



تایپینگ مولکولی جدایه‌های سالمونلا انتریکا سرووار اینفتیس

با استفاده از روش ERIC-PCR

ابوالفضل مقدم (MSc)^۱، شهرام نظریان (PhD)^{۲*}

^۱ گروه سلولی و مولکولی، دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

^۲ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران

(دریافت مقاله: ۹۵/۱۱/۱۳- پذیرش مقاله: ۹۶/۱/۱۷)

چکیده

زمینه: سالمونلاها از باکتری‌های مهم خانواده انتروباکتریاسه بوده که از نظر بیوشیمیایی و سرولوژیک بسیار متنوع می‌باشند و عمدتاً از راه مواد غذایی منتقل می‌شوند. گسترش سالمونلاهای غیر تیفوئیدی یکی از مهم‌ترین موضوعات قابل بررسی در تحقیقات امروزی می‌باشد. بنابراین تشخیص و تایپینگ سریع این بیماری‌زاها اطلاعات مناسبی در ردیابی و کنترل عفونت در اختیار می‌دهد. هدف از مطالعه حاضر تایپینگ سویه‌های بالینی سالمونلا اینفتیس می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش از مراکز درمانی مختلف سویه‌های سالمونلا اینفتیس جداسازی شد. تمامی سویه‌ها با استفاده از روش‌های استاندارد میکروبیولوژی، بیوشیمیایی و مولکولی مورد شناسایی قرار گرفتند. رابطه ژنتیکی سویه‌ها با استفاده از روش ERIC-PCR مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: در این تحقیق از مجموع ۸۴۲ نمونه مدفوع و خون بیماران مبتلا به اسهال، ۴۸ سویه مربوط به سالمونلا اینفتیس جداسازی شد. جدایه‌ها با استفاده از روش ERIC-PCR از نظر ژنوتایپینگ به ۱۴ گروه مختلف دسته‌بندی شدند که بیشترین تعداد سویه در گروه ۱۵ (۲۰ درصد، ۱۰ سویه) جای گرفتند.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که سویه‌های سالمونلا اینفتیس مورد مطالعه از نظر ژنتیکی متنوع بودند که می‌تواند به علت شیوع پلی‌کلونال سویه‌ها در نمونه‌های انسانی باشد. همچنین نشان داده شد که روش ERIC-PCR قدرت تمایزی بالایی را جهت تایپینگ مولکولی دارد.

واژگان کلیدی: سالمونلا اینفتیس، ERIC-PCR، تنوع ژنتیکی، تایپینگ مولکولی

* تهران، گروه زیست‌شناسی، دانشکده و پژوهشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران

مقدمه

سالمونلاها از باکتری‌های مهم خانواده انتروباکتریاسه بوده که از نظر بیوشیمیایی و سرولوژیک بسیار متنوع می‌باشند. سالمونلا در انسان می‌تواند عامل بیماری‌هایی همچون گاستروانتریت، تب روده‌ای تیفوئید و پاراتیفوئید و باکتری می باشد (۱). عفونت‌های سالمونلایی یکی از بیماری‌های مشترک انسان و دام است که هر ساله خسارات عمده‌ای به سرمایه دامی و جامعه انسانی وارد می‌سازد. در حال حاضر بیش از ۲۶۰۰ سروتیپ سالمونلا شناسایی شده که برخی از آنها میزبان‌های اختصاصی نداشته و در انسان و اکثر حیوانات عفونت ایجاد می‌کنند (۲) به طور کلی در یک نوع تقسیم‌بندی، سروتیپ‌های سالمونلا به دو دسته‌بندی سالمونلا تیفوئیدی و سالمونلا غیر تیفوئیدی تقسیم می‌شوند.

گسترش سالمونلاهای غیر تیفوئیدی یکی از مهم‌ترین موضوعات قابل بررسی در تحقیقات امروزی می‌باشد زیرا برای درمان آن در نوزادان و خردسالان گزینه‌های درمانی کمی وجود دارد. بنابراین تشخیص و تایپینگ سریع این بیماری‌زها و تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی، اطلاعات مناسبی در مورد انتخاب داروی مناسب، ردیابی و کنترل عفونت و کاهش مصرف داروهای غیر ضروری، در اختیار می‌دهد (۳). یکی از رایج‌ترین سروتیپ‌های سالمونلاهای غیرتیفوئیدی زیرگونه انتریکا سالمونلا اینفنتیس است که معمولاً، سالمونلا اینفنتیس نامیده می‌شود. سالمونلا اینفنتیس عمدتاً از طریق تماس مستقیم و غیرمستقیم انسان با منشاء آلوده منتقل می‌شود (۴).

تیپ‌بندی سویه‌های میکروبی جزء لاینفک بررسی‌های همه گیرشناسی بیماری‌های عفونی می‌باشد. این فرآیند از نظر همه گیرشناسی جهت شناسایی همه‌گیری‌ها،

تشخیص منبع عفونت‌ها، ردیابی و شناسایی سویه‌های بیماری‌زا و ارزیابی روش‌های ژنوتیپی تقسیم می‌گردند، بر این اساس کنترل و نظارت همه‌گیرشناسی و شناسایی منابع بالقوه عفونت سرو تایپ‌های سالمونلا نیازمند تایپینگ دقیق سویه‌ها می‌باشد. روش ERIC-PCR یکی از روش‌های مفید در تایپینگ انواع گونه‌های باکتریایی به شمار می‌رود. این روش مبتنی بر بررسی توالی‌های تکرار شونده ERIC با طول 124-127 جفت باز است. توالی‌هایی واجد ناحیه معکوس تکرار شونده و حفاظت شده که به شکل خارج ژنی در ژنوم باکتری‌های روده‌ای موجود می‌باشد. این توالی‌ها و تفاوت در تکرار آنها به عنوان یک ابزار بیولوژیک مولکولی برای بررسی ژنتیکی خانواده انتروباکتریاسه از جمله سالمونلا کاربرد داد. این توالی‌ها در ابتدا در *E.coli* و سپس در سالمونلا انتریکا گزارش شدند (۵).

در ERIC-PCR از پرایمرهایی که مکمل این توالی‌ها هستند برای ژنوتایپینگ باکتری‌های گرم منفی روده‌ای مانند گونه‌های سالمونلا استفاده می‌شود. این روش یک روش ارزشمند و کارا جهت تایپینگ مولکولی سویه‌های مربوط به جنس سالمونلا ارزیابی شده است (۶-۸).

قبل از ابداع روش‌های بیولوژی مولکولی، دانشمندان برای تحقیق در مورد گسترش بیماری، یافتن منابع عفونت و نیز نحوه انتشار عفونت، با مشکلات زیادی مواجه بودند و مطالعات اولیه همه گیرشناسی در مورد عفونت‌های سالمونلاهای غیرتیفوئیدی توسط روش‌های فنوتیپیک از جمله سروتایپینگ، بیوتایپینگ، کولیسین تایپینگ، بررسی الگوهای مقاومت آنتی‌بیوتیکی و تعیین پروفایل پلاسمیدی انجام می‌شد.

مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. با تست‌های بیوشیمیایی و محیط‌های افتراقی مانند TSI، MR-VP، لیزین آیرون آگار، سیمون سیترات و اوره (مرک آلمان)، کلنی‌های مشکوک به سالمونلا جداسازی و پس از انجام آزمون‌های افتراقی مذکور، آزمون‌های سروتایپینگ با آنتی‌سرم‌های O و H انجام پذیرفت (۱۲). واکنش آگلوتیناسیون به عنوان واکنش مثبت ثبت شد، سپس با استفاده از روش‌های استاندارد باکتریولوژیک، باکتری‌ها در محیط LB براث کشت داده شدند.

استخراج DNA

به منظور استخراج DNA از روش CTAB استفاده شد. تک کلنی از باکتری‌ها انتخاب و به ۵ میلی‌لیتر از محیط مایع LB منتقل و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و سرعت چرخش ۱۵۰ دور در دقیقه تا رسیدن OD کشت سلولی به ۰/۷ نگهداری شد. رسوب حاصل از سانتریفیوژ ۱/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون سلولی در ۵۶۷ میکرولیتر بافر TE و ۳۰ میکرولیتر از بافر SDS ۱۰ درصد یکنواخت گردید. در ادامه ۳ میکرولیتر از آنزیم Proteinase K به آن اضافه و پس از به هم زدن به مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

به نمونه حاصل ۱۰۰ میکرولیتر نمک NaCl ۵ مولار و ۸۰ میکرولیتر محلول CTAB/NaCl اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در ۶۵ درجه سانتی‌گراد گرمادهی شد. حذف پروتئین‌ها با افزودن فنل - کلروفرم - ایزوآمیل الکل به نسبت (۱/۲۴/۲۵) انجام گرفت. اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۲۵۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. ژنوم موجود در نمونه با استفاده از ایزوپروپانل و استات سدیم ۳ مولار آگیری شد. رسوب حاوی DNA با اتانول ۷۰ درصد شستشو و در ۲۰ میکرولیتر بافر TE حل گردید. جهت حذف

به علت اینکه روش‌های فنوتیپیک زمان بر، پرهزینه و خسته‌کننده است، از نظر همه گیرشناسی دارای ارزش محدود بوده و قدرت افتراق‌دهی بین سویه‌هایی با تشابه ژنتیکی زیاد را ندارد (۹-۱۱). روش‌های مولکولی مبتنی بر DNA برای شناسایی و طبقه‌بندی میکروب‌ها، وابستگی کمتری به عوامل متغییر و مؤثر در رشد باکتری داشته و در مدت زمان کوتاه‌تر و با انعکاس روابط فیلوژنی بین جدایه‌های مختلف، می‌تواند آنها را در گروه‌های خاص قرار دهد.

با توجه به مخاطرات جدی عفونت سالمونلا برای سلامت یک جامعه پایش تغییرات ژنتیکی‌ای باکتری بسیار حائز اهمیت می‌باشد. از طرفی با توجه به اینکه سالمونلا اینفتیس یکی از سرووارهای مهم سالمونلا در مسمومیت‌های غذایی می‌باشد، تحقیق حاضر به منظور بررسی رفتارها و تغییرات ژنتیکی این باکتری با استفاده از روش ERIC-PCR صورت گرفته است.

مواد و روش‌ها

ایزوله‌های باکتریایی: در یک مطالعه توصیفی از بهمن ماه سال ۱۳۹۳ تا شهریور ماه سال ۱۳۹۴، ۱۳۲ نمونه از بیماران مبتلا به اسهال حاد مراجعه کننده به مراکز درمانی و بیمارستان‌های مختلف کرمان گرفته شد. قابل ذکر است که نمونه‌ها توسط مجری و صرفاً به منظور این طرح از بیمار اخذ نگردیده است و به صورت روتین از آزمایشگاه‌های مراکز درمانی گرفته می‌شد. نمونه‌ها برای شناسایی جنس سالمونلا با روش‌های استاندارد سرولوژی و باکتریولوژی در محیط راپاپورت واسیلیادیس (مرک آلمان) در مجاورت یخ به آزمایشگاه میکروبیولوژی منتقل شدند. کشت اولیه و افتراقی بر روی نمونه‌ها در محیط‌های انتخابی مانند سالمونلا-شیگلا (SS) آگار، بیسموت سولفیت آگار انتقال و به

استخراج شده برا بر روی دستگاه قرار داده و غلظت آن را در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت.

واکنش PCR

طبق بررسی‌های به عمل آمده و مرور مطالعات انجام شده قبلی توسط سایر محققین، جفت پرایمرهای اختصاصی برای شناسایی سالمونلا اینفنتیس انتخاب گردید (جدول ۱).

RNA از RNase A با غلظت ۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر استفاده شد.

برای اندازه‌گیری غلظت نمونه‌های استخراج شده، از دستگاه نانو دراپ و طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر استفاده گردید. به این منظور ابتدا با الکل نانو دراپ را تمیز کرده و از آب مقطر و یا بافر TE به عنوان بافر شاهد برای صفر کردن دستگاه نانو دراپ استفاده شد. یک میکرولیتر از نمونه

جدول ۱) مشخصات پرایمرهای استفاده شده					
منبع	دمای اتصال (سانتی‌گراد)	طول قطعه (bp)	توالی پرایمر	توالی هدف	هدف
(۲۴)	۵۶	۷۲۴	F: AACAAACGACAGCTTATGCCG R: CCACCTGCGCCAACGCT	fljB	شناسایی سالمونلا اینفنتیس
(۲۵)	۴۰	متغییر	F: ATGTAAGCTCCTGGGGATTACAC R: AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG	ERIC region	ERIC-PCR

درجه حرارت ۹۵ درجه سانتی‌گراد و ۴۰ ثانیه، مرحله اتصال پرایمر در درجه حرارت ۵۶ درجه سانتی‌گراد و مدت زمان ۴۵ ثانیه، مرحله تکثیر در درجه حرارت ۷۲ درجه سانتی‌گراد و مدت زمان ۱ دقیقه انجام شد. در انتها نیز مرحله تکثیر نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد.

۶ میکرولیتر محصول PCR به همراه ۱ میکرولیتر بافر نمونه‌گذاری الکتروفورز (۶X) مخلوط گردید و بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد ساخته شده با بافر TAE 1X، به مدت ۴۰ دقیقه با ولتاژ ۱۲۰ ولت الکتروفورز گردید، سپس با رنگ اتیدیوم برمایند رنگ‌آمیزی و در نهایت زیر نور ماورای بنفش مورد بررسی قرار گرفت.

واکنش ERIC-PCR

سویه‌های شناسایی شده سالمونلا اینفنتیس با استفاده از آزمایش ERIC-PCR تایپینگ شدند. توالی پرایمرهای استفاده شده برای این آزمایش طبق جدول ۱ بودند. آزمایش ERIC-PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر تهیه شدند

جهت اطمینان از عملکرد پرایمرهای مورد استفاده، با استفاده از نرم افزار Oligo ویرایش ۵ برخی ویژگی‌های پرایمرها مانند میزان GC، دمای Tm، احتمال تشکیل لوپ و جفت‌شدگی بررسی شد. پرایمرها توسط شرکت سینا کلون سنتز گردید.

به منظور اطمینان از صحت عملکرد PCR از سالمونلا اینفنتیس ATCC 51741 به عنوان کنترل مثبت و از اسیتوباکتر بومانی ATCC 19606 به عنوان کنترل منفی استفاده شد. به منظور بهینه‌سازی روش PCR، مقادیر و غلظت‌های مختلف MgCl₂، dNTPs و DNA ژنومی و همچنین دماهای مختلف برای مرحله اتصال پرایمرها مورد بررسی قرار گرفتند. در نهایت واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل بافر PCR (10X) ۲ میکرولیتر، dNTPs ۰٫۲ میلی‌مول، پرایمرها هر کدام ۰٫۵ میکرومول و ۱ واحد آنزیم Taq پلیمرز، MgCl₂ ۲ میلی‌مول، DNA الگو ۱۵۰ نانوگرم و آب مقطر استریل ۱۰/۵ میکرولیتر راه‌اندازی گردید.

واکنش PCR با ۳۵ سیکل شامل مرحله واسرشت در

که N تعداد کل سویه‌های مورد مطالعه جهت روش ERIC-PCR، S تعداد تیپ‌های ژنتیکی محاسبه شده، nj تعداد سویه‌های متعلق به تیپ j است.

یافته‌ها

در این پژوهش از مجموع ۸۴۲ نمونه مدفوع و خون بیماران مبتلا به گاستروانتریت، ۴۸ سویه مربوط به سالمونلا/ینفتیس بود که برای تایپینگ مولکولی مورد بررسی قرار گرفتند.

میانگین سنی افراد تحت مطالعه ۵۵-۱۵ سال که ۲۴ مورد مرد و مابقی زن بودند. به طور کلی آنالیز شکل‌ها و دندوگرام حاصل از آنها، تمامی سویه‌ها در سطح تشابه ۶۵ درصد به ۱۴ گروه مجزا قابل تمایز بودند. به طوری که در گروه‌های C1، C8، C10 تا C12 و C14 هر کدام یک ایزوله، سه ایزوله در گروه C2 و C6، هشت ایزوله در گروه C3 و C13، دو ایزوله در گروه C4، چهار ایزوله در گروه C7 و C9، ۱۰ ایزوله در گروه C5 قرار گرفتند (جدول ۲). دندوگرام سرو تایپ‌های سالمونلا/ینفتیس و نتایج حاصل از ERIC-PCR در شکل ۱ آمده است.

با توجه به اطلاعات مندرج در جدول ۲ و تعداد تیپ‌های ژنتیکی به دست آمده، قدرت تمایزی روش ERIC-PCR، ۸۳/۰ محاسبه شد.

با بررسی ۱۴ گروه مختلف مشاهده می‌شود توزیع نمونه‌ها از نظر جنس و مراکز جداسازی شده تقریباً یکسان می‌باشد که می‌تواند دال بر چرخش این سرووار سالمونلا در جامعه باشد. همچنین از نظر نوع نمونه با توجه به اینکه اکثر نمونه‌ها از مدفوع گرفته شده است پراکنش نمونه‌های جدا شده از مدفوع در گروه‌ها بیشتر است اما نمونه‌های جدا شده از خون در گروه‌های C3، C4، C5، C6، C7، C9، C12 و C13 قرار گرفته‌اند.

که شامل ۱ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرها (با غلظت ۱۰ پیکومول در میکرولیتر)، ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس Amplicon 2X، ۴ میکرولیتر آب دیونیزه و ۴ میکرولیتر DNA الگوی استخراج شده (۱۵۰ نانوگرم) بود.

واکنش PCR با ۳۵ سیکل شامل مرحله واسرشت در درجه حرارت ۹۵ درجه سانتی‌گراد و ۴۰ ثانیه، مرحله اتصال پرایمر در درجه حرارت ۴۰ درجه سانتی‌گراد و مدت زمان ۴۵ ثانیه، مرحله تکثیر در درجه حرارت ۷۲ درجه سانتی‌گراد و مدت زمان ۲ دقیقه انجام شد. در انتها نیز مرحله تکثیر نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد.

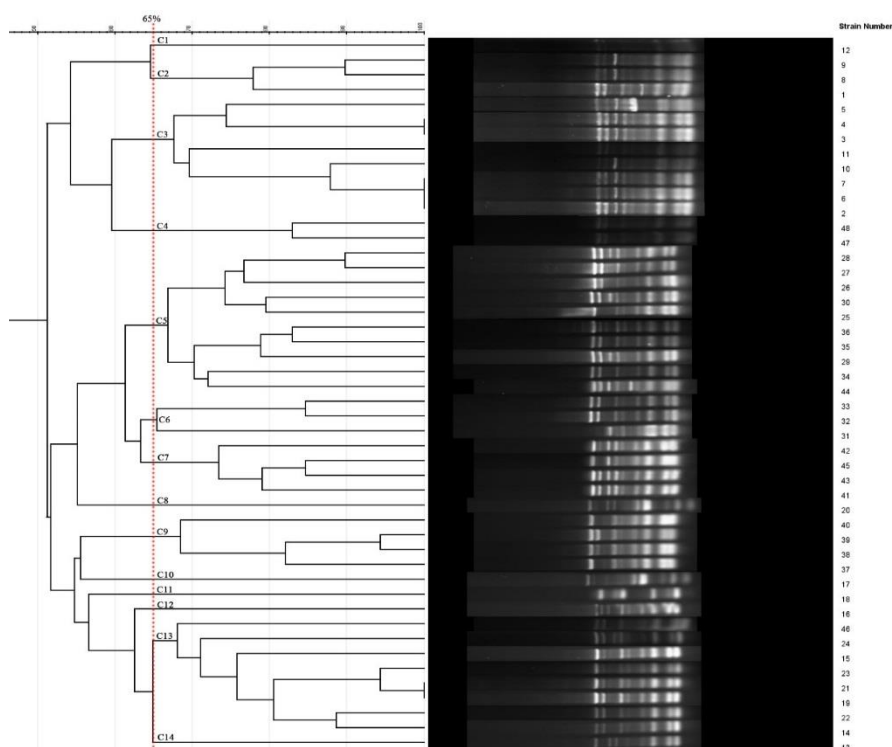
۶ میکرولیتر محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱٫۵ درصد ساخته شده با بافر TAE IX بارگزاری شد و به مدت ۴۰ دقیقه با ولتاژ ۱۲۰ ولت الکتروفورز گردید، سپس با رنگ اتیدیوم برمایید رنگ‌آمیزی و در نهایت زیر نور ماورای بنفش مورد بررسی قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل نتایج آزمایش ERIC-PCR توسط نرم‌افزار NTSYS

مقایسه الگوهای ERIC-PCR توسط نرم‌افزار NTSYS انجام گرفت بدین صورت که وجود باند با عدد ۱ و عدم وجود باند با عدد صفر در یک ماتریکس کدگذاری شدند. ماتریکس ایجاد شده با نرم‌افزار NTSYS تجزیه و تحلیل شد و دندوگرام نشان دهنده تنوع ژنتیکی با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و استفاده از الگوریتم UPGMA رسم گردید.

قدرت تمایزی روش ERIC-PCR نیز توسط معادله Simpson's Index Diversity بر طبق فرمول زیر انجام گرفت:

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^s n_j(n_j-1)$$



شکل ۱) دندوگرام حاصل از آزمایش ERIC-PCR با ضریب تشابه جاکارد و روش UPGMA و Cut off ۶۵ درصد

جدول ۲) مشخصات ایزوله‌های سالمونلا انتریکا سرووار اینفتیس

شماره سویه	نوع نمونه	کلاستر	شماره سویه	نوع نمونه	کلاستر	شماره سویه	نوع نمونه	کلاستر
۱	مدفوع	C2	۱۷	مدفوع	C10	۳۳	مدفوع	C6
۲	مدفوع	C3	۱۸	مدفوع	C11	۳۴	مدفوع	C5
۳	مدفوع	C3	۱۹	مدفوع	C13	۳۵	مدفوع	C5
۴	مدفوع	C3	۲۰	مدفوع	C8	۳۶	مدفوع	C5
۵	مدفوع	C3	۲۱	مدفوع	C13	۳۷	خون	C9
۶	مدفوع	C3	۲۲	مدفوع	C13	۳۸	مدفوع	C9
۷	خون	C3	۲۳	مدفوع	C13	۳۹	مدفوع	C9
۸	مدفوع	C2	۲۴	خون	C13	۴۰	مدفوع	C9
۹	مدفوع	C2	۲۵	خون	C5	۴۱	خون	C7
۱۰	مدفوع	C3	۲۶	مدفوع	C5	۴۲	مدفوع	C7
۱۱	خون	C3	۲۷	مدفوع	C5	۴۳	مدفوع	C7
۱۲	مدفوع	C1	۲۸	مدفوع	C5	۴۴	مدفوع	C5
۱۳	مدفوع	C14	۲۹	مدفوع	C5	۴۵	خون	C7
۱۴	مدفوع	C13	۳۰	مدفوع	C5	۴۶	مدفوع	C13
۱۵	مدفوع	C13	۳۱	مدفوع	C6	۴۷	مدفوع	C4
۱۶	خون	C12	۳۲	خون	C6	۴۸	خون	C4

بحث

از نظر اپیدمیولوژیکی، اهمیت تیپ‌بندی سویه‌های میکروبی در بررسی کانون مشترک بیماری، بررسی انتشار عفونت از یک بیمار به بیمار دیگر، بررسی عفونت اسپورادیک، تعیین هویت تیپ‌های بیماری‌زای عوامل میکروبی، افتراق سویه‌های اندمیک از سویه‌های با اپیدمی دهنده میکروبی، تمایز سویه‌های میکروبی به کار گرفته شده در همه گیری‌های عمدی (مد نظر در حملات بیوتروریستی) از سویه‌های اندمیک جامعه، مونیتورینگ اقدامات درمانی، تعیین الگوی مقاومت و حساسیت آنتی‌بیوتیکی و بررسی شکست درمان دارویی می‌باشد (۱۳). با توجه به گسترش سرووارهای سالمونلا از جمله سرووار/اینفنتیس در مناطق مختلف جهان و همچنین ایران و همچنین تغییرات ژنتیکی در این سرووار، تایپینگ مولکولی این سرووار اطلاعات مفیدی در ارتباط با اپیدمیولوژی و شناسایی منابع عفونت در اختیار قرار می‌دهد (۱۴).

اهمیت تیپ‌بندی سویه‌های میکروبی در بررسی کانون مشترک بیماری، بررسی انتشار عفونت از یک بیمار به بیمار دیگر، بررسی عفونت اسپورادیک، تعیین هویت تیپ‌های بیماری‌زای عوامل میکروبی، افتراق سویه‌های اندمیک از سویه‌های اپیدمی دهنده عوامل میکروبی، تمایز سویه‌های میکروبی به کار گرفته شده در همه‌گیری‌های عمدی از سویه‌های اندمیک جامعه، مونیتورینگ اقدامات درمانی، تعیین الگوی مقاومت و حساسیت آنتی‌بیوتیکی و بررسی شکست درمان دارویی می‌باشد. در صورتی که در روش ERIC شاهد گروه‌های متفاوت باشیم می‌توان نشان دهنده الگوهای مقاومت آنتی‌بیوتیکی متفاوت در سویه‌های مورد مطالعه باشد که می‌توان از آن جهت جلوگیری از تجویز نامناسب آنتی‌بیوتیک جلوگیری به عمل آورد. احتمال

دیگری که از تنوع گروه‌ها در نتایج ERIC می‌توان حدس زد منشاءهای متفاوت سویه‌ها می‌باشد که ممکن است به علت همه‌گیری‌های عمدی مانند حملات بیوتروریستی، رعایت نکردن شرایط بهداشتی، مصرف خودسرانه آنتی‌بیوتیک و یا سایر عوامل مؤثر در رفتارهای ژنتیکی باکتری‌ها باشد. بنابراین با بررسی و زیر نظر گرفتن مداوم رفتارهای ژنتیکی باکتری‌های در یک جامعه با روش‌های ساده‌ای مانند ERIC می‌توان از بروز بسیاری از تهدیدات و خطرات بهداشتی در جامعه جلوگیری به عمل آورد.

با وجود قرابت ژنتیکی بسیار نزدیک در جنس سالمونلا، تغییرات گسترده‌ای در بروز بیماری، ویرولانس و توزیع جغرافیایی این باکتری وجود دارد (۱۵). کسب یا از دست دادن برخی از ژن‌ها و موتاسیون‌ها، نقش مهمی در تکامل تایپ‌های مختلف سالمونلا ایفا می‌کند. که ردیابی و بررسی این تغییرات ژنتیکی در جامعه نقش بسیار مهم و حائز اهمیتی و اطلاعات زیادی در مورد اپیدمیولوژی و شناسایی منابع عفونت به منظور کنترل عفونت و نظارت همه گیرشناسی در اختیار قرار می‌دهد.

در مطالعه حاضر سویه‌های سالمونلا/اینفنتیس فراوانی نسبتاً بالای داشتند. در مطالعه‌ای که در بلغارستان توسط نورگادی (Nogrady) و همکاران انجام شد، تعداد ۱۷ سویه سالمونلا/اینفنتیس از نمونه‌های مدفوعی انسان و تعداد ۱۲۸ سویه از نمونه‌های مدفوعی جوجه‌ها جدا کردند که در مطالعه حال حاضر هم این سروتایپ از فراوانی بالایی برخوردار بود (۱۶). همچنین در آرژانتین، سالمونلا/انتریکا سرووار/اینفنتیس دومین عامل شایع در میان سرو تیپ‌های سالمونلا در میان کودکان بستری شده در بیمارستان بود (۱۷).

در این مطالعه از روش ERIC-PCR جهت تایپینگ سویه‌های سالمونلا/اینفنتیس مورد استفاده قرار گرفت.

ERIC-PCR روش مناسبی جهت ژنوتایپینگ مولکولی سویه‌های سالمونلا می‌باشد (۲۰).

روش ERIC-PCR در پژوهش‌های قبلی در سراسر دنیا از جمله ایران برای تایپینگ مولکولی ایزوله‌های سالمونلا مورد استفاده قرار گرفته است، به طوری که در کره جنوبی لیم (Lim) و همکاران، تایپینگ مولکولی ۵۷ سویه سالمونلا را با روش ERIC-PCR انجام دادند و ۵۰ الگوی ERIC-PCR بدست آوردند و نشان دادند که این روش برای مطالعات اپیدمیولوژیکی سویه‌ها مفید است (۲۱). در مطالعات دیگری در کشور هند که توسط سکانا (Sexana) و همکاران صورت گرفت، ۲۴ ایزوله از سرووارهای سالمونلا را با روش ERIC-PCR مورد تمایز قرار دادند و ۲۱ تیپ ژنتیکی بدست آمد و نتایج این پژوهشگران نشان داد که این روش قادر است واریانت‌های ژنتیکی مختلفی در سالمونلا تایفی موریوم را از هم تمایز دهد (۲۱).

همچنین اولیویرا (Oliviera) و همکاران، تعداد ۱۰۲ سویه از سالمونلا انترتیدیس را با روش ERIC-PCR مورد مطالعه قرار دادند و نتایج این مطالعه نشان داد که با استفاده از روش ERIC-PCR سویه‌ها دارای ۳ الگوی ژنتیکی هستند (۲۲). در ایران نیز مطالعاتی بر روی تایپینگ سالمونلا انترتیدیس انجام شده است به طوری که رنجبر و همکاران تعداد ۵۷ سویه سالمونلا انترتیدیس را توسط ERIC-PCR مورد مطالعه قرار دادند و ۹ الگوی ERIC-PCR به دست آوردند. نتایج این محققین نشان داد که روش ERIC-PCR می‌تواند ایزوله‌های سالمونلا انتریکا را به خوبی تمایز دهد زیرا تمامی ایزوله‌ها با این روش قابل تایپ‌بندی بودند (۱۹). در مطالعه‌ای که فرد صانعی و همکاران با استفاده از روش ERIC-PCR انجام داده بودند نشان دهنده این بود که گوناگونی ژنتیکی بین سویه‌های سالمونلا

نتایج مطالعه ما نشان داد که روش ERIC-PCR دارای قدرت افتراق‌پذیری مناسبی جهت تمایز ایزوله‌های سالمونلا اینفتیس بود. کیملسکی (Chmeielewski) و همکاران، کاربرد روش ERIC-PCR را جهت ژنوتایپینگ سویه‌های سالمونلا بر روی ۳۱ ایزوله سالمونلا با روش‌های ERIC-PCR و Rep-PCR و ریوتایپینگ تفریق سویه‌ای نمونه و این سه روش را مورد مقایسه قرار دادند و نتیجه گرفتند که در بین این سه روش ERIC و Rep دارای قدرت افتراق بیشتری از ریوتایپینگ می‌باشند (۶). همچنین در مطالعات قبلی ارزیابی قدرت تمایزی روش ERIC-PCR نیز مورد محاسبه قرار گرفتند. در مطالعه حاضر قدرت تایپینگ روش ERIC-PCR، ۰/۸۳ محاسبه شد، به طوری که در مطالعه گوپال (Gopal) و همکاران در هند، تعداد ۱۱۳ سویه سالمونلا را مورد مطالعه قرار دادند و از این تعداد، به صورت تصادفی ۸۹ و ۳۳ سویه را به ترتیب با روش ERIC-PCR و RAPD مورد ژنوتایپینگ مولکولی قرار دادند و قدرت تمایزی این روش‌ها را به ترتیب ۰/۷۰ و ۰/۸۹ محاسبه کردند (۱۸)، همچنین در ایران رنجبر و همکاران، ۵۷ ایزوله سالمونلا انترتیدیس را با روش ERIC-PCR مورد ژنوتایپینگ قرار دادند و قدرت تمایزی روش ERIC-PCR را ۰/۷۷ محاسبه کردند (۱۹) که این اعداد نزدیک به عدد محاسبه شده در این مطالعه می‌باشد و هر چقدر این عدد به ۱ نزدیک‌تر باشد، نشان دهنده میزان بالای قدرت تمایزی روش تایپینگ می‌باشد.

همچنین در مطالعه سوری (Soria) و همکاران در اسپانیا، تعداد ۴۳ سویه از سالمونلا را با روش Ribotyping مورد ژنوتایپینگ مولکولی قرار دادند و قدرت تمایزی این روش را ۰/۴۴ تا ۰/۵۵ گزارش نمودند. بنابراین با توجه به هزینه، وقت و قابلیت در دسترس بودن روش، تکرارپذیری و مقایسه قدرت تمایزی، روش

همه گیرشناسی و تعیین راهبردهای کنترل عفونت استفاده نمود. لذا لازم است بررسی‌های مستمر، برنامه‌های نظارتی و غربالگری انجام شود و نوع سالمونلای غالب یا ژنوتایپ غالب آن جامعه مشخص گردد تا برای سیر درمان مبتلایان بهترین مسیر را بتوان انتخاب نمود. با توجه به محدود بودن تعداد نمونه‌ها و یکسان بودن منبع جداسازی آنها لازم است بررسی روی سویه‌های بیشتری با منابع غذایی و انسانی نیز صورت پذیرد.

سپاس و قدردانی

بدین‌وسیله از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه امام حسین (ع) به دلیل حمایت‌های همه جانبه خود سپاس‌گزاری می‌گردد.

تضاد منافع

هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

انتریتیدیس وجود نداشته (۲۳) اما در مطالعه حاضر سویه‌های سالمونلا/اینفنتیس دارای الگوهای ERIC متفاوتی بودند که نشان دهنده تنوع ژنتیکی سویه‌های سالمونلا/اینفنتیس در شهر کرمان می‌باشد و احتمالاً این سویه‌ها منشاء متفاوتی داشته که در حال چرخش بین حیوانات و انسان است. بنابراین پیدایش سویه‌های جدید و شناسایی کلون‌های کم شیوع در مطالعات مولکولار اپیدمیولوژی به لحاظ پیش‌بینی‌های روش‌های کنترل بهداشتی به منظور محدود کردن آنها از دیگر رویکردهای مفید این مطالعه است.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج حاصل شده از این پژوهش می‌توان نتیجه گرفت که روش ERIC-PCR روش مناسبی جهت تایپینگ مولکولی سویه‌های سالمونلا و تعیین کانون‌های شیوع عفونت می‌باشد که می‌توان از آن جهت مطالعات

References:

- Lasser C, Miller S. Harrison's principles of internal medicine. 17th ed. Fauci F, Braunwald E, Isselbacher K, editors. New York: McGraw-Hill, 2001, 970-5.
- Skjolaas KA, Burkey TE, Dritz SS, et al. Effects of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium (ST) and Choleraesuis (SC) on chemokine and cytokine expression in swine ileum and jejunal epithelial cells. *Vet Immunol Immunopathol* 2006; 111(3-4): 199-209.
- Ranjbar R, Giammanco GM, Farshad Sh, et al. Serotypes, antibiotic resistance, and class 1 integrons in *Salmonella* isolates from pediatric cases of enteritis in Tehran, Iran. *Foodborne Pathog Dis* 2011; 8(4): 547-53. (Persian)
- Wilson R, Feldman RA, Davis J, et al. Salmonellosis in infants: the importance of intrafamilial transmission. *Pediatrics* 1982; 69(4): 436-8.
- Hulton CS, Higgins CF, Sharp PM. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Mol Microbiol* 1991; 5(4): 825-34.
- Chmielewski R, Wieliczko A, Kuczkowski M, et al. Comparison of ITS profiling, REP- and ERIC-PCR of *Salmonella Enteritidis* isolates from Poland. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2002; 49(4): 163-8.
- Burr MD, Josephson KL, Pepper IL. An evaluation of ERIC PCR and AP PCR fingerprinting for discriminating *Salmonella* serotypes. *Lett Appl Microbiol* 1998; 27(1): 24-30.
- Weigel RM, Qiao B, Teferedegne B, et al. Comparison of pulsed field gel electrophoresis and repetitive sequence polymerase chain reaction as genotyping methods for detection of genetic diversity and inferring transmission of *Salmonella*. *Vet Microbiol* 2004; 100(3-4): 205-17.

9. Muñoz P, Díaz MD, Rodríguez-Créixems M, et al. Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolates in a Spanish hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37(5): 1200-2.
10. Llanes C, Kirchgessner V, Plesiat P. Propagation of TEM- and PSE-type beta-lactamases among amoxicillin-resistant *Salmonella* spp. isolated in France. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43(10): 2430-6.
11. Wray C, McLaren I, Parkinson NM, et al. Differentiation of *Salmonella typhimurium* DT204c by plasmid profile and biotyping. *Vet Rec* 1987; 121(22): 514-6.
12. Eshraghi S, Soltan Dalall M, Fardsanei F, et al. *Salmonella enteritidis* and antibiotic resistance patterns: A study on 1950 children with diarrhea. *Tehran Univ Med J* 2010; 67(12): 876-82. (Persian)
13. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. *Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. Infect Control Hosp Epidemiol* 1997; 18(6): 426-39.
14. Ross IL, Heuzenroeder MW. A comparison of three molecular typing methods for the discrimination of *Salmonella enterica* serovar Infantis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008; 53(3): 375-84.
15. Stevens A, Kerouanton A, Marault M, et al. Epidemiological analysis of *Salmonella enterica* from beef sampled in the slaughterhouse and retailers in Dakar (Senegal) using pulsed-field gel electrophoresis and antibiotic susceptibility testing. *Int J Food Microbiol* 2008; 123(3): 191-7.
16. Nógrády N, Kardos G, Bistyák A, et al. Prevalence and characterization of *Salmonella infantis* isolates originating from different points of the broiler chicken-human food chain in Hungary. *Int J Food Microbiol* 2008; 127(1-2): 162-7.
17. Merino LA, Ronconi MC, Navia MM, et al. Analysis of the clonal relationship among clinical isolates of *Salmonella enterica* serovar Infantis by different typing methods. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2003; 45(3): 119-23.
18. Nath G, Maurya P, Gulati AK. ERIC PCR and RAPD based fingerprinting of *Salmonella Typhi* strains isolated over a period of two decades. *Infect Genet Evol* 2010; 10(4): 530-6.
19. Ranjbar R, Torabi R, Mirzaie A. Molecular typing of *Salmonella enteritidis* strains isolated in several laboratory centers in Tehran by ERIC-PCR. *Sci J Kurdistan Univ Med Sci (SJKU)* 2013; 18(2): 77-85. (Persian)
20. Soria G, Barbé J, Gibert I. Molecular fingerprinting of *Salmonella typhimurium* by IS200-typing as a tool for epidemiological and evolutionary studies. *Microbiologia* 1994; 10(1-2): 57-68.
21. Saxena MK, Singh VP, Lakhcharua BD, et al. Strain differentiation of Indian isolates of *Salmonella* by ERIC-PCR. *Res Vet Sci* 2002; 73(3): 313-4.
22. Madalena V, Mario G, Rogerio T, et al. Evaluation of PCR-based fingerprinting comparatively to the RFLP-PFGE for discrimination of *Salmonella* sp. isolated from slaughtered pork polymerase chain reaction identification of *Salmonella* serotypes. *J Food Drug Anal* 2008; 16(1): 88-95.
23. Fardsanei F, Nikkhahi F, Bakhshi B, et al. Molecular characterization of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis isolates from food and human samples by serotyping, antimicrobial resistance, plasmid profiling, (GTG)5-PCR and ERIC-PCR. *New Microbes New Infect.* 2016 ; 14:24-30

Original Article

Molecular Typing Isolates of *Salmonella Enterica* Serovar *Infantis* Using Eric-PCR Method

A. Moghadam (MSc)¹, Sh. Nazarian (PhD)^{2*}

¹ Department of Cell and Molecular Science, School of Biology, University of Tehran, Tehran, Iran

² Department of Biology, School of Science, Imam Hossain University, Tehran, Iran

(Received 1 Feb 2017 Accepted 8 Apr 2017)

Abstract

Background: Salmonella are significant bacteria of the Enterobacteriaceae which are very diverse biochemically and serologically. These bacteria are primarily transmitted through food ingestion. The spread of non-typhoid Salmonella is one of the challenging issues in the current medical research. Therefore, rapid diagnosis and identifying the type of these pathogens provide crucial information for early detection and controlling the spread of the infection. The aim of this study was typing the clinical strains of *Salmonella Infantis*.

Materials and Methods: In this study, strains of *Salmonella Infantis* were isolated from several health centers. All of the strains were identified by standard microbiology, biochemical and molecular methods. Genetic relationship between strains was analyzed using the ERIC-PCR method.

Results: In this study, 842 stool and blood sample of patients with diarrhea were examined, and 48 different strains linked to *Salmonella Infantis* were isolated. Strains categorized into 14 different groups by genotyping using the ERIC-PCR method, and the highest number of the strains were placed in group 5 (20%, 10 strains).

Conclusion: Results of this study revealed that strains of *Salmonella Infantis* which were examined genetically were rather diverse in nature. This could be due to the high prevalence of polyclonal strains in human samples. It was also shown that ERIC-PCR method has an abundant differential power for the molecular typing purposes.

Key words: *Salmonella Infantis*, ERIC-PCR, Genetic diversity, molecular typing

©Iran South Med J. All rights reserved.

Cite this article as: Moghadam A, Nazarian Sh. Molecular Typing Isolates of *Salmonella Enterica* Serovar *Infantis* Using Eric-PCR Method. Iran South Med J 2017; 20(5): 426-436

Copyright © 2017 Moghadam, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.

*Address for correspondence: Department of Biology, School of Science, Imam Hossain University, Tehran, Iran.
Email: kpnazari@ihu.ac.ir

Website: <http://bpums.ac.ir>
Journal Address: <http://ismj.bpums.ac.ir>