ازدیاد و تکثیر ژن *invA* سالمونلاها به وسیله PCR بعنوان یک روش تشخیصی این باکتریها

دکتر تقی زهرایی صالحی[1]* دکتر محمد رضا محزونیه[2] دکترعلی اشرفی[3]

دریافت مقاله: ۲۲ تیرماه ۱۳۸۳
پذیرش نهایی: ۲۶ تیرماه ۱۳۸۴

هدف: تعیین ژن تهاجم سالمونلاها با روش PCR.

طرح: مطالعه‌آزمایشگاهی.

روش: تعداد ۶۰ نمونه سالمونلای جداشده از منابع مختلف انسانی و دامی ابتدا با آزمایشات بیوشیمیایی، مورد تأیید قرارگرفتند وسپس گروه سرمی این نمونه‌ها به وسیله آنتی سرم‌های پلی والان و مونو والان تشخیصی معین گردید. برای استخراج DNA آنها از روش جوشاندن استفاده گردید. از دو پرایمر اختصاصی S139 و S141 مطابق برنامه خاصی برای تکثیر ژن *invA* استفاده گردید وسپس محصول PCR به وسیله الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۲ درصد مورد بررسی قرارگرفت.

نتایج: تمام شصت نمونه سالمونلا درآزمایش PCR از نظر ژن *invA* مثبت شدند و باند ۲۸۴ باز نوکلئوتیدی مربوط به ژن فوق را ایجاد کردند که معادل باند ایجادشده در موردشاهدهای مثبت (سویه استانداردسالمونلا) وباند مشخص مارکر DNA بود.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج بدست‌آمده این روش برای تشخیص سالمونلاها، روش بسیار مؤثر ومناسبی است به طوری که می‌توان در کمتر از ۱۲ساعت در مورد نمونه‌های مشکوک به‌سالمونلا اظهار نظر نمود. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، ۱۳۸۵، دوره ۶۱، شماره ۲، ۱۹۹-۱۹۵.

واژه‌های کلیدی: سالمونلا، ژن *invA*، PCR.

سالمونلوز از جمله بیماری‌های عفونی بسیار مهم و مشترک بین انسان و دام می‌باشد که همه ساله افراد زیادی را در جمعیت‌های انسانی و دامی مبتلا می‌سازد. در حال حاضر بیش از ۲۵۵۰ سروتیپ در جنس سالمونلا وجود دارد که از میان این سروتیپ‌ها سالمونلا تیفی موریوم به دلیل طیف میزبانی وسیع و انتشار جهانی از اهمیت خاصی برخوردار می‌باشد. سروتیپ‌های سالمونلا از علل مهم بیماری‌ها، با منشاء غذایی در جهان می‌باشند به طوریکه حتی در کشورهای پیشرفته که از استانداردهای بالای بهداشتی برخوردار هستند، سالمونلاها از عوامل مهم مسمومیت‌های غذایی محسوب می‌شود (۵).

در مطالعه‌ای که توسط WHO در سال ۲۰۰۰ در کشور آلمان انجام گرفت نشان داد که ۸۵/۵ درصد از علل شیوع مسمومیت‌های غذایی در بین سال‌های ۱۹۹۳ تا ۱۹۹۸ در این کشور سالمونلایی بوده است.

از سوی دیگر وجود حاملین چه در انسان و چه در حیوانات، جایگاه ویژه‌ای در اپیدمیولوژی این بیماری پیدا کرده است که معمولاً تشخیص و شناسایی آنها با روش‌های معمول آزمایشگاهی مشکل می‌باشد (۶).

۱) گروه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، ایران - تهران.
۲) استادیار دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد، شهرکرد - ایران.
۳) دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.
*) نویسنده مسؤول: tzahraei2000@yahoo.com

Amplification of *invA* Gene of Salmonalla by Polymerase Chain Reaction(PCR) as a Specific Method for Detection of Salmonellae

Zahraei - Salehi, T.[1], Mahzoniae, M. R.[2], Ashrafi,A.[3]

[1]Department of Microbiology & Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran - Iran. [2]Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Shar-e-kord. [3]Gratuated from the Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran -Iran.

Objective: To Detect *invA* gene in Salmonella serotypes by PCR.

Samples: Sixty *Salmonella strains* were isolated from animals and human sources.

Procedure: In this research, 60 isolated *Salmonella* from animals and human were tested by biochemical tests (such as carbohydrate utilization and urease) and then were serogrouped by *Salmonella* O *antisera*.The DNA of isolated *Salmonella* were extracted by Holmes and Quigley method. Two primers (St_{139} and St_{141}) and PCR reagents were used for amplication of *invA* gene. PCR reaction was carried out in Master cycler. The PCR products were loaded into 1.2% agarose gel and electrophoresed for 60 minutes at 120 V.

Results: All isolates showed biochemical properties of *Salmonella*e. In PCR assay, target gene (*invA* gene) with 284bp size were observed in all of strains, which is corresponded with size of positive control and DNA marker. So in this survey all strains had *invA* gene.

Conclution: Acorrding to the results of this study PCR method based on *invA* gene is useful for rapid identification of *Salmonella* serotypes. ***J.Fac.Vet.Med. Univ. Tehran. 61,2:195-199,2006.***

Keyword: salmonella, *invA* gene, PCR.

Corresponding author's email:tzahraei@vetmed.ut.ac.ir

Galan و همکاران در سال ۱۹۹۲ خواص فعالیتی و مولکولی ژن تهاجم سالمونلا را مورد بررسی قرار دادند. نامبردگان نشان دادند که سویه‌های وحشی سالمونلا تیفی موریوم سریعتر از سویه‌های موتان آن وارد سلول می‌شوند و همچنین جایگاه ژنتیکی ژن *invA* را روی کروموزوم سالمونلا مشخص کردند(۲). Lin و همکاران در سال ۱۹۹۹ روش PCR را برای تشخیص اختصاصی سالمونلا تیفی موریوم در نمونه‌های مدفوع و مواد غذایی به کار بردند و نتیجه گیری نمودند که سیستم PCRشرح داده شده توسط آنها برای جداکردن سالمونلا تیفی موریوم در نمونه‌های مدفوع، شیر

جدول شماره ۱- برنامه دستگاه ترموسایکلر که در تکثیر ژن invA سالمونلاها در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت.

مرحله	ساخت پایانی	تعداد سیکل	ساخت	اتصال	واسرشت	واسرشت اولیه
دما (°C)	۷۲	۳۵	۷۲	۶۴	۹۴	۹۴
زمان	۷ دقیقه		۳۰ ثانیه	۳۰ ثانیه	۱ دقیقه	۵ دقیقه

و گوشت خام به عنوان روش مناسب و مؤثری برای تشخیص سریع پاتوژن فوق می‌باشد (۵).

روش‌های متداول آزمایشگاهی هنوز هم در بیشتر آزمایشگاهها روش معمول برای تشخیص سالمونلاها در نمونه‌های بالینی و غذایی می‌باشند ولی به علت نیاز به تأییدات بیوشیمیایی و سرولوژی تشخیص نهایی باکتری جدا شده تقریباً ۴ تا ۵ روز به طول می‌انجامد. بنابراین استفاده از روش‌های سریع و دقیق برای جستجوی این جرم بسیار حائز اهمیت خواهد بود که یکی از این روشها که در چندین سال اخیر معرفی شده و کاربردهای بسیاری پیدا کرده است روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) می‌باشد که روش بسیار حساسی است به طوریکه توانایی تکثیر DNA را در حد پیکوگرم (10^{-12}) دارا می‌باشد(۳،۶،۷). در این تحقیق نیز با روش PCR، ژن *invA* که ژن مؤثر در حمله وری و تهاجم سالمونلاها می‌باشد، به عنوان ژن هدف در این باکتریها مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش کار

در این تحقیق تعداد شصت سویه سالمونلا جدا شده در طی سالیان مختلف از مدفوع دامها، آب، مواد غذایی، لاک پشت، گوسفند درگروه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران و دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌ها به صورت خطی روی محیط مک کانکی و سپس روی محیط TSI کشت داده شدند. برای انجام عمل PCR باکتری را از محیط TSI در محیط آبگوشت لوریا کشت داده و به مدت ۲۴ ساعت در گرم خانه ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد.

مراحل انجام PCR روی نمونه ها

۱- استخراج DNA: در این تحقیق برای جداسازی DNA باکتری از دو روش استفاده از کیت ساخت شرکت Qiagen و جوشاندن به روش Holmes و Quiqley استفاده گردید که به علت سادگی، کم هزینه بودن و صرفه جویی در وقت در اکثر موارد از روش جوشاندن استفاده شد چرا که نتایج به دست آمده در هر دو روش تفاوت چندانی با هم نداشتند. در روش جوشاندن ۵۰۰ میکرولیتر از محیط آبگوشت لوریا را در تیوب‌های ۱/۵ سی سی اپندرف ریخته و به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شد. سپس تیوب‌ها در شش هزار دور به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ گردید تا DNA روی محلول قرار گیرد (که این محلول رویی کمی حالت روغنی دارد)(۴). در این تحقیق برای انجام PCR از این مایع رویی که حاوی DNA است به میزان ۱/۵ میکرولیتر استفاده گردید. در این مطالعه از سوش شماره ۱۱۰ (سالمونلا تیفی موریوم) و همچنین سوش شماره ۶۰۹

جدول۲- نحوه محاسبه مواد مورد نیاز برای ۱۳ نمونه مورد آزمایش با احتساب یک نمونه اضافی در این تحقیق برای تعیین ژن invA در سالمونلاها.

مخلوط مواد PCR	مقدار مواد برای یک نمونه (µl)	مقدار مواد با احتساب یک نمونه اضافی (µl)
۱- آب دوبار تقطیر و غیر یونیزه	۱۶/۶۵	۲۳۳/۱
۲- بافر PCR (۱۰x)	۲/۵	۳۵
۳- کلرید منیزیم ۵۰ میلی مولار	۱/۶	۲۲/۴
۴- مخلوط داکسی نوکلئوزید تری فسفات ۱۰ میلی مولار	۱/۲۵	۱۷/۵
۵- پرایمر S139	۰/۵	۷
۶- پرایمر S141	۰/۵	۷
۷- DNA پلیمراز	۰/۵	۷
۸- DNA نمونه	۱/۵	-
حجم کلی بر حسب µl	۲۵	۳۲۹

(سالمونلا دابلین) که در گنجینه باکتریایی گروه میکروبیولوژی نگهداری می‌شدند، به عنوان شاهد مثبت استفاده شد. این سروتیپ‌ها پس از تأیید مجدد از نظر بیوشیمیایی و سرولوژی مورد استفاده قرار گرفت.

در هر بار آزمایش PCR از آب دوبار تقطیر غیر یونیزه به عنوان کنترل منفی استفاده شد. بدین ترتیب که همه عملیاتی که روی نمونه‌ها و کنترل مثبت انجام می‌شد بر روی شاهد منفی نیز انجام می‌گرفت. علاوه بر شاهد منفی که برای کنترل مراحل استخراج صحیح DNA و انجام PCR و تأیید عدم آلودگی در حین کار مورد استفاده قرار گرفت از سویه O2K12 کلی باسیل نیز به عنوان باکتری شاهد منفی استفاده شد. برای کنترل و تأیید عدم آلودگی مواد مورد استفاده در واکنش PCR، از این مواد نیز شاهدی با عنوان کنترل PCR (بدون اضافه کردن DNA استخراج شده) در هر بار آزمایش استفاده گردید.

۲- پرایمرها: برای تشخیص ژن *invA* در سالمونلاها از پرایمرهای S_{139} و S_{141} استفاده شد که این پرایمرها از شرکت Fermentas تهیه شدند که ردیف بازهای آنها به شرح زیر می‌باشد

S_{139}	5'- GTG AAA TTA TCG CCA CGT TCG GGC AA-3'
S_{141}	5'- TCA TCG CAC CGT CAA AGG AAC C-3'

طرز رقیق کردن پرایمرها: پرایمرها معمولاً به صورت استوک و با غلظت مشخصی ارائه می‌شوند. بنابراین برای استفاده از آنها در واکنش PCR بایستی به وسیله آب مقطر دو بار تقطیر غیر یونیزه رقیق شوند. برای رقیق کردن بایستی OD پرایمر مشخص باشد که این اطلاعات معمولاً همراه پرایمر ارائه می‌شود. در این تحقیق از فرمول C1V1=C2V2 برای رقیق کردن پرایمرها استفاده و OD نهایی هر پرایمر برابر ۰/۰۵ محاسبه گردید.

برنامه سیکل حرارتی جهت تکثیر ژن *invA* در دستگاه ترموسایکلر:

جدول ۳- نتایج PCR و گروه بندی سرمی سالمونلای جداشده در این مطالعه.

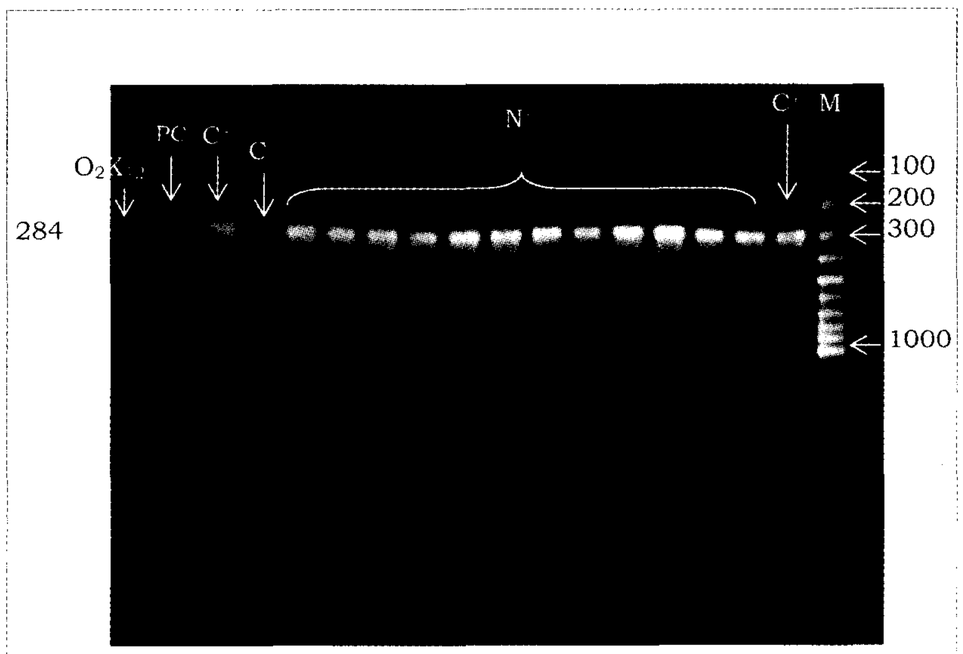
گروه سرمی	تعداد نمونه	درصد	PCR	اندازه باند
B	۲۳	۳۸/۳۳	+	۲۸۴bp
C	۹	۱۵	+	۲۸۴bp
D	۲۸	۴۶/۶۷	+	۲۸۴bp
مجموع	۶۰	۱۰۰	+	۲۸۴bp

برنامه مورد استفاده در این مطالعه جهت تکثیر ژن *invA* سالمونلاها در جدول یک آورده شده است. در این برنامه از مرحله دوم یعنی واسرشت تا مرحله چهارم (ساخت) به تعداد ۳۵ سیکل تکرار گردیده است (۳).

۴- آماده کردن مخلوط اصلی: جهت یکنواخت کردن شرایط آزمایش و به دلیل کاهش دفعات استفاده از سمپلر و باز و بسته کردن در تیوب‌ها و جلوگیری از انتقال آلودگی مخلوط PCR (Mix (PCR با توجه به حجم واکنش ۲۵ میکرولیتر برای هر نمونه، برای نمونه‌های مورد آزمایش در هر روز تهیه می شد. بدین ترتیب که برای مشخص کردن حجم واکنش، تعداد نمونه‌ها را با احتساب شاهد مثبت، منفی و PCR در نظر گرفته و حجم مجموع آنها، با احتساب یک نمونه بیشتر برای تهیه مخلوط PCR محاسبه می‌گردید. در این تحقیق مخلوط PCR به عنوان مثال برای سیزده نمونه با احتساب یک نمونه بیشتر مطابق جدول ۲ تهیه گردید.

پس از محاسبه مقادیر، مواد را به ترتیب جدول ۲ در داخل تیوب ۰/۵ سی سی (به غیر از DNA الگو) ریخته و مخلوط PCR تهیه می‌شد. تیوب‌ها را به مدت چند ثانیه در سرعت خیلی پایین ورتکس کرده تا مواد بخوبی با هم مخلوط شوند. سپس از تیوب حاوی محلول Mix PCR به میزان ۲۳/۵ میکرولیتر در تیوب‌های ۰/۲ سی سی که قبلاً شماره نمونه‌ها روی در پوش آنها نوشته شده بود، ریخته و از DNA مربوط به هر نمونه به میزان ۱/۵ میکرولیتر به تیوب‌های مربوط اضافه شد. در نهایت لوله‌ها در دستگاه ترموسیکلر قرار داده می‌شد.

نحوه الکتروفورز فرآورده‌های PCR: قبل از انجام الکتروفورز محلول‌های مورد نیاز (بافر x0.5، TBE 5x و EDTA 0.5 مولار)، ژل آگارز و محلول اتیدیوم بروماید جهت رنگ آمیزی، آماده گردیدند. درصد ژل مورد استفاده در این تحقیق ۲-۱/۲ درصد بود. پس از آماده شدن ژل، سینی ژل را در جای مخصوص آن در تانک قرار داده و تانک به وسیله بافر TBE پر می‌شد به طوری که ۳-۲ میلیمتر از بافر روی ژل را هم می‌پوشاند. فرآورده‌های PCR را به نسبت ۵ به یک با Loading buffer ساخت شرکت فرمنتاس مخلوط کرده و به داخل گوده‌ها انتقال داده می‌شد که البته بسته به نوع شانه مقدار متفاوت بود. به میزان ۵ میکرولیتر نیز از مارکر ۱۰۰ جفت بازی در گوده اول ریخته می‌شد. در این تحقیق از ولتاژ ۱۲۰ ولت و تواتر ۷۴ آمپر برای الکتروفورز استفاده شد. بعد از حدود ۶۰-۵۰ دقیقه و هنگامی‌که رنگ مربوط به buffer Loading دو سوم از طول ژل را پیمود برق سیستم را قطع کرده و ژل برای رنگ آمیزی در داخل محلول اتیدیوم بروماید به مدت ۲۰-۱۰ دقیقه (بسته به



تصویر ۱- تصویر قطعه ۲۸۴ جفت بازی ژن invA در سالمونلاهای مورد مطالعه همراه با شاهدهای مثبت و منفی.

M= مارکر ، C_1^+= سالمونلا تیفی موریوم (۱۱۰)، C^-= آب دوبار تقطیر غیریونیزه (شاهد منفی)، N^+= نمونه‌ها، O2K12= باکتری شاهد منفی، PC= PCR control ، C^+= سالمونلا دابلین (۶۰۹).

درصد ژل و کهنه و تازه بودن رنگ) قرار می‌گرفت و پس از آن ژل را با آب شستشو و سپس آن را بر روی دستگاه ترانس UV ایلومیناتور قرار داده و توسط دوربین مخصوص و چاپگر عکس ژل را تهیه و نتایج بررسی می‌گردید.

نتایج

در آزمایش سروتایپینگ با آنتی سرم‌های منو و پلی والان تشخیصی، بیست و سه مورد از سالمونلاهای در گروه B، نه مورد در گروه C و بیست وهشت مورد در گروه D جدول کافمن و وایت قرار داشتند. با توجه با اینکه این گروهها شامل اکثر سروتیپ‌های بیماریزا در انسان و حیوانات می‌باشند و همین طور از فراوردههای غذایی با منشا. دامی به وفور جدا می‌شوند برای تعیین حضور ژن *invA* انتخاب گردیدند. در آزمایش PCR همه شصت سویه سالمونلا متعلق به سه گروه سرمی مختلف فوق حاوی قطعه ۲۸۴ جفت بازی ژن تهاجم (*invA*) بودند (جدول ۳) که مشابه قطعه ۲۸۴ جفت بازی این ژن در سالمونلاهای شاهد مثبت (سالمونلا تیفی موریوم و دابلین) بود. در مورد اشریشیا کلی O_2K_{12} (باکتری شاهد منفی)، شاهد منفی نمونه‌ها و شاهد PCR باندی مشاهده نشد (تصویر ۱).

بحث

Rhan و همکاران در سال ۱۹۹۲ روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز را برای ژن *invA* به کار بردند و عنوان نمودند که این روش برای تشخیص سالمونلاها از جمله سالمونلا تیفی موریوم یک روش اختصاصی می‌باشد (۸).

Chiu و همکاران در سال ۱۹۹۶، از ژن‌های حدت *invA* و spvC به روش واکنش زنجیره‌ای چند گانه‌ای (Multiplex PCR) برای تشخیص سریع سرووارهای سالمونلا درمدفوع استفاده کردند و به این نتیجه رسیدند که مزیت جدا سازی ژن‌های فوق با این روش آن است که در یک زمان می‌توان

سویه‌های دارای پلاسمید حدت را از سویه‌های فاقد آن از هم تشخیص داد(۱).

Malornyو همکاران در سال ۲۰۰۱، پنج نوع پرایمر را برای ارزیابی سویه‌های سالمونلا به کار بردند و از میان آنها دو پرایمر S_{139}/S_{141}و Ra - Malo2-F/Malo2 را برای ادامه کار برگزیدند. با استفاده از دو پرایمر فوق نامبردگان، ۲۲۱ سویه سالمونلا و ۸۵ سویه غیر سالمونلا را تحت آزمایش قرار دادند و عنوان کردند که پرایمر $Malo_2$-F/$Malo_2$-Ra هیچ قطعه غیر اختصاصی تولید نمی‌کند. با تغییر در دمای اتصال (از ۶۰ به ۶۴ درجه سانتیگراد) مشاهده کردند که پرایمر S_{139}/ S_{141}نیز باند غیر اختصاصی کمی تولید می‌کند. در پایان از بین ۲۲۱ محصول تکثیر یافته سویه‌های سالمونلا، ۲۲۰ مورد قطعه مورد انتظار را با هر دو پرایمر ایجاد کردند. یک سویه باقیمانده هم متعلق به سروتیپ *S .saint paul* بود که ۱۵ ایزوله جدا شده این سویه، بین سال‌های ۲۰۰۱- ۱۹۹۸ در آزمایشات مثبت بوداند(۶). Holgerو همکاران درسال۲۰۰۱ ژن *invA* را برای شناسایی اختصاصی سالمونلا تیفی موریوم از اندام‌های داخلی خوک‌هایی که به طور تجربی آلوده شده بودند، استفاده کردند. در این مطالعه ۱۴ نمونه از اندام‌های مختلف خوک‌ها مورد بررسی قرار گرفت. این محققان در پایان به این نتیجه رسیدند که روش PCR ژن *invA* برای جداسازی اختصاصی سا لمونلاها در اندام‌های داخلی خوک‌ها روش مناسب و مؤثری است به شرطی که پیش غنی سازی روی نمونه‌های مشکوک به سا لمونلا انجام گردد(۳). Malornyو همکاران در سال ۲۰۰۳ از چهار پرایمر (P_1/P_2، S_{18}/S_{19}، ST_{11}/ST_{15} و S_{139}/S_{141}) برای استاندارد کردن روشی برای شناسایی سالمونلا استفاده نمودند. در این تحقیق ۴۳ گروه سالمونلا مورد بررسی قرار گرفت. به وسیله پرایمرهای S_{139}/S_{141} همه ۴۳ سروتیپ شناسایی شدند در صورتی که سه پرایمر دیگر در تشخیص و شناسایی یک یا دو سویه سا لمونلا نتواستند مؤثر واقع شوند. بر اساس این اطلاعات پرایمر S_{139}/S_{141} برای آزمایشات اختصاصی و غیر اختصاصی انتخاب شد. به طور کلی با این پرایمر ۱۹۹ سویه سالمونلا و ۷۵ سویه غیر سالمونلا آزمایش گردید که همه سویه‌های سالمونلا به استثنای یکی که متعلق به سروتیپ *S .saint paul* بود، درست تشخیص داده شدند. همچنین ۱۹ سروتیپ دیگر ایزوله‌های saintpaul با این پرایمر به درستی تشخیص داده شدند. در صورتی که Rhan و همکاران گزارش کرده بودند که دو سویه سروتیپ Litchfield و دو سویه سروتیپ Seftenberg به وسیله پرایمر S_{139}/S_{141} مشخص نمی‌شوند. همچنین در این مطالعه نشان داده شد که ژن *invA* برای حمله وری به سلول‌های اپی تلیال در سالمونلاها ضروری است بنابراین عدم حضور این ژن حاکی از آن است که این قبیل سویه‌ها یا فاقد حمله وری هستند و یا مکانیسم حمله وری آنها به صورت تناوبی به کار می‌افتد و با توجه به اطلاعات بالا عنوان نمودند که عدم حضور ژن *invA* در سالمونلاها بعید به نظر می‌رسد و در نهایت به این نتیجه رسیدند که روش PCR ژن *invA* با استفاده از پرایمرهای S_{141}/S_{139} در تشخیص سا لمونلاها بسیار مفید است(۷).

در مطالعه حاضر ۶۰ نمونه سالمونلای جمع آوری شده در گروه میکروبیولوژی جهت تعیین ژن *invA* به وسیله دو پرایمر S_{139}/S_{141} تحت واکنش PCR قرار گرفتند. این نمونه‌ها از گروه‌های سرمی B، C و D بودند که در واکنش PCR همه آنها از نظر ژن *invA* مثبت شدند و باند ۲۸۴ جفت بازی مورد انتظار را ایجاد کردند که معادل باند ایجاد شده در مورد شاهدهای مثبت یعنی سالمونلا تیفی موریوم (گروه B) و دابلین (گروه D) و باند مشخص مارکر DNA بود. با توجه به اینکه نمونه‌ها از چند گروه سرمی انتخاب شده بودند می توان این طور نتیجه گرفت که از PCR ژن *invA* به عنوان یک روش اختصاصی برای تشخیص سروتیپ خاصی از سالمونلا نمی توان استفاده کرد بلکه می توان گفت که این ژن به دلیل آنکه در اکثر سروتیپ‌های جنس سالمونلا وجود دارد می توان با PCR نمونه‌های مشکوک، در صورت مثبت شدن نمونه و ایجاد قطعه ۲۸۴ بازی به یقین عنوان نمود که نمونه مورد نظر از نظر سالمونلا مثبت می‌باشد. نتایج این تحقیق با تحقیقات Holger درسال۲۰۰۱ و Malorny درسال ۲۰۰۳ که قبلا توضیح داده شد مطابقت دارد ولی بر خلاف تحقیق Rhan و همکاران در سال ۱۹۹۲، مشخص گردید که این ژن اختصاصی سالمونلا تیفی موریوم نیست ودر بسیاری از سالمونلاها حضور دارد که این مسئله خود می تواند نکته اساسی در انتخاب این ژن برای جستجوی این باکتریها باشد. در پایان می توان گفت که PCR ژن *invA* به عنوان یک روش بسیار مؤثر و مناسب برای تشخیص سالمونلا هاست که می توان در عرض کمتر از ۱۲ ساعت درباره نمونه مشکوک به سالمونلا اظهار نظر کرد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه تهران و دانشکده دامپزشکی به خاطر تامین اعتبار طرح تحقیقاتی شماره ۶۹۱ / ۶ / ۲۲۱ که این مقاله منتج از آن است تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

1. Chiu, C.H., OU, J.T. (1996) Rapid identification of salmonalla serovars in feces by specific detection of virulence genes, invA and spvC, by an enrichment broth culture- multiplex PCR combination assay. J Clin Microbiol. 34, 10: 2619-2622, 1996.
2. Galan, J.E., Ginocchio, C., Costeas, P. (1992) Molecular and Functional characterization of the salmonella invasion gene InvA: Homology of invA to members of a new protein family. J Bacteriol. 174: 4228-4349, 1992.
3. Holger, C.S., Thorsten, A., Heike, M., Uwe, R., Andreas, H. (2001) Improvement of an invA- based PCR for the specific detection of Salmonella Typhimurium in organs of pigs. Institute of Animal Hygiene and Public Veterinary Health, Veterinary Faculty, Germany, E-mail: Schols@vetmed.uni-Leipzig.de. 585-589, 2001.
4. Holmes, D.S., Quiqley, M. (1981) A rapid boiling method for the preapration of bacterial plasmid. Ann Biochem. 114: 193-197, 1981.
5. Lin, J.S., Tsen, H.Y. (1999) Development and use of polymerase chain reaction for the specific detection of Salmonella Typhimurium in stool and food samples. J Food Protec. 62, 10: 1103-1110, 1999.
6. Malorny, B., Bunge, C., Helmuth, R. (2001) Evaluation of Salmonella spp. specific primer- sets for the validation within the food PCR project. Federal Institute Health protection of consurners snd veterinary medicine, National Reference Laboratory for Salmonella, Diedersdorfer Weg 1, 12277 Berlin, Germany, 2001.
7. Malorny, B., Hoofar, J., Bunge, C., Helmuth, R. (2003) Multicenter validation of the analytical accuracy of Salmonella PCR: to wards an international standard. App Environ Microbiol.69, 1: 290-296, 2003.
8. Rahn, K. De Grandis, S.A., Clarke, R.C., Curtiss, R. and Gyles, C.L. (1992) Amplification of an invA gene sequence of Salmonalla Typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of Salmonella. Mol. Cell. Probes 6: 271-279