دوماهنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست- پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال بیستم، شماره ۵، صفحه ۴۳۶– ۴۲۶ (آذر و دی ۱۳۹۶)

Iran South Med J 2017; 20(5): 426-436

Downloaded from ismj.bpums.ac.ir at 12:17 +0330 on Tuesday January 2nd 2018

تایپینگ مولکولی جدایه‌های *سالمونلا انتریکا* سروار *اینفنتیس* با استفاده از روش ERIC-PCR

ابوالفضل مقدم (MSc) [۱]، شهرام نظریان (PhD) [۲*]

[۱] گروه سلولی و مولکولی، دانشکده زیست شناسی،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)

Archive of SID

چکیده

زمینه: *سالمونلا*ها از باکتری‌های مهم خانواده انتروباکتریاسه بوده که از نظر بیوشیمیایی و سرولوژیک بسیار متنوع می‌باشند و عمدتاً از راه مواد غذایی منتقل می‌شوند. گسترش *سالمونلا*های 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 اینفنتیس* می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش از مراکز درمانی مختلف سویه‌های *سالمونلا اینفنتیس* 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 اینفنتیس* جداسازی شد. جدایه‌ها با استفاده از روش ERIC-PCR از نظر ژنوتایپینگ به ۱۴ گروه مختلف دسته‌بندی شدند که بیشترین تعداد سویه در گروه ۵ام (۲۰ درصد،۱۰ سویه) جای گرفتند.

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

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

* تهران، گروه زیست شناسی، دانشکده و پژوهشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران، ایران
Email: kpnazari@ihu.ac.ir

www.SID.ir

Downloaded from ismj.bpums.ac.ir at 12:17 +0330 on Tuesday January 2nd 2018

مقدمه

*سالمونلا*ها 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 باکتریمی 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 *سالمونلا*های 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 بیماری‌زاها 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 سروتایپ‌های *سالمونلا*های 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 بیماری‌زاو 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 (۸-۶).

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 *سالمونلا*های غیرتیفوئیدی توسط روش‌های فنوتیپیک از جمله سروتایپینگ، بیوتایپینگ، کولیسین تایپینگ، بررسی الگوهای مقاومت آنتی‌بیوتیکی و تعیین پروفایل پلاسمیدی انجام می‌شد.

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from ismj.bpums.ac.ir at 12:17 +0330 on Tuesday January 2nd 2018

به علت اینکه روش‌های فنوتیپیک زمان بر، پر هزینه و خسته کننده است، از نظر همه گیرشناسی دارای ارزش محدود بوده و قدرت افتراق‌دهی بین سویه‌هایی با تشابه ژنتیکی زیاد را ندارد (۱۱-۹). 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 سروارهای 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 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 آنتی سرم‌های 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 DNAاز 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 و۳۰ میکرولیتر از بافر SDS ۱۰درصد 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 میکرولیترنمکNaCl ۵ مولار و۸۰ 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 سانتریفیوژگردید. ژنوم موجود در نمونه با استفاده از ایزوپروپانل و استات سدیم ۳ مولار آبگیری شد. رسوب حاوی DNA با اتانول ۷۰ درصد شستشو و در۲۰ میکرولیتربافر TE حل گردید. جهت حذف

www.SID.ir
Archive of SID

Downloaded from ismj.bpums.ac.ir at 12:17 +0330 on Tuesday January 2nd 2018

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 نانودراپ استفاده شد. یک میکرولیتر از نمونه 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).

جدول ۱) مشخصات پرایمرهای استفاده شده

هدف	توالی هدف	توالی پرایمر	طول قطعه (bp)	دمای اتصال (سانتی‌گراد)	منبع
شناسایی *سالمونلا انفنتیس*	fljB	F: AACAACGACAGCTTATGCCG R: CCACCTGCGCCAACGCT	۷۲۴	۵۶	(۲۴)
ERIC-PCR	ERIC region	F:ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC R:AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG	متغیر	۴۰	(۲۵)

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 به‌عنوان کنترل مثبت و از *اسینتوباکتر بومانی* ATCC 19606 به‌عنوان 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، ۰٫۲dNTPs میلی‌مول، پرایمرها هر کدام ۰/۵ میکرومول و ۱ واحد آنزیم Taq پلیمراز، 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 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 میکرولیتربافر 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 برماید 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

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from ismj.bpums.ac.ir at 12:17 +0330 on Tuesday January 2nd 2018

که شامل ۱ میکرولیتر از هرکدام 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 1X بارگزاری شد و به مدت ۴۰ دقیقه با ولتاژ ۱۲۰ ولت الکتروفورز گردید، سپس با رنگ اتیدیوم برماید 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 Simpon's Index Diversity بر طبق فرمول زیر انجام گرفت:

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

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 اینفنتیس* 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 ۱۴گروه مجزا قابل تمایز بودند. به‌طوری که در گروه‌های C1، C8، C10 تا C12 و C14 و هرکدام 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 سروتایپ‌های *سالمونلا اینفنتیس* و نتایج حاصل از ERIC-PCR در شکل ۱ آمده است.

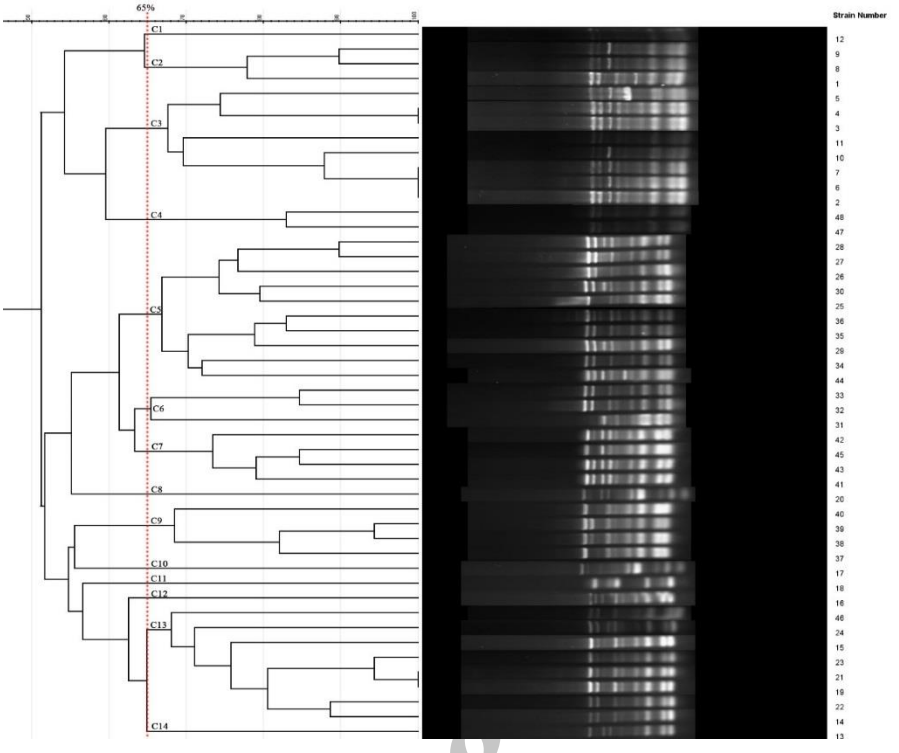
با توجه به اطلاعات مندرج در جدول ۲ و تعداد تیپ‌های ژنتیکی به‌دست آمده، قدرت تمایزی روش ERIC-PCR، ۰/۸۳ محاسبه شد.

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 سروار *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.

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from ismj.bpums.ac.ir at 12:17 +0330 on Tuesday January 2nd 2018



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* سروار *انفنتیس*

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

Archive

www.SID.ir

Downloaded from ismj.bpums.ac.ir at 12:17 +0330 on Tuesday January 2nd 2018

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 سروارهای *سالمونلا* از جمله سروار *اینفنتیس* در مناطق مختلف جهان و همچنین ایران و همچنین تغییرات ژنتیکی در این سروار، تایپینگ مولکولی این سروار 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 به‌عمل 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* فروانی 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* سروار *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.

www.SID.ir
Archive of SID

Downloaded from ismj.bpums.ac.ir at 12:17 +0330 on Tuesday January 2nd 2018

نتایج مطالعه ما نشان داد که روش ERIC-PCR دارای قدرت افتراق‌پذیری مناسبی جهت تمایز ایزوله‌های *سالمونلا اینفنتیس* 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 ریبوتایپینگ 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 ریبوتایپینگ 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 انتریتیدیس* 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 سوریا (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 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 سروارهای *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 انتریتیدیس* 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 انتریتیدیس* انجام شده است به طوری که رنجبر و همکاران تعداد ۵۷ سویه *سالمونلا انتریتیدیس* را توسط ERIC-PCR مورد مطالعه قرار دادند و ۹ الگوی ERIC-PCR به‌دست آورند. 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*

www.SID.ir
Archive of SID

Downloaded from ismj.bpums.ac.ir at 12:17 +0330 on Tuesday January 2nd 2018

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 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.

References:

1.Lasser C, Miller S. Harrisons principles of internalmedicine. 17th ed. Fauci F, Braunwald E, Isselbacher K, editors. New York: McGraw-Hill, 2001, 970-5.

2.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.

3.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)

4.Wilson R, Feldman RA, Davis J, et al. Salmonellosis in infants: the importance of intrafamilial transmission. Pediatrics 1982; 69(4): 436-8.

5.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.

6.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.

7.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.

8.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.

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from ismj.bpums.ac.ir at 12:17 +0330 on Tuesday January 2nd 2018

9.Muńoz 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, Kirchgesner 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

Archive of SID

www.SID.ir

Iran South Med J 2017; 20(5): 426-436

Original Article

Downloaded from ismj.bpums.ac.ir at 12:17 +0330 on Tuesday January 2nd 2018

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 is the important bacteria of the Enterobacteriaceae family that are very diverse biochemically and serologically, and mainly transmitted through food. The spread of non-typhoid Salmonella is one of the challenging issues in current research. Therefore rapid diagnosis and typing of the pathogensprovide efficient information about detection and controlling of infection. The aim of this study is typing the clinical strains of *Salmonella Infantis*.

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

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

Conclusion: Results of this study demonstrated that strains of *Salmonella Infantis* which are examined genetically were diverse which can be due to the prevalence of polyclonal strains in human samples. It was also shown that ERIC-PCR method has great differential power for the molecular typing.

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

Archive of SID

©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

www.SID.ir