مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و یکم/شماره ۲۴۰/هفته دوم مرداد ماه ۱۳۹۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۱/۹
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۴/۱۷

ژنوتایپینگ سویه‌های سالمونلا انتریکا سروتایپ انتریتیدیس جداشده از نمونه‌های بالینی به روش پالس‌فیلد ژل الکتروفورزیس

زینب احمدی[۱]، دکتر رضا رنجبر[۲]، میثم سرشار[۱]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: شیوع عفونت‌های ناشی از سالمونلا انتریکا سروتایپ انتریتیدیس در بسیاری از کشورهای توسعه‌یافته و در حال توسعه در حال افزایش می‌باشد. هدف از این مطالعه بررسی ارتباط ژنتیکی بین سویه‌های سالمونلا انتریتیدیس با استفاده از روش پالس‌فیلد ژل الکتروفورزیس بود.

روش‌ها: در یک مطالعه‌ی توصیفی، طی سال‌های ۸۹-۱۳۸۷ طبق روش استاندارد، سویه‌های سالمونلا انتریکا از بیماران مشکوک به عفونت با سالمونلا از چند بیمارستان در تهران جمع‌آوری گردید. سویه‌های سالمونلا انتریتیدیس با روش‌های استاندارد میکروبی و سرولوژیکی شناسایی گردیدند. ارتباط ژنتیکی میان سویه‌های مورد بررسی با استفاده از روش پالس فیلد ژل الکتروفورزیس مورد آنالیز قرار گرفت.

یافته‌ها: ۴۰ ایزوله‌ی سالمونلا انتریکا سروتایپ انتریتیدیس شناسایی شدند و وارد مطالعه گردیدند. نتایج حاصل از پالس‌فیلد ژل الکتروفورزیس و مشاهده‌ی تشابه باندی ژنتیکی نشان داد که ۳۲ ایزوله (۸۰ درصد) در کلاستر A و ۸ ایزوله (۲۰ درصد) در کلاستر B، که الگوهای ژنتیکی یکسانی داشتند، قرار گرفتند. بر اساس الگوهای پالس‌فیلد مشاهده‌شده، الگویی که بیشترین تکرار را داشت الگوی ۹ باندی بود که در ۲۸ ایزوله (۷۰ درصد) و در کلاستر A قرار گرفت.

نتیجه‌گیری: نتایج به دست‌آمده در این مطالعه، حکایت از آن داشت که سویه‌های در گردش سالمونلا انتریکا سروتایپ انتریتیدیس در بیمارستان‌های مورد مطالعه در تهران، کلون‌هایی با ژنوتایپ نزدیک به یکدیگر داشتند.

واژگان کلیدی: سالمونلا انتریتیدیس، پالس‌فیلد ژل الکتروفورزیس، ژنوتایپینگ

ارجاع: احمدی زینب، رنجبر رضا، سرشار میثم. **ژنوتایپینگ سویه‌های سالمونلا انتریکا سروتایپ انتریتیدیس جداشده از نمونه‌های بالینی به روش پالس‌فیلد ژل الکتروفورزیس.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۲؛ ۳۱ (۲۴۰): ۸۲۹-۸۱۹

مقدمه

باکتری سالمونلا، یکی از اعضای خانواده‌ی انتروباکتریاسه می‌باشد که به صورت باسیل های گرم منفی، بی هوازی اختیاری و متحرک با فلاژل های پری تریش است. سالمونلا انتریکا شامل هفت زیر گونه است که بر اساس آنتی‌ژن‌های فلاژل و سوماتیک به بیش از ۲۶۰۰ سروار تقسیم می‌شود. این باکتری دارای دو گونه‌ی سالمونلا انتریکا و سالمونلا بونگوری می باشد. سالمونلا انتریکا خود به ۶ گونه تقسیم می‌شود که تحت گونه‌ی انتریکا بیشترین سویه‌ی بیماری زای انسانی را در خود جای داده است (۳-۱).

۱- کارشناس ارشد، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌اله (عج)، تهران، ایران
۲- دانشیار، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌اله (عج)، تهران، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر رضا رنجبر
Email: ranjbar@bmsu.ac.ir

www.mui.ac.ir
www.SID.ir

آلودگی‌های انسانی به طور معمول از طریق مصرف غذاهای خام مانند گوشت، تخم مرغ و غذاهای روزانه حاصل می‌شود. عفونت‌های سالمونلا در انسان می‌تواند به صورت گاستروانتریت، تب روده‌ای (تیفوئید یا پاراتیفوئید) و سپتی‌سمی بروز کند (۷-۴). بیش از ۹۰ درصد سروتایپ‌های بیماریزای روده‌ای در انسان مربوط به سروتایپ‌های سالمونلا تیفی، سالمونلا تیفی‌موریوم، سالمونلا اینفنتیس و سالمونلا انتریتیدیس می‌باشند. در طی چند سال گذشته، سروتایپ انتریتیدیس رایج‌ترین سروار از سالمونلا در بسیاری از کشورهای توسعه‌یافته و در حال توسعه از جمله در ایران بوده است (۱۲-۸).

روش‌های معمول تایپینگ سویه‌های سالمونلا، روش‌های سرولوژیکی می‌باشند که به طور عمده بر اساس آنتی‌ژن‌های سومایتک (O)، تاژک‌دار (H) و کپسولی (Vi) یا روش‌های فنوتیپی تایپینگ همانند فاژ تایپینگ، پروفایل حساسیت آنتی‌بیوتیکی و باکتریوسین تایپینگ صورت می‌گیرد. اکثر این روش‌ها دارای محدودیت‌هایی همچون وجود واکنش‌های متقاطع در حین سروتایپینگ، هزینه‌های بالا، تهیه و تولید آنتی‌سرم‌های اختصاصی از حیوانات و عدم دسترسی همه‌ی آزمایشگاه‌ها به امکانات مربوط به آن‌ها می‌باشد (۱۶-۱۳). استفاده از روش‌های تایپینگ مولکولی جهت تعیین گونه عوامل باکتریایی به دلیل اختصاصیت بیشتر، سرعت بالاتر و قابلیت تکرارپذیری از اهمیت بالایی برخوردار است (۱۷). تشخیص کلون‌های سروتایپ‌های مختلف و بررسی ارتباط ژنتیکی میان ایزوله‌های در حال بررسی از ویژگی‌های روش‌های مبتنی بر تایپینگ مولکولی می‌باشد. اثبات ارتباط بین کلون‌های یک پاتوژن این امکان را فراهم می‌کند که منبع آلودگی (انسانی یا محیطی) تشخیص داد و سویه‌های عفونی از سویه‌های غیر عفونی متمایز ساخت (۲۰-۱۸). هدف از مطالعات تایپینگ سویه‌های یک باکتری خاص، به دست آوردن شواهد آزمایشگاهی برای ارتباط ژنتیکی بین سویه‌های جداشده در طی یک شیوع بیمارستانی می‌باشد. همچنین نتایج تایپینگ سویه‌ها در کنترل عفونت کاربرد خواهند داشت (۲۱-۲۰، ۱۳).

روش‌های نوین ژنوتیپی تایپینگ شامل روش‌هایی مانند تایپینگ سکانس تک ناحیه‌ای (SLST یا Single locus sequence typing)، تایپینگ سکانس چند جایگاهی (Multilocus sequence typing یا MLST)، آنالیز چند ناحیه‌ای متغیر (MLVA یا Multiple-Locus Variable number of tandem repeat Analysis)، ژل الکتروفورز شیب غلظت دناتوره‌کننده (DGGE یا Denaturant gradient gel electrophoresis) و پالس‌فیلد ژل الکتروفورزیس (PFGE یا Pulsed-field gel electrophoresis) می‌باشد (۲۶-۲۲)، که در این میان PFGE به عنوان روش استاندارد طلایی تایپینگ با قدرت افتراق‌دهی بالا می‌باشد. قدرت تمایز این روش در مقایسه با سایر روش‌های تایپینگ بسیار برتر است و حتی در مورد برخی از میکروارگانیسم‌ها از روش‌های تایپینگ مبتنی بر PCR (Polymerase chain reaction) نیز قابل استنادتر است (۲۹-۲۷، ۱۶). امروزه با توجه به سیستم‌های کامپیوتری اسکن ژل و نرم‌افزارهای آنالیز آن‌ها و با توجه به ارزشمندی روش PFGE در تمایز، تشخیص و طبقه‌بندی ارگانیسم‌های مسبب بیماری یا

Archive of SID
www.SID.ir

ارگانیسم‌های محیطی تحت مطالعه، می‌توان به بررسی شیوع و بروز بیماری‌ها، منابع آلودگی و ارگانیسم‌های مسبب آن‌ها پرداخت و حتی سویه‌های جدید را در مقایسه با مطالعات فیلوژنتیکی آن‌ها شناسایی نمود (۳۰). با توجه به این که سالمونلوز یکی از مهم‌ترین بیماری‌های ایجادشده توسط سروتایپ‌های غیر تیفوییدی سالمونلا در سراسر جهان می‌باشد و نتایج مطالعات اخیر نشان می‌دهد که ایزوله‌ی سالمونلا انتریکا سروتایپ انتریتیدیس بیشترین فراوانی را در میان سروتایپ‌های غیر تیفوییدی سالمونلا دارد، این مطالعه با هدف تعیین تیپ‌های مولکولی سالمونلا انتریتیدیس ایزوله‌شده از بیماران در شهر تهران به روش PFGE انجام شد.

روش‌ها

در یک مطالعه‌ی توصیفی، طی سال‌های ۱۳۸۷ الی ۱۳۸۹ طبق روش استاندارد، ۱۳۸ سویه‌ی سالمونلا انتریکای جداشده از نمونه‌های مدفوع، خون، ادرار و مایع مفصلی شانه از بیماران مشکوک به عفونت با سالمونلا و دارای علایم گوارشی همچون مسمومیت و اختلالات معدی- روده‌ای از بیمارستان‌های مرکز طبی کودکان و بیمارستان بقیه‌الله الاعظم (عج) جمع‌آوری گردید. در مورد هر نمونه اطلاعاتی مثل سن، جنس، تاریخ نمونه‌گیری، درجه حرارت و سابقه‌ی احتمالی ابتلا یا درمان، تعداد فرزندان، نوع تغذیه و محل سکونت اخذ و ثبت گردید. پس از انتقال نمونه‌ها در شرایط استریل به آزمایشگاه مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، ابتدا بر روی محیط‌های اختصاصی و افتراقی مانند XLD agar (Xylose lysine deoxycholate agar) و SS agar (Salmonella and Shigella agar) کشت و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد (۷-۶). کلونی‌های مشکوک به سالمونلا به محیط کشت سلنیت F انتقال داده شدند و سپس توسط تست‌ها و محیط‌های افتراقی TSI، MRVP، اوره، لیزین آیرون آگار و سیمون سیترات جداسازی شدند و مورد تأیید قرار گرفتند.

پس از انجام آزمون‌های بیوشیمیایی، آزمون سروتایپینگ طبق دستورالعمل شرکت سازنده‌ی آنتی‌سرم‌های پلی‌والان و منووالان سالمونلا (شرکت مرک، آلمان) و با استفاده از جدول کافمن- وایت (Kaufman White) انجام شد و ۴۰ ایزوله‌ی متعلق به سروار سالمونلا انتریتیدیس وارد مطالعه گردید. در نهایت با استفاده از روش فنل- کلروفرم، DNA ژنومیک طبق روش استاندارد، از ایزوله‌ها استخراج شد (۳۲).

برای انجام PFGE ابتدا ایزوله‌های جداشده از بیماران جهت تهیه‌ی سوسپانسیون میکروبی روی محیط کشت Agar LB broth (شرکت سیناژن، ایران) کشت داده شدند و به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در گرم‌خانه‌ی شیکردار ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، قرار داده شدند. برای تهیه‌ی پلاک، در یک میکروتیوب، ۲۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی با ۲۰۰ میکرولیتر از آگارز Low melting (شرکت سیناژن، ایران) مخلوط شد و جهت سفت شدن داخل یخچال قرار داده شد. پس از انتقال این پلاک‌ها به داخل لوله‌ی آزمایش، بافر لیز ES (شامل پروتئیناز K، سارکوزین و EDTA) به آن‌ها اضافه شد و به مدت ۳ ساعت در انکوباتور شیکردار با دمای ۵۵ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفتند. در مرحله‌ی بعد، هر پلاک ۳

Archive of SID
www.SID.ir
www.mui.ac.ir

مرحله با آب مقطر و ۲ بار با بافر TE (محلول تریس و EDTA) شست و شو داده شد. در ادامه جهت هضم آنزیمی و برش DNA ژنومی از اندونوکلئاز XbaI (شرکت Qiagene، آلمان) مطابق با دستورالعمل بهینه‌شده در آزمایشگاه مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌اله (عج) استفاده گردید و عمل هضم آنزیمی در دو مرحله انجام شد (۳۳، ۳۱، ۶). در مرحله‌ی اول، پلاک‌ها ابتدا با ۹۰ سی‌سی آب مقطر و ۱۰ میکرولیتر بافر آنزیم مخلوط شدند و به مدت یک ساعت در بن‌ماری ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس به یک میکروتیوب دیگر انتقال داده شدند و با ۹۰ سی‌سی آب مقطر، ۱۰ میکرولیتر بافر آنزیم و ۳ میکرولیتر آنزیم XbaI مخلوط گردیدند و به مدت یک شبانه روز در بن ماری ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شدند. در ادامه، الکتروفورز در ژل آگارز ۱ درصد در دستگاه CHEF DRII (شرکت BioRad، امریکا) در بافر TBE 0.5X با برنامه‌ی زمان سوییچ اولیه‌ی ۵ ثانیه، زمان سوییچ نهایی ۱۳ ثانیه و زمان اجرای ۲۰ ساعت در ولتاژ ۶ v/cm^{2} انجام شد. در نهایت، ژل در اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شد و پس از شستشو با آب مقطر در دستگاه Gel Doc مورد بررسی و تجزیه و تحلیل قرار گرفت (۳۴-۳۳). پروفایل باندهای DNA با استفاده از نرم‌افزار GelClust و روش ماتریکس فاصله بر اساس مدل UPGMA آنالیز گردید و دندروگرام الگوهای تایپینگ به دست آمده از مجموعه‌ی کلون‌ها، رسم گردید (۳۵). از باکتری Salmonella serotype Braenderup به عنوان سویه‌ی استاندارد و مارکر مولکولی در PFGE استفاده گردید (۶).

یافته‌ها

از مجموع ۱۳۸ ایزوله‌ی سالمونلا انتریکا جداشده از بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان‌های مرکز طبی کودکان و بیمارستان بقیه‌اله (عج)، در نهایت با استفاده از آزمون‌های سروتایپینگ، ۴۰ ایزوله‌ی سالمونلا انتریکا سروتایپ انتریتیدیس (با شیوع ۲۹ درصدی) جداسازی و وارد مطالعه گردید. از این تعداد، ۲۵ مورد (۵۹ درصد) مربوط به مردان و ۱۵ مورد (۴۱ درصد) مربوط به زنان بود. از نظر نوع نمونه، ۹ نمونه از خون، ۲۶ نمونه‌ی از مدفوع، ۱ نمونه از مایع مفصلی شانه و ۴ نمونه نیز از ادرار جدا گردیده بود.

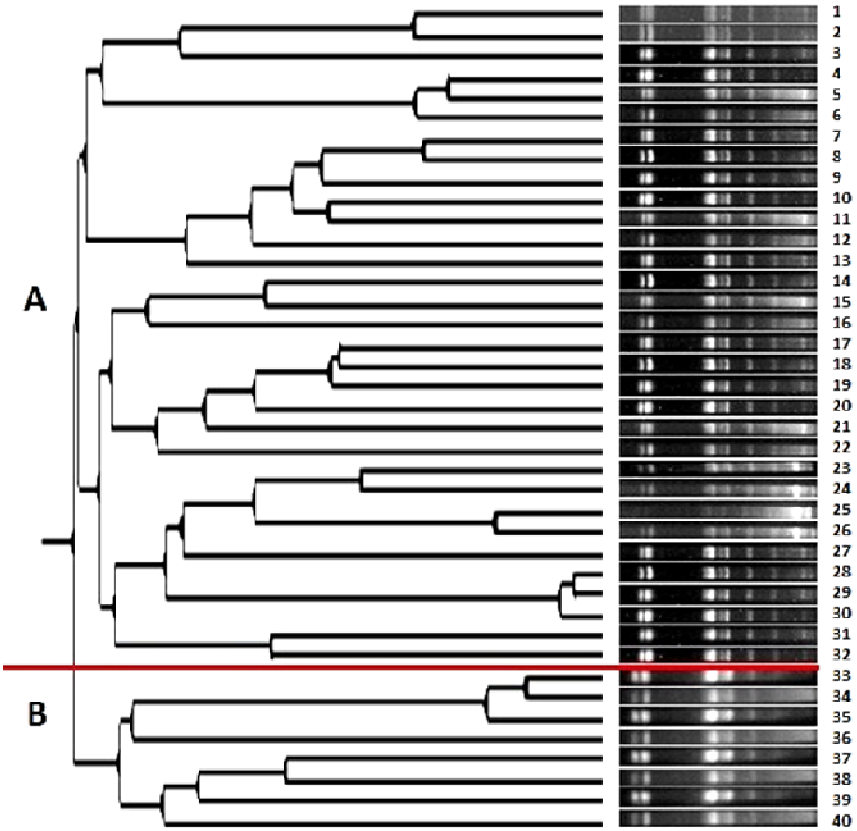
با استفاده از روش PFGE و هضم آنزیمی توسط آنزیم برش‌دهنده‌ی XbaI و مشاهده‌ی تشابه باندی ژنتیکی، از میان ۴۰ ایزوله‌ی سالمونلا انتریکا سروتایپ انتریتیدیس، ۲ الگوی ژنتیکی به دست آمد که در کلاستر A و B دسته‌بندی شدند. در این میان، ۳۲ ایزوله (۸۰ درصد) در کلاستر A و ۸ ایزوله (۲۰ درصد) در کلاستر B، که الگوهای ژنتیکی یکسانی داشتند، قرار گرفتند. طیف اندازه‌ی باندها از ۵۰ کیلو جفت باز تا ۴۵۳ کیلو جفت باز و تعداد باندها از ۶ تا ۹ باند متغییر بود. بر اساس الگوهای مشاهده‌شده، الگویی که بیشترین تکرار را داشت الگوی ۹ باندی بود که در ۲۸ ایزوله (۷۰ درصد) و در کلاستر A تکرار شده بود. در جدول ۱ مشخصات ایزوله‌های سالمونلا انتریتیدیس جداشده از بیماران و در شکل ۱ دندروگرام سروتایپ های سالمونلا انتریتیدیس و نتایج حاصل از PFGE نشان داده شده است.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱. مشخصات ایزوله‌های سالمونلا انتریتیدیس جداشده از بیماران

محل جداسازی	ایزوله‌های جداشده	الگوی پالس‌فیلد
بیمارستان بقیه‌اله (عج)	۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۱۸، ۱۹، ۲۰، ۲۱، ۲۲، ۲۳، ۲۴، ۲۵	A
	۳۳، ۳۴، ۳۵، ۳۶، ۳۷	B
بیمارستان مرکز طبی کودکان	۶، ۷، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۳، ۱۴، ۱۵، ۱۶، ۱۷، ۲۶، ۲۷، ۲۸، ۲۹، ۳۰، ۳۱، ۳۲	A
	۳۸، ۳۹، ۴۰	B



شکل ۱. دندروگرام سروتایپ‌های سالمونلا انتریتیدیس و نتایج حاصل از PFGE (Pulsed-field gel electrophoresis)

بحث

گاستروانتریت شایع‌ترین عفونت سالمونلایی در انسان است که توسط سروتیپ‌های سالمونلا تیفی‌موریوم و انترتیدیس ایجاد می‌شود. باکتری سالمونلا انتریکا سروتایپ انتریتیدیس، مهم‌ترین عامل در ابتلا به بیماری سالمونلوز در انسان می‌باشد؛ به طوری که شیوع عفونت‌های سالمونلا انتریتیدیس به خصوص در دهه‌ی اخیر افزایش یافته است. در حال حاضر در بسیاری از کشورهای دنیا بررسی آلودگی به باکتری سالمونلا انتریتیدیس و تشخیص به موقع آن از آزمایشات مهم صنایع غذایی و مراکز کنترل بیماری‌ها محسوب می‌گردد. همچنین، در بسیاری از کشورهای در حال توسعه، شیوع بیماری‌های ناشی از مواد غذایی و عفونت‌های بیمارستانی ناشی از سالمونلا انتریکا سروتایپ انتریتیدیس کماکان به عنوان یک مشکل مهم بهداشتی

www.SID.ir
www.mui.ac.ir

مطرح می‌باشد (۳۷-۳۶، ۱۱-۱۰، ۵-۴).

استفاده از روش‌های تایپینگ مولکولی برای تیپ‌بندی پاتوژن‌ها در ارتباط‌دهی دقیق بین سوش‌های یک گونه بسیار کارآمد می‌باشد. روش‌های تایپینگ مولکولی نسبت به روش‌های سنتی، واجد قدرت افتراق‌دهی بالاتر، کاربرد وسیع‌تر برای انواع مختلف گونه‌های میکروبی و سرعت بالاتر می‌باشند. با تایپینگ مولکولی می‌توان شیوع‌های عفونت‌های بیمارستانی، مخازن آلودگی ناشی از غذا یا انتشار سویه‌های پاتوژن را شناسایی کرد (۲۱-۱۹، ۱۷، ۱۳).

نتایج به دست‌آمده در مطالعه‌ی حاضر نشان داد، سروتایپ‌های سالمونلا انتریتیدیس جداشده از بیماران در بیمارستان‌های مورد مطالعه، با استفاده از هضم آنزیمی با استفاده از XbaI، دارای دو الگوی پالس‌فیلد بودند و بیشترین الگوی باندی مشترک در میان ایزوله‌های کلاستر A با تعداد ۳۲ ایزوله بود.

در میان نمونه‌های اخذشده از بیماران بیمارستان‌های مرکز طبی کودکان و بقیه‌اله (عج) با توجه به الگوی باندی به دست‌آمده، نتایج نشان‌دهنده‌ی ارتباط میان هر یک از سوش‌های به دست‌آمده در هر یک از بیمارستان‌ها بود، به طوری که ۷۲/۲ درصد ایزوله‌های جداشده از بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان بقیه‌اله (عج) و ۸۶/۴ درصد ایزوله‌های جداشده از بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان مرکز طبی کودکان دارای الگوی پالس‌فیلد A بودند، در حالی که به ترتیب در ۲۷/۸ درصد و ۱۳/۶ درصد از ایزوله‌های جداشده از هر یک از بیمارستان‌های بقیه‌اله (عج) و مرکز طبی کودکان الگوی پالس‌فیلد B مشاهده گردید. مطالعات نشان می‌دهد سوش‌های یکسان سالمونلا با فاکتورهای ویرولانس مشابه ممکن است در مناطق جغرافیایی مختلف پراکندگی متفاوتی داشته باشند که این موضوع نیز باعث به وجود آمدن الگوهای باندی متفاوت در ایزوله‌های این جنس می‌گردد.

Pang و همکاران در تایوان به بررسی روابط خویشاوندی ۱۲۴ ایزوله‌ی سالمونلا انتریکا سروتایپ انتریتیدیس با استفاده از روش پالس‌فیلد پرداختند. نتایج این گروه نشان داد که با استفاده از آنزیم‌های برش‌دهنده‌ی XbaI، SpeI و NotI، ۲۱ الگوی تایپینگ مختلف در ایزوله‌های تحت بررسی به دست آمد که از این میان ۸۴ ایزوله دارای الگوی پالس‌فیلد مشابه بودند (۲۶). این گروه در مطالعه‌ای دیگر به بررسی ۱۰۷ ایزوله‌ی سالمونلا انتریکا سروتایپ انتریتیدیس از نمونه‌های با منشأ حیوانی و مواد غذایی پرداختند. نتایج به دست‌آمده نشان داد الگوی برشی DNA با استفده از آنزیم‌های برشی متفاوت، کمابیش یکسان بود و بیشترین ایزوله‌ها، متعلق به ۳ الگوی باندی X3، S3 و N3 با فراوانی ۴۷/۷، ۴۸/۶ و ۳۹/۳ درصد بود. با بررسی الگوهای مشترک در ایزوله‌های جداشده از منابع مختلف نتایج نشان داد که ایزوله‌های جداشده با منشأ بیماری یکسان، دارای الگوی پالسوتایپ مشترکی بودند (۸).

PFGE دارای قدرت تایپ‌بندی، تکرارپذیری و افتراق‌دهی بالایی می‌باشد و به دلایلی همچون اندازه و تعداد باندهای ایجادشده بر روی ژل که تفسیر نتایج را آسان می‌کند، قدرت تکرارپذیری بالا، قابلیت استفاده برای تمامی پاتوژن‌های انسانی و قدرت افتراق و تمایز میان سوش‌های غیر مرتبط به هم در میان تمامی روش‌های تایپ‌بندی بر پایه‌ی DNA، به عنوان یک روش استاندارد طلایی محسوب می‌گردد.

Archive of SID
www.SID.ir

PFGE، روشی است که در آن برش، حرکت و جا به جایی بخش‌های بزرگ DNA کروموزومی صورت می‌گیرد. این بخش‌ها با توجه به بار الکتریکی منفی گروه فسفات، قادر به حرکت به سوی قطب مثبت در یک میدان الکتریکی می‌باشد (۴۱-۳۸). PFGE مناسب‌ترین و معمول‌ترین روش جهت دسته‌بندی و مطالعه‌ی ارتباط میان سوش‌های یک گونه در مناطق مختلف می‌باشد و ارتباط احتمالی بین ایزوله‌های یک گونه را نشان می‌دهد. مطالعات مختلف نشان می‌دهد قدرت افتراق‌دهی و توانایی بررسی ارتباط خویشاوندی روش PFGE نسبت با سایر روش‌های دیگر تایپینگ همانند ERIC-PCR (Enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR) و ریبوتایپینگ بالاتر می‌باشد (۳۰، ۲۷). Campioni و همکاران نشان دادند که با استفاده از روش PFGE، ۱۲۸ ایزوله‌ی سالمونلا انتریتیدس مورد بررسی در مطالعه‌ی آن‌ها، دارای ۶۸ الگوی باندی متفاوت بودند. این در حالی است که با روش ERIC-PCR، ۵۵ و با استفاده از ریبوتایپینگ ۱۴ الگوی باندی متفاوت ایجاد می‌گردد (۴۲).

نتایج به دست‌آمده در مطالعه‌ی حاضر با برخی مطالعات صورت‌گرفته در سایر کشورها نیز هم‌خوانی داشت. Adesiyun و همکاران به بررسی ۱۲۹ ایزوله‌ی جداشده از بیماران مبتلا به گاستروانتریت، با استفاده از روش پالس‌فیلد ژل الکتروفورزیس پرداختند. هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم‌های برشی XbaI و SpeI به ترتیب ۱۳ و ۸ الگوی مختلف در میان سویه‌های مورد بررسی را نشان داد. همچنین در این مطالعه کلاسترهای به دست‌آمده بر اساس وجود باندها بین ۵۰ تا ۵۵۰ کیلوباز تعیین گردید. الگوی باندی مشاهده‌شده در مطالعه‌ی حاضر نیز بین ۵۰ تا ۴۵۳ کیلوباز بود که مشابه مطالعه‌ی Adesiyun و همکاران بود (۳۴).

نتایج مطالعه‌ی Campioni و همکاران نیز نشان داد، ۱۲۸ ایزوله‌ی سالمونلا انتریکا سروتایپ انتریتیدس جداشده از نمونه‌های انسانی در برزیل، دارای ۶۸ الگوی پالسوتایپ متفاوت بودند. با این وجود مطالعات تکمیلی این گروه نشان داد الگوهای تایپی A، B و C سه گروه اصلی پالس‌فیلد در این ایزوله‌های بودند (۴۲).

نتایج به دست‌آمده در این مطالعه، با نتایج مطالعات Thong و همکاران در مورد تایپینگ ۶۱ ایزوله از سالمونلا انتریتیدیس از نمونه‌های خون و مدفوع به روش PFGE با هضم آنزیم‌های SpeI، XbaI و AvrII هم‌خوانی داشت. به طوری که با استفاده از آنزیم XbaI، ۴ الگوی مختلف و با استفاده از هر دو آنزیم SpeI و AvrII، ۳ الگوی متفاوت به دست آمد. از طرفی، مطالعه‌ی این گروه نشان داد که هر سه الگوی مختلف با سه نوع آنزیم مختلف در ۸۲ درصد موارد با هم مشابه بودند (۱۸).

در ایزوله‌های مورد بررسی در مطالعه‌ی حاضر، بیشتر سویه‌های سالمونلا انتریتیدیس جداشده از بیماران در هر دو بیمارستان تحت بررسی، دارای الگوی ژنتیکی یکسان بودند که نشان می‌دهد از یک کلون به وجود آمده‌اند.

نتیجه‌گیری

نتایج به دست‌آمده در این مطالعه، حکایت از آن داشت که سویه‌های در گردش سالمونلا انتریکا سروتایپ انتریتیدیس در بیمارستان‌های مورد مطالعه

Archive of SID
www.SID.ir

در تهران، به طور عمده متعلق به یک پالسوتایپ خاص بودند و کلون‌های با ژنوتایپ نزدیک به یکدیگر داشتند. با وجود این که از روش PFGE به عنوان یک روش استاندارد طلایی در مطالعات اپیدمیولوژیک عوامل میکروبی نام برده می‌شود، پیشنهاد می‌گردد جهت بررسی‌های جامع روابط خویشاوندی و ارتباط کلونال انواع سروتایپ‌های سالمونلا، از سایر روش‌های مولکولی تایپینگ عوامل میکروبی نیز استفاده گردد.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از یکی از طرح های تحقیقاتی انجام‌شده در مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بقیه اله (عج) بود. بدینوسیله نویسندگان این مقاله از همکاران محترم آزمایشگاه بیولوژی مولکولی کمال تشکر و قدردانی را دارند.

References

1. Ruby T, McLaughlin L, Gopinath S, Monack D. Salmonella's long-term relationship with its host. FEMS Microbiol Rev 2012; 36(3): 600-15.
2. Yue M, Rankin SC, Blanchet RT, Nulton JD, Edwards RA, Schifferli DM. Diversification of the Salmonella fimbriae: a model of macro- and microevolution. PLoS One 2012; 7(6): e38596.
3. Ranjbar R, Sarshar M. Genetic diversity of clinical strains of Salmonella enterica serovar Typhimurium. J Mil Med 2012; 14(2): 143-7.
4. Wain J, Hosoglu S. The laboratory diagnosis of enteric fever. J Infect Dev Ctries 2008; 2(6): 421-5.
5. Lopez FE, de las Mercedes Pescaretti M, Morero R, Delgado MA. Salmonella Typhimurium general virulence factors: a battle of David against Goliath? Food Research International 2012; 45(2): 842-51.
6. Ranjbar R, Giammanco GM, Farshad S, Owlia P, Aleo A, Mammina C. 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.
7. Ranjbar R, Giammanco GM, Aleo A, Plano MR, Naghoni A, Owlia P, et al. Characterization of the first extended-spectrum beta-lactamase-producing nontyphoidal Salmonella strains isolated in Tehran, Iran. Foodborne Pathog Dis 2010; 7(1): 91-5.
8. Pang JC, Chiu TH, Helmuth R, Schroeter A, Guerra B, Tsen HY. A pulsed field gel electrophoresis (PFGE) study that suggests a major world-wide clone of Salmonella enterica serovar Enteritidis. Int J Food Microbiol 2007; 116(3): 305-12.
9. Sarshar M, Ranjbar R, Shahrokhi N, Sadeghifard N, Hassani A, Nasrabadi Z. Detection of Escherichia coli, Salmonella enterica and Shigella dysenteriae by analysis of 23S ribosomal DNA gene. J Isfahan Med Sch 2013; 30(219): 2333-43.
10. Tsen HY, Lin JS, Hsih HY. Pulsed field gel electrophoresis for animal Salmonella enterica serovar Typhimurium isolates in Taiwan. Vet Microbiol 2002; 87(1): 73-80.
11. Ranjbar R, Sarshar M, Morovvati S. A study of ribotype patterns of salmonella enterica serovar enteritidis strains isolated in Tehran, Iran. J Isfahan Med Sch 2012; 30(180): 238-47.
12. Amini K, Zahraei Salehi T, Nikbakht Gh, Ranjbar R, Amini J, Ashrafganjooei ShB. Molecular detection of invA and spv virulence genes in Salmonella enteritidis isolated from human and animals in Iran. Afr J Microbiol Ref 2010; 4(21): 2202-10.
13. Cesare A, Manfreda G. Use of the automated ribotyping for epidemiological Investigations. Ann Microbiol 2002; 52: 181-90.
14. Tenover FC. Plasmid fingerprinting. A tool for bacterial strain identification and surveillance of nosocomial and community-acquired infections. Clin Lab Med 1985; 5(3): 413-36.
15. Landers E, Gonzalez-Hevia MA, Mendoza MC. Molecular epidemiology of Salmonella serotype Enteritidis. Relationships between food, water and pathogenic strains. Int J Food Microbiol 1998; 43(1-2): 81-90.
16. de Oliveira FA, Geimba MP, Pasqualotto AP, Brandelli A, Pasquali G, da Silva WP, et al. Clonal relationship among Salmonella enterica serovar Enteritidis involved in foodborne outbreaks in Southern Brazil. Food Control 2009; 20(6): 606-10.
17. Ranjbar R, Sarshar M, Sadeghifard N. Characterization of genetic diversity among

Archive of SID
www.SID.ir

clinical strains of Salmonella enterica serovar infantis by ribotyping method. J Zanjan Uni Med Sci 2012; 20(81): 75-84. [In Persian].
18. Thong KL, Ngeow YF, Altwegg M, Navaratnam P, Pang T. Molecular analysis of Salmonella enteritidis by pulsed-field gel electrophoresis and ribotyping. J Clin Microbiol 1995; 33(5): 1070-4.
19. Ridley AM, Threlfall EJ, Rowe B. Genotypic characterization of Salmonella enteritidis phage types by plasmid analysis, ribotyping, and pulsed-field gel electrophoresis. J Clin Microbiol 1998; 36(8): 2314-21.
20. Grimont F, Grimont PA. Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. Ann Inst Pasteur Microbiol 1986; 137B(2): 165-75.
21. Ranjbar R, Mirzaee A. Determining of the variety of genotypes in Salmonella typhimurium by ERIC-PCR. J Babol Univ Med Sci 2013: 15(1): 51-7. [In Persian].
22. Stull TL, LiPuma JJ, Edlind TD. A broad-spectrum probe for molecular epidemiology of bacteria: ribosomal RNA. J Infect Dis 1988; 157(2): 280-6.
23. Leekitcharoenphon P, Lukjancenko O, Friis C, Aarestrup FM, Ussery DW. Genomic variation in Salmonella enterica core genes for epidemiological typing. BMC Genomics 2012; 13: 88.
24. Stepan RM, Sherwood JS, Petermann SR, Logue CM. Molecular and comparative analysis of Salmonella enterica Senftenberg from humans and animals using PFGE, MLST and NARMS. BMC Microbiol 2011; 11: 153.
25. Noda T, Murakami K, Asai T, Etoh Y, Ishihara T, Kuroki T, et al. Multi-locus sequence typing of Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis strains in Japan between 1973 and 2004. Acta Vet Scand 2011; 53: 38.
26. Pang JC, Chiu TH, Chiou CS, Schroeter A, Guerra B, Helmuth R, et al. Pulsed-field gel electrophoresis, plasmid profiles and phage types for the human isolates of Salmonella enterica serovar Enteritidis obtained over 13 years in Taiwan. J Appl Microbiol 2005; 99(6): 1472-83.
27. Swaminathan B, Barrett TJ, Hunter SB, Tauxe RV. PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. Emerg Infect Dis 2001; 7(3): 382-9.
28. Tsen HY, Lin JS. Analysis of Salmonella enteritidis strains isolated from food-poisoning cases in Taiwan by pulsed field gel electrophoresis, plasmid profile and phage typing. J Appl Microbiol 2001; 91(1): 72-9.
29. Rivoal K, Protais J, Queguiner S, Boscher E, Chidaine B, Rose V, et al. Use of pulsed-field gel electrophoresis to characterize the heterogeneity and clonality of Salmonella serotype Enteritidis, Typhimurium and Infantis isolates obtained from whole liquid eggs. Int J Food Microbiol 2009; 129(2): 180-6.
30. Fromin N, Hamelin J, Tarnawski S, Roesti D, Jourdain-Miserez K, Forestier N, et al. Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns. Environ Microbiol 2002; 4(11): 634-43.
31. Adesiyun A, Carson A, McAdoo K, Bailey C. Molecular analysis of Salmonella enteritidis isolates from the Caribbean by pulsed-field gel electrophoresis. Rev Panam Salud Publica 2000; 8(5): 342-7.
32. 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.
33. Farahani N, Mirnejad R, Ahmadi Z, Amirmozafari N, Masjedian F. Molecular Typing of Acinetobacter baumannii Clinical Strains in Tehran by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. J Fasa Univ Med Sci 2013; 2(4): 259-65. [In Persian].
34. Olsen JE, Skov MN, Threlfall EJ, Brown DJ. Clonal lines of Salmonella enterica serotype Enteritidis documented by IS200-, ribo-, pulsed-field gel electrophoresis and RFLP typing. J Med Microbiol 1994; 40(1): 15-22.
35. Khakabimamaghani S, Najafi A, Ranjbar R, Raam M. GelClust: A software tool for gel electrophoresis images analysis and dendrogram generation. Comput Methods Programs Biomed 2013; 111(2): 512-8.
36. Ben-Darif E, Jury F, De PE, Threlfall EJ, Bolton FJ, Fox AJ, et al. Development of a multiplex primer extension assay for rapid detection of Salmonella isolates of diverse serotypes. J Clin Microbiol 2010; 48(4): 1055-60.
37. 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.
38. Anvarinejad M, Farshad Sh, Hoseini M. Comparison of genetic patterns of E. coli strains isolated from patients with cystitis and pyelonephritis, using pulsed field gel electrophoresis. J Kerman Univ Med Sci 2011; 18(3): 207-17. [In Persian].
39. Anvarinejad M, Farshad Sh, Alborzi A, Ranjbar R, Hoseini M. Pulsed field gel electrophoresis protocol for typing of uropathogenic

Archive of SID
www.SID.ir

Escherichia coli. J Jahrom Univ Med Sci 2011; 9(2): 1-7 [In Persian].

40. Zou W, Lin WJ, Foley SL, Chen CH, Nayak R, Chen JJ. Evaluation of pulsed-field gel electrophoresis profiles for identification of Salmonella serotypes. J Clin Microbiol 2010; 48(9): 3122-6.

41. Murase T, Okitsu T, Suzuki R, Morozumi H, Matsushima A, Nakamura A, et al. Evaluation of DNA fingerprinting by PFGE as an epidemiologic tool for Salmonella infections. Microbiol Immunol 1995; 39(9): 673-6.

42. Campioni F, Moratto Bergamini AM, Falcao JP. Genetic diversity, virulence genes and antimicrobial resistance of Salmonella Enteritidis isolated from food and humans over a 24-year period in Brazil. Food Microbiol 2012; 32(2): 254-64.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Isfahan Medical School
Received: 28.01.2013
Vol. 31, No. 240, 2nd Week, August 2013
Accepted: 08.07.2013

Genotyping of *Salmonella Enterica* Serovar Enteritidis Strains Isolated from Clinical Samples by Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)

Zeinab Ahmadi MSc[1], Reza Ranjbar PhD[2], Meysam Sarshar MSc[1]

Original Article

Abstract

Background: The infections caused by *Salmonella enterica* serovar enteritidis (*Salmonella enteritidis*) have been increasing in developed and developing countries. The aim of this study was to investigate the genetic relationship between the strains of *Salmonella enteritidis*.

Methods: In a descriptive study from 2008 to 2010, clinical *Salmonella enteritidis* strains were collected from the patients referred to different hospitals in Tehran. The strains identified by biochemical and serological methods. Genetic relationships between the isolates were investigated using pulsed field gel electrophoresis (PFGE) method.

Findings: Of 40 *Salmonella enteritidis* isolated strains, two PFGE profiles were obtained which among them, 32 (80%) and 8 (20%) of isolates belonged to cluster A and cluster B, respectively. Based on PFGE patterns, 28 (70%) strains exhibited nine bands and were belonged to cluster A.

Conclusion: The result of this study indicated that isolated *Salmonella enteritidis* strains belonged to the closed clones.

Keywords: *Salmonella enteritidis*, Genotyping, Pulsed-field gel electrophoresis

Citation: Ahmadi Z, Ranjbar R, Sarshar M. **Genotyping of *Salmonella Enterica* Serovar Enteritidis Strains Isolated from Clinical Samples by Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE).** J Isfahan Med Sch 2013; 31(240): 819-29

Archive

1- Molecular Biology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2- Associate Professor, Molecular Biology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
Corresponding Author: Reza Ranjbar PhD, Email: ranjbar@bmsu.ac.ir

www.SID.ir