شد که همگی واجد ژن *اینتگرون I* بودند. و اثر ماده ضد میکروبی بر بیان ژن تاثیر گذار بوده و بر اساس تحقیقات صورت گرفته در این مطالعه میزان Fold Change برای ژن *intI* برابر ۱/۱۳- که بیانگر این است که این ژن در گروه تیمار شده نسبت به گروه غیر تیمار شده ۱/۱۳ برابر کاهش یافته است. که بیانگر کاهش بیان و اثر مهاری نسبی *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* و کاهش ۱/۱۳ درصدی بیان ژن مذکور تحت تاثیر تیمار با پروبیوتیک است. در واقع درمان ترکیبی پروبیوتیک *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* با داروهای ضد میکروبی رایج ، اثرات ضد باکتری خوبی را علیه گونه های *سالمونلا* نشان می‌دهند و میزان افزایش رشد باکتری وابسته به غلظت پروبیوتیک بود. نتیجتا پرویوتیک با حداقل دوز مصرفی می تواند جایگزین مناسبی برای درمان تک دارویی عفونت های *سالمونلا*، همراه با مزایایی مانند جلوگیری از بروز اثرات نامناسب در مراحل درمان، صرفه جویی در مصرف دارو و کاهش هزینه ها است.

تقدیر و تشکر

این مقاله که استخراج از پایان نامه کارشناسی ارشد با کد ۹۸۰۰۴۵۹۸۷۳۶۱ بوده حاصل فعالیت آزمایشگاهی میکروبیولوژی است. بدینوسیله از کلیه عزیزانی که در انجام این فعالیت علمی راهنمایی مفید و ارزنده داشتند قدردانی و تشکر می‌گردد.

References

1. Ahmadi M, Dalirnaghadeh B, Aski HS, Khoshbakht R. Comparison of polymerase chain reaction (PCR) and conventional cultivation methods for detection of carriers of Salmonella spp. in cattle and buffalo. Comp Clin Path. 2010;19(3):251-5.

2. Nielsen LR. Review of pathogenesis and diagnostic methods of immediate relevance for epidemiology and control of Salmonella Dublin in cattle. Vet Microbiol. 2013;162(1):1-9.

3.Maciel B, Dias J, Romano C, Sriranganathan N, Brendel M, Rezende R .Detection of Salmonella Enteritidis in asymptomatic carrier animals: comparison of quantitative real-time PCR and bacteriological culture methods. Genet Mol Res. 2011;10(4):2578-88.

4.Ranjbar, Mirzaei, Fard P, Noorkhoda, Jafari J, Allah N. Molecular typing of clinical isolates of Salmonella infantis isolated in Tehran. J Mil Med Pac. 2014; 16 (1): 17-22.

5.Race A, Dream, Amini. Evaluation of antibiotic resistance pattern and expression of pathogenic genes of mgtC, spi4R, agfA, invE / A and ttrC in Salmonella infantis isolated from clinical specimens. Feiz-Kashan Univ Med Sci. 2017; 21 (5): 443-9.

6.Mthembu TP, Zishiri OT, El Zowalaty ME. Detection and Molecular Identification of Salmonella Virulence Genes in Livestock Production Systems in South Africa. Pathogens. 2019;8(3):124.

7.Almeida F, Pitondo-Silva A, Oliveira MA, Falcão JP. Molecular epidemiology and virulence markers of Salmonella Infantis isolated over 25 years in São Paulo State, Brazil. Infect Gen Evol. 2013;19:145-51.

8.Jin Y, Ling J. Prevalence of integrons in antibiotic-resistant Salmonella spp. in Hong Kong. Jpn J Infect Dis. 2009;62(6):432-9.

9.Eid HMI. Rapid detection of salmonella in dairy cows using polymerase chain reaction. Am J Sci. 2010;6(10).

10.Boucher Y, Labbate M, Koenig JE, Stokes H. Integrons: mobilizable platforms that promote genetic diversity in bacteria. Trends Microbiol. 2007;15(7):301-9.

11.Hall LJ, Clare S, Pickard D, Clark SO, Kelly DL, El Ghany MA, et al. Characterisation of a live Salmonella vaccine stably expressing the Mycobacterium tuberculosis Ag85B–ESAT6 fusion protein. Vaccine. 2009;27(49):6894-904.

12.Silva FV, Gibbs PA. Thermal pasteurization requirements for the inactivation of Salmonella in foods. Food Res Int. 2012;45)2:(695-9.

13.Silva A, Barbosa F, Duarte R, Vieira L, Arantes R, Nicoli J. Effect of Bifidobacterium longum ingestion on experimental salmonellosis in mice. J Appl Microbiol. 2004;97(1):29-37.

14.Kerry RG, Patra JK, Gouda S, Park Y ,Shin H-S, Das G. Benefaction of probiotics for human health: A review. J Food Drug Anal. 2018;26(3):927-39.

15.Firoozeh F, Zahraei-Salehi T, Shahcheraghi F, Karimi V, Aslani MM. Characterization of class I integrons among Salmonella enterica serovar Enteritidis isolated from humans and poultry. FEMS Immunol Med Microbiol. 2012;64(2):237-43.

16.Mahon CR, Lehman DC, Manuselis G. Textbook of diagnostic microbiology-e-book: Elsevier Health Sciences; 2018.

17.Soumet C, Ermel G ,Rose N, Rose V, Drouin P, Salvat G, et al. Evaluation of a multiplex PCR assay

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 9:12 IRST on Sunday February 21st 2021

for simultaneous identification of Salmonella sp., Salmonella Enteritidis and Salmonella Typhimurium from environmental swabs of poultry houses. Lett Appl Microbiol. 1999; 28 (2): 113-7.

18.Safari, Nasim, Alikhani, Yousef M., Ahmadi H, Saudi Arabian. Prevalence of class I and II integrons in methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates isolated from Hamadan hospitals. Qom Univ Med Sci J. 2017; 11 (3): 57-65.

19.Hirschhorn N, Pierce N, Kobari K, Carpenter C, McLaughlin J, DePola BC. SK Bhattacharya and D Sur, National Institute of Cholera and Enteric Diseases, Kolkata, India. Public Health and Infect Dis. 2010;353:141.

20.Carrique-Mas J, Davies R. Sampling and bacteriological detection of Salmonella in poultry and poultry premises: a review. Revue Sci Technique. 2008;27(3):665.

21.Aldridge P, Gnerer J, Karlinsey JE, Hughes KT. Transcriptional and translational control of the Salmonella fliC gene. J Bacteriol. 2006;188(12):4487-96.

22.Mercedeh F, Mohammad H, Mohammad R, Mona M, Hossein D, Mohammad Reza Z. Frequency of CTX-M Type-Beta Lactams in Clinical Salmonella Strains Isolated in Tehran.

23.Nasr Abadi H, Ebrahimi Ta, Bahrami, Hoda. Evaluation of Colonization Ability of Lactobacilli Isolated from Local Cheese and Binding to Human Gastrointestinal Caco Epithelial Cells, Cell Biology 2. Animal. 2010; 1(4): 27-31.

24.Zeigami, Habib, Haghighi, Fakhri, Ahmadi H. Integrons and their role in the emergence of antibiotic resistance. Lab Diagnos. 2014; 5(22): 61-71.

25.White DG, Zhao S, Simjee S, Wagner DD, McDermott PF. Antimicrobial resistance of foodborne pathogens. Microbes Infect. 2002;4(4):405-12.

26.Amini 2 Lamps. Frequency of Class I Integran Gene in Salmonella enteritidis in Isolated Human and Poultry Specimens in Kerman Province. Vet Lab Res. 2012; 4 (1): 236.

27.Santos LRd, Nascimento VPd, Oliveira SDd, Flores ML, Pontes AP, Ribeiro AR, et al. Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of Salmonella in artificially inoculated chicken meat. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 2001;43(5):247-50.

www.SID.ir