

Genotyping of Clinical Isolates of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium from Medical Centers of Kerman Province Using ERIC-PCR Method

Abolfazl Moghadam¹, Shahram Nazarian^{2*}

¹Department of Biology,
Faculty of Sciences,
University of Tehran,
Tehran, Iran.

²Department of Biology,
Faculty of Basic Sciences,
Imam Hossein University,
Tehran, Iran.

*Corresponding Author:
Shahram Nazarian,
Department of Biology,
Faculty of Basic Sciences,
Imam Hossein University,
Tehran, Iran.

Email:
nazarian56@gmail.com

Received: 31 Oct, 2016

Accepted: 12 Jun, 2017

Abstract

Background and Objectives: *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is one of the most common *Salmonella* serotypes in gastroenteritis cases. ERIC-PCR method is used for genotyping studies and examinations in order to apply appropriate preventive and controlling conditions. This research was carried out with the objective of investigating the genotyping of *Salmonella typhimurium* strains in the treatment centers of Kerman province.

Methods: In this descriptive study, different strains of *Salmonella Typhimurium*, were isolated from different treatment centers. All strains were examined using standard methods of microbiology, biochemistry, and molecular biology. Genetic relationship between the strains was evaluated by ERIC-PCR method.

Results: In this study, Among 891 stool and blood samples of patients with diarrhea, 48 strains of *Salmonella typhimurium*, were isolated. The isolates were classified in terms of genotyping into 15 different groups using ERIC-PCR method, which the highest number of the strains was in the 14th group (25%, 12 strains).

Conclusion: The results of the present study showed high discrimination power of ERIC-PCR method for molecular typing and genetic diversity of *Salmonella typhimurium* strains isolated from human samples. Therefore, this method can be used for epidemiological studies in order to investigate the source of contamination, genetic diversity and its relationship with geographical distribution and drug resistance of the isolated strains.

Keywords: *Salmonella typhimurium*; Genetic variation; Molecular typing.

ژنوتایپینگ جدایه‌های بالینی سالمونلا انتریکا سرووار تایفی موریوم مراکز درمانی استان کرمان، با استفاده از روش ERIC-PCR

ابوالفضل مقدم^۱، شهرام نظریان^{۲*}

چکیده

زمینه و هدف: سالمونلا انتریکا سرووار تایفی موریوم، یکی از شایع‌ترین سروتیپ‌های سالمونلا در موارد گاستروانتریت است. در مطالعات از روش ERIC-PCR برای بررسی ژنوتایپی به جهت اعمال شرایط پیشگیرانه و کنترلی مناسب استفاده می‌شود. این پژوهش با هدف بررسی ژنوتایپینگ سویه‌های سالمونلا تایفی موریوم در مراکز درمانی استان کرمان انجام شد.

روش بررسی: در این پژوهش توصیفی، از مراکز درمانی مختلف سویه‌های سالمونلا تایفی موریوم جداسازی شد. تمامی سویه‌ها با استفاده از روش‌های استاندارد میکروبی‌شناسی، بیوشیمیایی و مولکولی شناسایی شدند. رابطه ژنتیکی سویه‌ها با استفاده از روش ERIC-PCR مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: در این تحقیق، از مجموع ۸۹۱ نمونه مدفوع و خون بیماران مبتلا به اسهال، ۴۸ سویه سالمونلا تایفی موریوم جداسازی شد. جدایه‌ها با استفاده از روش ERIC-PCR از نظر ژنوتایپینگ به ۱۵ گروه مختلف دسته‌بندی شدند که بیشترین تعداد سویه در گروه چهاردهم (۲۵٪، ۱۲ سویه) قرار داشت.

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه حاضر، نشان‌دهنده قدرت تمایزی بالای ERIC-PCR جهت تایپینگ مولکولی و تنوع ژنتیکی در سویه‌های سالمونلا تایفی موریوم جداسازی‌شده از نمونه‌های انسانی بود. بنابراین، از این روش می‌توان در جهت مطالعات اپیدمیولوژیک به منظور بررسی منبع بروز آلودگی، تنوع ژنتیکی و ارتباط آن با پراکندگی جغرافیایی و مقاومت دارویی سویه‌های جداسازی‌شده استفاده کرد.

کلید واژه‌ها: سالمونلا تایفی موریوم؛ تنوع ژنتیکی؛ تایپینگ مولکولی.

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

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

* نویسنده مسئول مکاتبات:

شهرام نظریان، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:

nazarian56@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۵/۸/۹

تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۰/۲۲

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Moghadam A, Nazarian Sh. Genotyping of clinical isolates of *Salmonella enterica* serovar typhimurium from medical centers of kerman province using ERIC-PCR method. Qom Univ Med Sci J 2018;12(1):44-53. [Full Text in Persian]

ERIC-PCR برای جدایه‌ها و پاتوارها، اختصاصی عمل کرده و تایپینگ حاصل از REP-PCR، ابزار تشخیصی مناسبی به منظور گروه‌بندی، شناسایی و بررسی سیر تکاملی پاتوارها می‌باشد (۹). توالی‌های ERIC در واقع توالی‌های 124-127bp هستند که واجد یک ناحیه معکوس تکرارشونده مرکزی حفاظت شده بوده و به شکل خارج ژنی در ژنوم باکتری‌های روده‌ای قرار دارند. پرایمرهای مورد استفاده در ERIC-PCR، مکمل این توالی‌ها می‌باشد و برای ژنوتایپینگ باکتری‌های گرم منفی روده‌ای مانند گونه‌های سالمونلا به کار می‌رود. این روش، یک روش ارزشمند و کارا جهت تایپینگ مولکولی سویه‌های مربوط به جنس سالمونلا ارزیابی شده است (۱۰-۱۲).

در مباحث اپیدمیولوژی، اهمیت تیپ‌بندی سویه‌های میکروبی در بررسی کانون مشترک بیماری، بررسی انتشار عفونت از یک بیمار به بیمار دیگر، افتراق سویه‌های اندمیک از سویه‌های اپیدمی دهنده عوامل میکروبی، تعیین الگوی مقاومت و حساسیت آنتی‌بیوتیکی می‌باشد. در انتخاب روش یا روش‌های تیپ‌بندی باید به قدرت تیپ‌بندی، تکرارپذیری، قدرت افتراق‌دهی، سادگی روش، وسعت کاربرد، سرعت انجام و سادگی تفسیر روش توجه کرد (۱۳). روش‌های تایپینگ مولکولی، از جمله ERIC-PCR می‌تواند جهت مطالعات اپیدمیولوژیک به منظور بررسی منبع بروز آلودگی، تنوع ژنتیکی و ارتباط آن با پراکندگی جغرافیایی و مقاومت دارویی سویه‌های جداسازی شده، مورد استفاده قرار گیرد (۱۴). این پژوهش با هدف بررسی ژنوتایپینگ سویه‌های سالمونلا تایفی موریوم از منابع انسانی که می‌تواند در مطالعات اپیدمیولوژیک نقش مهمی داشته باشد، انجام شد تا از نتایج حاصله برای مطالعات و بررسی‌های تکمیلی ژنوتایپی در آینده و اتخاذ سیاست‌های پیشگیرانه و کنترلی مناسب استفاده گردد.

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی (از بهمن‌ماه سال ۱۳۹۳ تا مردادماه سال ۱۳۹۴)، ۸۹۱ نمونه مدفوع و خون از بیمارانی مبتلا به اسهال حاد مراجعه‌کننده به مراکز درمانی و بیمارستان‌های مختلف کرمان گرفته شد.

سالمونلوز، یکی از مهم‌ترین بیماری‌های باکتریایی روده‌ای است که توسط گونه‌های سالمونلا ایجاد شده و در سرتاسر جهان میلیون‌ها انسان و حیوان را درگیر می‌کند (۱، ۲). گونه سالمونلا انتریکا دارای ۶ زیرگونه شامل: سالمونلا آریزونا (*arizonae*)، انتریکا (*Enterica*)، دی‌آریزونا (*Diarizonae*)، سلامی (*Salamae*)، هوتنا (*Houtenae*) و ایندیکا (*Indica*) می‌باشد (۳). در این میان، سالمونلا انتریکا سرووار تایفی موریوم عامل بروز سالمونلوز غیرحصبه‌ای یا همان گاستروانتریت است. از ویژگی‌های مهم این سرووار، توانایی آن در باقی‌ماندن به شکل غیرقابل تکثیر و زنده به مدت طولانی در محیط و نمونه‌های غذایی است (۴). استفاده نادرست از آنتی‌بیوتیک‌ها منجر به گسترش مقاومت به داروهای ضد میکروبی در انسان می‌شود. این مسئله باعث پیدایش سویه‌هایی از سالمونلا انتریکا با مقاومت چندگانه شده است (۳، ۴). به منظور نظارت مؤثر و کنترل سالمونلا، داشتن اطلاعات دقیق در مورد گوناگونی ژنتیکی و تایپینگ سویه‌های مختلف این باکتری، ضروری است. مطالعات اولیه اپیدمیولوژیک با روش‌های فنوتیپیک از جمله سروتایپینگ، بیوتایپینگ و بررسی الگوهای مقاومت آنتی‌بیوتیکی انجام می‌شد. روش‌های فنوتیپیک زمانبر و پرهزینه بوده و به همین علت دارای ارزش محدودی است و قدرت افتراق‌دهی بین سویه‌هایی که ارتباط بسیار نزدیکی باهم دارند را ندارد (۵-۷). روش‌های مولکولی برای شناسایی و طبقه‌بندی میکروب‌ها، در مدت زمان کوتاه‌تر و با انعکاس روابط فیلوژنی بین جدایه‌های مختلف، می‌تواند آنها را در گروه‌های خاص قرار دهد.

در حال حاضر از روش‌های مولکولی متعددی برای بررسی و تفریق سویه‌های سالمونلا استفاده می‌شود. تایپینگ براساس REP-PCR (Repetitive Extragenic Elements) روشی معتبر، تکرارپذیر و سریع بوده و از قدرت تفکیک بالایی در میان جدایه‌های باکتری‌ها برخوردار است (۸). سه گروه از توالی‌های تکرارشونده پراکنده در ژنوم باکتری‌ها به نام‌های REP، BOX و ERIC در بررسی تنوع، شناسایی گونه‌ها و زیرگونه‌ها کاربرد داشته و استفاده از آنها رو به فزونی است. الگوی ژنومی به‌دست آمده به وسیله روش‌های REP-PCR، BOX-PCR و

به این منظور، ابتدا دستگاه با الکل نانودراپ تمیز شد، سپس از آب مقطر یا بافر TE به‌عنوان بافر شاهد برای صفر کردن دستگاه استفاده شد. یک میکرولیتر از نمونه استخراج‌شده بر روی دستگاه قرار گرفت و غلظت آن در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر بررسی گردید.

جهت انجام واکنش PCR (طبق بررسی‌های به‌عمل‌آمده و مرور مطالعات انجام‌شده قبلی توسط سایر محققین)، جفت پرایمرهای اختصاصی برای شناسایی سالمونلا تایفی موریوم انتخاب شدند (جدول شماره ۱). همچنین برای اطمینان از عملکرد پرایمرهای مورد استفاده، به کمک نرم‌افزار Oligo نسخه ۵، برخی ویژگی‌های پرایمرها مانند میزان GC، دمای Tm، احتمال تشکیل لوپ و جفت‌شدگی بررسی گردید. پرایمرها توسط شرکت سینا کلون سنتز شدند.

جهت اطمینان از صحت عملکرد PCR، از سالمونلا تیفی موریوم ATCC 14028 به‌عنوان کنترل مثبت و از استیتو باکتر بومانی ATCC 19606 به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد. به‌منظور بهینه‌سازی روش PCR، مقادیر و غلظت‌های مختلف $MgCl_2$ ، dNTPs و DNA ژنومی، همچنین دماهای مختلف برای مرحله اتصال پرایمرها مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت، واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل: بافر ۲ میکرولیتر PCR (10X)، ۰/۲ میلی‌مول dNTPs، پرایمرها هرکدام ۰/۵ میکرومول و ۱ واحد آنزیم Taq پلیمرز، ۲ میلی‌مول $MgCl_2$ ، ۱۵۰ نانوگرم DNA الگو و ۱۰/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل صورت گرفت.

واکنش PCR با ۳۵ سیکل شامل: مرحله واسرشت در درجه حرارت ۹۵ درجه سانتیگراد، به مدت ۴۰ ثانیه؛ مرحله اتصال پرایمر در درجه حرارت ۵۶ درجه سانتیگراد، به مدت ۴۵ ثانیه؛ مرحله تکثیر در درجه حرارت ۷۲ درجه سانتیگراد، به مدت یک دقیقه و در انتها مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد.

۶ میکرولیتر محصول PCR به همراه ۱ میکرولیتر بافر 6X بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ ساخته‌شده با بافر TAE IX بارگذاری و به مدت ۴۰ دقیقه در ولتاژ ۱۲۰ ولت الکتروفورز گردید، سپس با رنگ اتیدیوم برامید، رنگ آمیزی و در نهایت، زیر نور ماوراءبنفش

نمونه‌ها برای شناسایی جنس سالمونلا با روش‌های استاندارد سرولوژی و باکتریولوژی در محیط راپاپورت واسیلیادیس (ساخت مرک آلمان) در مجاورت یخ به آزمایشگاه میکروب‌شناسی منتقل شدند. کشت اولیه و افتراقی بر روی نمونه‌ها در محیط‌های انتخابی مانند سالمونلا - شیکلا (SS) آگار، بیسموت سولفیت آگار، صورت گرفت. محیط‌های کشت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. با تست‌های بیوشیمیایی و محیط‌های افتراقی مانند TSI، MR-VP، لیزین آیرون آگار، سیمون سترات و اوره (ساخت مرک آلمان)، کلنی‌های مشکوک به سالمونلا جداسازی و پس از انجام آزمون‌های افتراقی مذکور، آزمون‌های سروتایپینگ با آنتی‌سرم‌های O و H انجام شد (۱۵). واکنش آگلوتیناسیون به‌عنوان واکنش مثبت ثبت گردید، سپس با استفاده از روش‌های استاندارد باکتریولوژیک، باکتری‌ها در محیط LB براث کشت داده شدند. به‌منظور استخراج DNA، از روش CTAB

(Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) استفاده شد. تک کلنی از باکتری‌ها انتخاب و به ۵ میلی‌لیتر از محیط مایع LB منتقل گردید، سپس 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 سانتریفوژ شامل ۱/۵ میلی‌لیتر از سوپانسیون سلولی در ۵۶۷ میکرولیتر بافر TE و ۳۰ میکرولیتر از بافر 10% SDS یکنواخت گردید. در ادامه، ۳ میکرولیتر از آنزیم Proteinase K به آن اضافه و پس از به‌هم زدن به مدت یک 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 - ایزوآمیل‌الکل (به نسبت ۱/۲۴/۲۵) انجام گرفت. اسید نوکلئیک موجود در نمونه با استفاده از ایزوپروپانل و استات سدیم ۳ مولار ترسیب داده شد. رسوب حاوی DNA بعد از شست‌وشو با اتانول ۷۰٪، در ۲۰ میکرولیتر بافر TE حل گردید. جهت حذف RNA، از RNase A (با غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) استفاده شد. برای اندازه‌گیری غلظت نمونه‌های استخراج‌شده، از دستگاه نانودراپ و طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر استفاده گردید.

Archive of SID

واکنش PCR با ۳۵ سیکل شامل: مرحله واسرشت در درجه حرارت ۹۵ درجه سانتیگراد، به مدت ۴۰ ثانیه؛ مرحله اتصال پرایمر در درجه حرارت ۴۰ درجه سانتیگراد، به مدت ۴۵ ثانیه؛ مرحله تکثیر در درجه حرارت ۷۲ درجه سانتیگراد، به مدت ۲ دقیقه و در انتها مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. ۶ میکرولیتر محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱٪/۵ ساخته شده با بافر TAE 1X بارگذاری شد و به مدت ۴۰ دقیقه با ولتاژ ۱۲۰ ولت الکتروفورز گردید، سپس با رنگ اتیدیوم برمایید، رنگ آمیزی و در نهایت، زیر نور ماوراءبنفش مورد بررسی قرار گرفت.

مورد بررسی قرار گرفت. در ادامه، سویه‌های شناسایی شده سالمونلا تیفی موریوم با استفاده از آزمایش ERIC-PCR تایپینگ شدند. توالی پرایمرهای مورد استفاده برای این آزمایش طبق جدول شماره ۱ بود. آزمایش ERIC-PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد که شامل: یک میکرولیتر از هر کدام از پرایمرها (با غلظت ۱۰ پیکومول بر میکرولیتر)، ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس 2X Amplicon، ۴ میکرولیتر آب دیونیزه و ۴ میکرولیتر DNA الگوی استخراج شده (۱۵۰ نانوگرم) بود.

جدول شماره ۱: مشخصات پرایمرهای استفاده شده

منبع	دمای اتصال (سانتیگراد)	طول قطعه (bp)	توالی پرایمر	توالی هدف	هدف
(۲۶، ۲۵)	۶۰	۵۵۹	F:CGGTGTTGCCAGGTTGGTAAT R:ACTCTTGCTGGCGGTGCGACTT	Flic	شناسایی سالمونلا تایفی موریوم
(۲۷)	۴۰	متغیر	F:ATGTAAGCTCCTGGGGATTACAC R:AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG	ERIC region	ERIC-PCR

قدرت تمایزی روش ERIC-PCR با استفاده از معادله Simpson's Index Diversity و براساس فرمول زیر به دست آمد. در این فرمول:

N: تعداد کل سویه‌های مورد مطالعه جهت روش ERIC-PCR؛

S: تعداد تپ‌های ژنتیکی محاسبه شده؛

n: تعداد سویه‌های متعلق به تپ زمی باشد.

برای تجزیه و تحلیل نتایج آزمایش ERIC-PCR، از نرم افزار NTSYS استفاده گردید. مقایسه الگوهای ERIC-PCR به کمک نرم افزار NTSYS انجام شد؛ بدین صورت که وجود باند با عدد یک و عدم وجود باند با عدد صفر در یک ماتریکس کدگذاری شدند. ماتریکس ایجاد شده با نرم افزار NTSYS تجزیه و تحلیل شد و دندوگرام (نشان دهنده تنوع ژنتیکی) با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و الگوریتم UPGMA رسم گردید.

جدول شماره ۲: مشخصات ایزوله‌های سالمونلا انتریکا سرووار تایفی موریوم

شماره سویه	نوع نمونه	کلاستر	شماره سویه	نوع نمونه	کلاستر	شماره سویه	نوع نمونه	کلاستر
۱	مدفوع	E14	۱۷	مدفوع	E13	E15	مدفوع	E15
۲	خون	E14	۱۸	خون	E14	E15	مدفوع	E15
۳	مدفوع	E14	۱۹	مدفوع	E13	E10	مدفوع	E10
۴	خون	E14	۲۰	خون	E14	E10	مدفوع	E10
۵	مدفوع	E11	۲۱	مدفوع	E14	E2	مدفوع	E2
۶	مدفوع	E11	۲۲	مدفوع	E14	E9	مدفوع	E9
۷	مدفوع	E14	۲۳	مدفوع	E14	E9	مدفوع	E9
۸	مدفوع	E4	۲۴	خون	E14	E9	مدفوع	E9
۹	مدفوع	E3	۲۵	مدفوع	E15	E14	خون	E14
۱۰	مدفوع	E3	۲۶	مدفوع	E15	E2	مدفوع	E2
۱۱	مدفوع	E3	۲۷	مدفوع	E15	E2	مدفوع	E2
۱۲	مدفوع	E7	۲۸	مدفوع	E15	E6	مدفوع	E6
۱۳	مدفوع	E13	۲۹	مدفوع	E15	E5	مدفوع	E5
۱۴	مدفوع	E12	۳۰	مدفوع	E15	E5	مدفوع	E5
۱۵	مدفوع	E13	۳۱	مدفوع	E15	E1	مدفوع	E1
۱۶	خون	E12	۳۲	مدفوع	E15	E8	مدفوع	E8

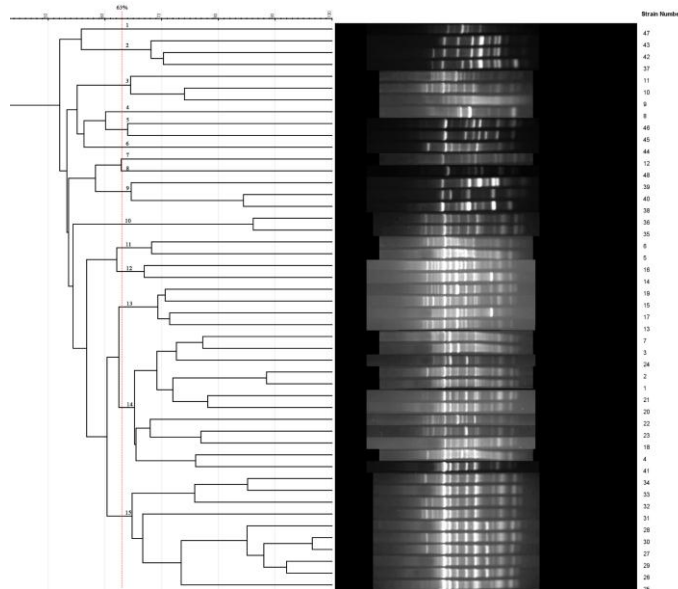
شماره سویه	نوع نمونه	کلاستر	شماره سویه	نوع نمونه	کلاستر	شماره سویه	نوع نمونه	کلاستر
۱	مدفوع	E14	۱۷	مدفوع	E13	E15	مدفوع	E15
۲	خون	E14	۱۸	خون	E14	E15	مدفوع	E15
۳	مدفوع	E14	۱۹	مدفوع	E13	E10	مدفوع	E10
۴	خون	E14	۲۰	خون	E14	E10	مدفوع	E10
۵	مدفوع	E11	۲۱	مدفوع	E14	E2	مدفوع	E2
۶	مدفوع	E11	۲۲	مدفوع	E14	E9	مدفوع	E9
۷	مدفوع	E14	۲۳	مدفوع	E14	E9	مدفوع	E9
۸	مدفوع	E4	۲۴	خون	E14	E9	مدفوع	E9
۹	مدفوع	E3	۲۵	مدفوع	E15	E14	خون	E14
۱۰	مدفوع	E3	۲۶	مدفوع	E15	E2	مدفوع	E2
۱۱	مدفوع	E3	۲۷	مدفوع	E15	E2	مدفوع	E2
۱۲	مدفوع	E7	۲۸	مدفوع	E15	E6	مدفوع	E6
۱۳	مدفوع	E13	۲۹	مدفوع	E15	E5	مدفوع	E5
۱۴	مدفوع	E12	۳۰	مدفوع	E15	E5	مدفوع	E5
۱۵	مدفوع	E13	۳۱	مدفوع	E15	E1	مدفوع	E1
۱۶	خون	E12	۳۲	مدفوع	E15	E8	مدفوع	E8

یافته‌ها

۱۵ کلاستر مجزا قابل تمایز بودند؛ به طوری که در گروه‌های E1، E4، E6، E7 و E8 هر کدام یک ایزوله، در گروه‌های E5، E10، E11 و E12، ۲ ایزوله؛ در گروه‌های E2، E3 و E9، ۳ ایزوله؛ در گروه‌های E13، ۴ ایزوله؛ در گروه E14؛ ۱۲ ایزوله و در گروه E15، ۱۰ ایزوله قرار گرفت (جدول شماره ۲). دندوگرام سروتایپ‌های سالمونلا تایفی موریوم و نتایج حاصل از ERIC-PCR در شکل آمده است.

در این پژوهش از مجموع ۸۹۱ نمونه مدفوع و خون بیماران مبتلا به اسهال، ۴۸ سویه مربوط به سالمونلا تیفی موریوم بود که به منظور تایپینگ مولکولی بررسی شدند.

میانگین سنی افراد تحت مطالعه، ۵۵-۱۵ سال تعیین شد که ۲۵ مورد مرد و مابقی زن بودند. به طور کلی در آنالیز شکل‌ها و دندوگرام حاصل از آنها، تمامی سویه‌ها در سطح تشابه ۶۳٪ به



شکل: نندوگرام حاصل از آزمایش ERIC-PCR با ضریب تشابه جاکارد و روش UPGMA و Cut off 63%.

بحث

نتایج این پژوهش، نشان‌دهنده قدرت روش ERIC-PCR در تایپ‌بندی سالمونلا تایفی موربیوم می‌باشد؛ به طوری که با استفاده از این روش، سویه‌ها به ۱۵ الگوی ژنتیکی متفاوت برپایه ERIC-PCR تقسیم‌بندی شدند.

با وجود قرابت ژنتیکی بسیار نزدیک در جنس سالمونلا، تغییرات گسترده‌ای در بروز بیماری، ویرولانسی و توزیع جغرافیایی وجود دارد (۱۶). کسب یا از دست دادن برخی از ژن‌ها و موتاسیون‌ها می‌تواند نقش مهمی در تکامل تایپ‌های مختلف سالمونلا ایفا کند. ردیابی و بررسی این تغییرات ژنتیکی در جامعه نقش بسیار مهم و حایز اهمیتی دارد، همچنین اطلاعات زیادی در مورد اپیدمیولوژی و شناسایی منابع عفونت، به‌منظور کنترل عفونت و نظارت اپیدمیولوژیک در اختیار ما قرار می‌دهد (۱۴). ژنتیکی موجودات در طول زمان تغییر می‌یابند که یکی از علل اصلی آن جهش و نوترکیبی است. براساس شواهد موجود، سرعت این تغییرات در بین موجودات مختلف یکسان نیست؛ البته سرعت ایجاد ژن‌های جدید با سرعت پخش شدن آنها در جامعه متفاوت است؛ زیرا بسیاری از ژن‌های جهش‌یافته باعث مرگ موجود شده و امکان اشاعه آنها در جامعه نیز وجود ندارد. اما نکته جالب و مهم آن است که سرعت متوسط ایجاد شکل‌های جدید یک ژن در سطح جامعه تقریباً ثابت و قابل محاسبه است که از آن به‌عنوان ساعت مولکولی (Molecular Clock) اسم برده

با توجه به اطلاعات مندرج در جدول شماره ۲ و تعداد تیپ‌های ژنتیکی به‌دست‌آمده، قدرت تمایزی روش ERIC-PCR، ۰/۸۸ محاسبه شد.

با بررسی کلاسترهای مختلف به‌دست‌آمده، مشاهده گردید نمونه‌ها در ۱۵ کلاستر از نظر جنس، همچنین مراکز جداسازی‌شده تقریباً در تمامی گروه‌ها توزیع یکسانی داشتند که نشان می‌دهد سالمونلا تایفی موربیوم در حال چرخش در جامعه است؛ به طوری که در کلاسترهای E1، E7 و E8 نمونه‌ها مربوط به مردان، در E4 و E6 نمونه‌ها مربوط به زنان، در کلاسترهای E10، E11 و E12، یک نمونه مربوط به مردان و یک نمونه مربوط به زنان، در گروه E5 و در کلاسترهای E2 و E9 هر کدام ۲ نمونه مربوط به مردان و یک نمونه مربوط به زنان و در کلاستر E3 همه نمونه‌ها مربوط به زنان، در کلاستر E13، ۲ نمونه مربوط به مردان و ۲ نمونه مربوط به زنان، در کلاستر E14، ۵ نمونه مربوط به مردان و ۷ نمونه مربوط به زنان و در کلاستر E15، ۶ نمونه مربوط به مردان و ۴ نمونه مربوط به زنان بوده است. همچنین از نظر مرکز درمانی جداسازی، مشاهده گردید توزیع کاملاً یکسانی بین کلاسترهای مختلف صورت گرفته، اما از نظر نمونه (براساس جدول شماره ۲) با توجه به اینکه اکثر نمونه‌ها از مدفوع جداسازی شده بودند؛ پراکنش نمونه‌های مدفوع در کلاسترها بیشتر بود، ولی بیش از ۸۵٪ نمونه‌های جداسازی‌شده از خون در کلاستر ۱۴ قرار داشتند.

تمامی ایزوله‌ها با این روش قابل تایپ‌بندی بودند، به طوری که این روش، سویه‌ها را به ۱۵ الگوی ژنتیکی متفاوت تقسیم‌بندی کرد. همچنین در این مطالعه مشاهده گردید برخی از سویه‌ها با الگوی یکسان ERIC-PCR، در مراکز درمانی مختلف یافت می‌شوند که نشان‌دهنده انتقال گسترده باکتری در بین این بیمارستان‌ها بود.

از روش ERIC-PCR در مطالعات پیشین در سراسر دنیا از جمله ایران، برای تایپینگ مولکولی ایزوله‌های سالمونلا استفاده شده است؛ به طوری که Lim و همکاران (در کره جنوبی) با انجام تایپینگ مولکولی ۵۷ سویه سالمونلا به کمک روش

ERIC-PCR، ۵۰ الگوی ERIC-PCR به دست آوردند و نشان دادند این روش برای مطالعات اپیدمیولوژیکی سویه‌ها مفید است (۱۸). در مطالعات دیگری در کشور هند توسط Sexana و همکاران، ۲۴ ایزوله از سرووارهای سالمونلا با روش ERIC-PCR مورد بررسی قرار گرفت و ۲۱ تیپ ژنتیکی به دست آمد، نتایج این پژوهشگران نشان داد این روش قادر است واریانتهای ژنتیکی مختلفی را در سالمونلا تایفی موریوم از هم تمایز دهد (۱۹). Agin و همکاران نیز سویه‌های ۸۶ نمونه مدفوع و خون را جهت شناسایی سالمونلا انتریکا سرووار تایفی موریوم مورد مطالعه قرار دادند و در پی شناسایی سویه‌ها، الگوهای ژنتیکی ارتباط کلونالیتهی را در سویه‌ها با استفاده از روش ERIC-PCR بررسی کردند. در مطالعه این محققان، روش ERIC-PCR توانست سویه‌ها را به ۷ الگوی ژنتیکی تقسیم‌بندی کند (۲۰). همچنین در پژوهش فردصانعی و همکاران بر روی تایپینگ سالمونلا تایفی موریوم، ۱۹۵۰ نمونه مدفوع از بیماران اسهالی مربوط به کودکان زیر ۵ سال در بیمارستان مرکز طبی کودکان بررسی شد که ۵۴٪ سویه‌ها متعلق به سالمونلا انتریتیدیس، ۴٪ متعلق به سالمونلا پاراتیفی A، ۲۳٪ متعلق به پاراتیفی C و ۸٪ متعلق به پاراتیفی D بود که این سویه‌ها دارای ۴ الگوی متفاوت ERIC-PCR بودند (۲۱).

همچنین در مطالعات قبلی، ارزیابی قدرت تمایزی روش ERIC-PCR نیز محاسبه شد که براساس نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر، قدرت تایپینگ روش ERIC-PCR، ۸۳٪ به دست آمد. در مطالعه Gopal و همکاران در هند، تعداد ۱۱۳ سویه سالمونلا بررسی شد که از این تعداد، به صورت تصادفی ۸۹ و

می‌شود (۱۷). بر این اساس می‌توان عنوان کرد هر ژن در هر موجود، یک ساعت مولکولی نسبتاً دقیق و منحصر به فرد دارد. تیپ‌بندی سویه‌های میکروبی جزء لاینفک بررسی‌های اپیدمیولوژیکی بیماری‌های عفونی می‌باشد.

مباحث اپیدمیولوژی پیرامون 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 اپیدمی‌دهنده عوامل میکروبی، تمایز سویه‌های میکروبی به کار گرفته‌شده در همه‌گیری‌های عمدی از سویه‌های اندمیک جامعه، مونیتورینگ اقدامات درمانی، تعیین الگوی مقاومت و حساسیت آنتی‌بیوتیکی و بررسی شکست درمان دارویی می‌باشد (۱۴). دسته‌بندی سویه‌ها در چندین گروه متفاوت (با استفاده از روش ERIC) می‌تواند یک زنگ خطر برای جامعه مورد بررسی باشد؛ از این نظر که گروه‌های متفاوت در ERIC می‌توانند به معنای منشأ تفاوت سویه‌ها و یا الگوهای مقاومت آنتی‌بیوتیکی، متفاوت باشند، لذا در ارائه و تجویز آنتی‌بیوتیک باید به نتایج روش ERIC توجه کرد تا اولاً نتایج درمانی بهتری به دست آید و دوماً با عدم تجویز نامناسب دارو، از بروز مقاومت آنتی‌بیوتیکی بیشتر جلوگیری شود. همچنین در صورتی که براساس نتایج ERIC مشخص گردد سویه‌ها منشأ متفاوتی داشته‌اند می‌توان این نتیجه را برداشت کرد که رعایت نکردن شرایط بهداشتی، همه‌گیری‌های عمدی مانند حملات بیوتروریستی، مصرف خودسرانه آنتی‌بیوتیک‌ها و یا سایر عوامل مؤثر در رفتارهای ژنتیکی باکتری‌ها، موجب ایجاد سویه‌ها با منشأ متفاوت شده است. بر این اساس باید یک جامعه را به طور مدام از نظر تغییر رفتارهای ژنتیکی باکتری‌ها زیر نظر داشت تا بتوان بهترین تصمیمات لازم را جهت جلوگیری از بروز خطرات و تهدیدات بهداشتی گرفت (۱۴، ۱۷). بنابراین، این فرآیند از نظر اپیدمیولوژیکی جهت شناسایی همه‌گیری‌ها، تشخیص منبع عفونت‌ها، ردیابی و شناسایی سویه‌های بیماری‌زا، بررسی پاتوژن‌های کسب‌شده بیمارستانی و ارزیابی روش‌های کنترل عفونت، از اهمیت بالایی برخوردار است (۱۷). یافته‌های این پژوهش نشان داد ERIC-PCR می‌تواند ایزوله‌های سالمونلا تایفی موریوم را به خوبی تمیز دهد؛ چراکه

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر سویه‌های سالمونلا تایفی موریوم دارای الگوهای ERIC متفاوتی بودند که نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی سویه‌های سالمونلا تایفی موریوم در شهر کرمان بود. بنابراین، منشأ این سویه‌ها می‌تواند متفاوت باشد که در حال چرخش بین حیوانات و انسان است. پیدایش سویه‌های جدید و شناسایی کلون‌های کم‌شیوع در مطالعات مولکولار اپیدمیولوژی به لحاظ پیش‌بینی‌های روش‌های کنترل بهداشتی در جهت محدود کردن آن‌ها، از دیگر رویکردهای مفید این مطالعه است. ERIC-PCR، روش مناسبی جهت تایپینگ مولکولی سویه‌های سالمونلا و تعیین کانون‌های شیوع عفونت بوده که می‌توان از آن جهت مطالعات اپیدمیولوژیک و تعیین راهبردهای کنترل عفونت استفاده کرد. لذا لازم است بررسی‌های مستمر، برنامه‌های نظارتی و غربالگری انجام گیرد و نوع سالمونلای غالب یا ژنوتایپ غالب آن جامعه مشخص گردد. 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. به‌طور کلی این شواهد نشان می‌دهد سروتایپ‌های مختلف سالمونلای شایع در ایران نسبتاً ناهمگون بوده و تنوع ژنتیکی بالایی دارند.

۳۳ سویه به ترتیب با روش ERIC-PCR و RAPD مورد ژنوتایپینگ مولکولی قرار گرفتند و قدرت تمایزی این روش‌ها به ترتیب ۰/۷۰ و ۰/۸۹ تعیین شد (۲۲). همچنین رنجبر و همکاران، ۵۷ ایزوله سالمونلا انتریتیدیس را با روش ERIC-PCR مورد ژنوتایپینگ قرار دادند و قدرت تمایزی روش ERIC-PCR را ۰/۷۷ تعیین کردند (۲۳)، که این اعداد نزدیک به عدد محاسبه‌شده در این مطالعه بود (هرچقدر این عدد به ۱ نزدیکتر باشد، نشان‌دهنده میزان بالای قدرت تمایزی روش تایپینگ می‌باشد).

در مطالعه Soria و همکاران در اسپانیا، تعداد ۴۳ سویه از سالمونلا با روش Ribotyping مورد ژنوتایپینگ مولکولی قرار گرفت که قدرت تمایزی این روش ۰/۵۵-۰/۴۴ گزارش شد. بنابراین با توجه به هزینه، وقت و قابلیت در دسترس بودن روش، تکرارپذیری و مقایسه قدرت تمایزی؛ روش ERIC-PCR می‌تواند روش مناسبی جهت ژنوتایپینگ مولکولی سویه‌های سالمونلا باشد (۲۴).

References:

1. Ranjbar R, Salimkhani E, Sadeghifard N, Yazdi JZ, Morovvati S, Jonaidi N, et al. An outbreak of gastroenteritis of unknown origin in Tehran, July 2003. Pak J Biol Sci 2007;10(7):1138-40.
2. Naghoni A, Ranjbar R, Tabaraie B, Farshad S, Owlia P, Safiri Z, et al. High prevalence of integron-mediated resistance in clinical isolates of Salmonella enterica. Jpn J Infect Dis 2010;63(6):417-21.
3. Lopez F, Mercedes Pescaretti, ML Morero R, Delgado M. Salmonella typhimurium general virulence factors: A battle of David against Goliath? Food Res Int 2012;45(2):4-8.
4. Skjolaas KA, Burkey TE, Dritz SS, Minton JE. 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.
5. Muñoz P, Díaz MD, Rodríguez-Créixems M, Cercenado E, Peláez T, Bouza E. Antimicrobial resistance of Salmonella isolates in a Spanish hospital. Antimicrob Agents Chemother 1993;37(5):1200-2.
6. 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.

7. Wray C, McLaren I, Parkinson NM, Beedell Y. Differentiation of *Salmonella typhimurium* DT204c by plasmid profile and biotyping. *Vet Rec* 1987;121(22):514-6.
8. De Bruijn F, Rademaker J, Schneider M, Rossbach U, Louws F. Rep-PCR genomic fingerprinting of plant-associated bacteria and computer-assisted phylogenetic analyses. *APS Press*; 1996. p. 497-502.
9. Louws FJ, Fulbright DW, Stephens CT, de Bruijn FJ. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Appl Environ Microbiol* 1994;60(7):2286-95.
10. Weigel RM, Qiao B, Teferedegne B, Suh DK, Barber DA, Isaacson RE, 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.
11. Chmielewski R, Wieliczko A, Kuczkowski M, Mazurkiewicz M, Ugorski M. 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.
12. 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.
13. Ranjbar R, Hosseini Doust SR. A review of molecular methods used for epidemiological studies of biological agent. *J Mil Med* 2003;5(2):157-64.
14. 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 epidemiologist. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1997;18(6):426-39.
15. Eshraghi S, Soltan Dalall M, Fardsanei F, Zahraei Salehi T, Ranjbar R, Nikmanesh B. *Salmonella* enteritidis and antibiotic resistance patterns: A study on 1950 children with diarrhea. *Tehran Univ Med J* 2010;67(12):876-82. [Full Text in Persian]
16. Stevens A, Kerouanton A, Marault M, Millemann Y, Brisabois A, Cavin J-F, 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.
17. Muin JK, Terri HB, Bernice HC. *Fundamentals of genetic epidemiology*. Oxford: Oxford University Press; 1993.
18. Lim H, Kyung HL, Chong-Hae H, Bahk GJ, Choi WS. Comparison of four molecular typing methods for the differentiation of *Salmonella* spp. *Int J Food Microbiol* 2005;105(3):411-8.
19. Saxena MK, Singh VP, Lakhcharua BD, Taj G, Sharma B. Strain differentiation of Indian isolates of *Salmonella* by ERIC-PCR. *Res Vet Sci* 2002;73(3):313-4.
20. Agin H, Ayhan FY, Gülay Z, Gülfidan G, Yaşar N. The evaluation of clusters of hospital infections due to multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar typhimurium in the neonatal unit: A two-year experience. *Turk J Pediatr* 2011;53(5):517-21.
21. Fardsanei F, Seifi M, Eshraghi S, Zahraei Salehi T, Poorman MR, Ranjbar R, et al. Genotyping of *Salmonella* enteritidis strains isolated from human and food sources by ERIC-PCR and determining their antibiotic resistance patterns. *Trop Infect Dis J*. 2010;15(51):7-13. [Full Text in Persian]
22. 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.
23. 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* 2013;18(2):77-85. [Full Text in Persian]
24. 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.