گوناگونی ژنتیکی ایزوله های *سالمونلا انتریکا* سرووار *انتریتیدیس* جمع آوری شده از مراکز درمانی شهر کرمان با استفاده از روش ERIC-PCR

ابوالفضل مقدم[1]، شهرام نظریان[2*]

۱-کارشناس ارشد زیست شناسی گرایش سلولی و مولکولی.
۲-استادیار مرکز تحقیقات زیست شناسی.

۱-گروه زیست شناسی سلولی مولکولی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
۲-مرکز تحقیقات زیست شناسی، دانشکده و پژوهشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران، ایران.

*نویسندهٔ مسؤول:
شهرام نظریان، مرکز تحقیقات زیست شناسی، دانشکده و پژوهشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران، ایران
تلفن: ۰۲۱۷۷۱۰۴۹۳۴
Email:kpnazari@ihu.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: سالمونلوز یکی از مهمترین بیماری های عفونی مشترک انسان و حیوانات است. *سالمونلا انتریتیدیس* یکی از رایجترین سروتایپ هایی است که باعث گاستروانتریت در انسان می شود. مطالعات اپیدمیولوژیک و تایپینگ مولکولی سویه های سالمونلا می-تواند استراتژی های پیشگیری بیماری های عفونی و اقدامات کنترلی را بهبود بخشد. هدف از مطالعه حاضر، ارزیابی تنوع ژنتیکی سویه های سالمونلا انتریکا سرووار انتریتیدیس جدا شده از نمونه های انسانی به روش ERIC-PCR بود.

روش بررسی: در این مطالعه مقطعی سویه های سالمونلا از بیماران مراجعه کننده به مراکز درمانی شهر کرمان جداسازی شد. شناسایی سویه های انتریتیدیس با استفاده از روش های استاندارد میکروبیولوژی و بیوشیمیایی و سروتایپینگ انجام شد.تایپینگ مولکولی سویه ها با روش ERIC-PCR مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: ۴۸ سویه به عنوان سالمونلا انتریکا سرووار انتریتیدیس تائید شد. آنالیزهای ERIC-PCR سویه‌ها را در ۱۳ خوشه دسته بندی کرد(E1-E13). ۱۸ سویه (۳۷. ۵ درصد،) با داشتن الگوی مشابه در کلاسترهای E9 و E13 قرار گرفتند.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که سویه های سالمونلا انتریتیدیس از نظر ژنتیکی ناهمگون بوده و می توان آنها را به خوشه‌های مختلف ERIC نسبت داد. نتایج مشخص کرد که ERIC-PCR روشی مناسب برای تمایز ژنوتیپی سویه های جدا سازی شده *S.enteritidis* است.

کلید واژگان: *سالمونلا انتریتیدیس*، تایپینگ مولکولی، ERIC-PCR

دریافت مقاله: ۱۳۹۵/۸/۱۰ **دریافت مقالهٔ اصلاح‌شده: ۱۳۹۵/۱۲/۲۲** **اعلام قبولی: ۱۳۹۶/۲/۳**

مقدمه

گونه های سالمونلا، باکتری های گرم منفی و جزء عوامل بیماری زای ایجاد کننده گاستروانتریت و منتقله از راه مواد غذایی هستند. سالمونلوز یکی از مهمترین بیماری های باکتریایی روده ای است که توسط گونه های *سالمونلا* ایجاد شده و در سرتاسر جهان میلیون ها انسان و حیوان را درگیر می کند(۱-۳). سروتیپ های *سالمونلا* به دو دسته *سالمونلا* تیفوئیدی و *سالمونلا* غیر تیفوئیدی تقسیم می شوند که معمولا نوع غیر تیفوئیدی باعث ایجاد گاستروانتریت های خود محدود شونده در میزبان های سالم می شوند. گاسترانتریت حاد، تب روده ای تیفوئید یا پاراتیفوئید و عفونت های سیستمیک، از جمله موارد ایجاد شده توسط سروتایپ های *سالمونلا تیفی‌موریوم* و *انتریتیدیس* هستند. مطالعات اپیدمیولوژیک در کشورهای مختلف نشان دهنده افزایش عفونت *سالمونلا انتریتیدیس* در سال های اخیر است. بر طبق گزارش سازمان WHO از سال ۱۹۹۰ *سالمونلا انتریتیدیس* شایعترین عامل گاستروانتریت در نظر گرفته می شود(۴)، در حالی که پیش از آن *سالمونلا تیفی‌موریوم* به عنوان عامل اصلی گاستروانتریت شناخته می شد(۵).

به منظور نظارت اپیدمیولوژیک موثر و کنترل *سالمونلا*، اطلاعات دقیقی در مورد گوناگونی ژنتیکی و تایپینگ سویه های مختلف *سالمونلا* مورد نیاز است. قبل از ابداع روش های 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 اپیدمیولوژیک در مورد عفونت های سالمونلاهای غیر تیفوئیدی توسط روش های فنوتیپیک از جمله سروتایپینگ، بیوتایپینگ، کولیسین تایپینگ، بررسی الگوهای مقاومت آنتی بیوتیکی و تعیین پروفایل پلاسمیدی انجام می شد. به علت اینکه روش های فنوتیپیک زمان بر، پر هزینه و خسته کننده است، از نظر اپیدمیولوژیک دارای ارزش محدود بوده و قدرت افتراق دهی بین سویه هایی که ارتباط بسیار نزدیکی باهم دارند را ندارد(۶-۸). روش های مولکولی مبتنی بر DNA برای شناسایی و طبقه بندی میکروب ها، وابستگی کمتری به عوامل متغییر و موثر در رشد باکتری داشته و در مدت زمان کوتاه تر و با انعکاس روابط فیلوژنی بین جدایه های مختلف، می‌تواند آنها را در گروه های خاص قرار دهد. در حال حاضر از روش هایی مانند Repetitive Element Palindromin (REP-PCR) (9,10)، pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) (9,11)، Ribotyping(12,13)، Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) و RFLP (14,15) برای تفریق سویه های *سالمونلا* به کار گرفته می‌شود. در بین روش های مختلفی که بر پایه DNA جهت ژنوتایپینگ سویه ها وجود دارد بسیاری از آنها زمان بر بوده، از نظر اقتصادی مقرون به صرفه نبوده و دارای قدرت افتراق دهی مناسبی نیستند. به عنوان مثال PFGE اگرچه دارای قدرت تفکیک و تمایز بالایی بوده و همچنین بسیار تکرار پذیر می باشد، با این حال به ۳تا ۴ روز زمان نیاز داشته و نسبتا هزینه بر می باشد. درحالی که از ویژگی های مهم روش ERIC-PCR می توان در دسترس بودن، سرعت بالا، راحتی استفاده و قابل انجام بودن در هر آزمایشگاه است. تایپینگ بر اساس REP-PCR نیز روشی معتبر، تکرار پذیر و سریع بوده و قدرت تفکیک کنندگی بالایی در میان جدایه های باکتری ها برخوردار است(۱۶ و ۱۷).

سه گروه از توالی های تکرار شونده پراکنده در ژنوم باکتری ها، که به شکل وسیعی در بررسی تنوع و شناسایی گونه ها و زیرگونه ها کاربرد داشته و استفاده از آنها رو به فزونی است شامل توالی های REP، BOXها و ERIC می باشد. الگوی ژنومی به دست آمده توسط روش های BOX-PCR، REP-PCR و ERIC-PCR برای جدایه

ها و پاتووارها، اختصاصی عمل کرده و تایپینگ حاصل از rep-PCR ابزار تشخیصی مناسبی به منظور گروه‌بندی، شناسایی و بررسی سیر تکاملی پاتوارها بوده است(۱۸). ژنوم باکتری های خانواده انتروباکتریاسه شامل توالی‌های تکراری داخل ژنی (ERIC) است. این توالی ها و تفاوت در تکرار آنها به عنوان یک ابزار بیولوژیک مولکولی برای بررسی ژنتیکی خانواده انتروباکتریاسه از جمله سالمونلا کاربرد داد. این توالی ها در ابتدا در *E.coli* و سپس در *سالمونلا انتریکا* گزارش شدند(۱۹). توالی های ERIC در واقع توالی های 124-127bp هستند که واجد یک ناحیه معکوس تکرار شوند مرکزی حفاظت شده بوده که به شکل خارج ژنی در ژنوم باکتری های روده ای موجود بوده و پرایمر های مورد استفاده در ERIC-PCR مکمل این توالی ها هستند و برای ژنوتایپینگ باکتری های گرم منفی روده ای مانند گونه های *سالمونلا* بکار می رود. این روش یک روش ارزشمند و کارا جهت تایپینگ مولکولی سویه های مربوط به جنس *سالمونلا* ارزیابی شده است (۲۱،۲۰،۹).

از آنجایی که سالمونلوز یک تهدید عمومی برای سلامت جامعه می باشد بررسی رفتارها و تغییرات ژنتیکی این باکتری در جامعه ضروری به نظر میرسد. از این رو با توجه به شیوع سروتایپ *سالمونلا انتریتیدیس*، این مطالعه به منظور بررسی تنوع ژنوتایپی سویه های جداسازی شده این سروتایپ از بیماران مراجعه کننده به مراکز درمانی شهر کرمان با استفاده از روش ERIC-PCR صورت گرفت.

روش بررسی

ایزوله های باکتریایی: بر اساس طرح تحقیقاتی به شماره ۳۱۳۴ ،در یک مطالعه مقطعی از بهمن ماه سال ۱۳۹۳ تا مردادماه سال ۱۳۹۴، ۵۶۷ نمونه از بیماران مبتلا به اسهال و استفراغ حاد مراجعه کننده به مراکز درمانی و بیمارستان های مختلف کرمان گرفته شد. نمونه ها برای شناسایی جنس *سالمونلا* با روش های استاندارد سرولوژی و باکتریولوژی در محیط راپاپورت واسیلیادیس (مرک آلمان) در مجاورت یخ به آزمایشگاه میکروبیولوژی منتقل شدند. کشت اولیه و افتراقی نمونه ها روی محیط‌های افتراقی سالمونلا-شیگلا (SS) آگار و بیسموت سولفیت آگار انجام شد و سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. با تست های بیوشیمیایی و محیط های افتراقی مانند TSI، MR-VP، لیزین آیرون آگار، سیمون سیترات و اوره (مرک آلمان)، کلنی های مشکوک به *سالمونلا* بررسی شدند. سپس استفاده از، آزمون‌های سروتایپینگ با آنتی سرم های O و H تعیین هویت سویه تکمیل گردید(۲۲). واکنش آگلوتیناسیون به عنوان واکنش مثبت ثبت شد.

استخراج DNA: به منظور استخراج DNA از روش Cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) استفاده شد(۲۳). برای تخلیص DNA، بافر TE به رسوب باکتری اضافه و همگن شد. مقدار ۳ میکرولیتر آنزیم پروتئیناز K با غلظت ۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و ۳۰ میکرولیتر از SDS ۱۰درصد به میکروتیوب اضافه و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از گرمخانه‌گذاری، ۱۰۰ میکرولیتر محلول کلرید سدیم ۵ مولار و ۶۰ میکرولیتر از CTAB/NaCl اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در ادامه با استفاده از مخلوط کلروفرم-ایزوآمیل الکل(به نسبت ۱:۲۴) پروتئین ها حذف و با استفاده از ایزوپروپانول سرد، رسوب دادن DNA رسوب داده شد. شستشو با اتانول ۷۰ درصد انجام گرفت و پس از حذف الکل، رسوب خشک‌شده در ۳۰ میکرولیتر بافر TE و ۲ میکرولیتر آنزیم RNaseA با غلظت۱۰ میلی‌گرم در میلی-لیتر حل گردید. برای ارزیابی DNA تخلیص شده از روش الکتروفورز روی ژل آگارز استفاده شد. پس از اطمینان از

خلوص مناسب DNA، نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سانتی-گراد نگهداری شدند.

برای اندازه گیری غلظت نمونه های استخراج شده، از دستگاه نانودراپ و طول موج ۲۶۰و ۲۸۰ نانومتراستفاده گردید.

واکنش PCR: طبق بررسی های به عمل آمده و مرور مطالعات انجام شده قبلی توسط سایر محققین، جفت پرایمر های اختصاصی برای شناسایی *سالمونلا انتریتیدیس* انتخاب گردید (جدول ۱). جهت اطمینان از عملکرد پرایمرهای مورد استفاده، با استفاده از نرم افزار Oligo 5 برخی ویژگیهای پرایمرها مانند میزان GC، دمای Tm،احتمال تشکیل لوپ و جفت شدگی بررسی شد. پرایمرها توسط شرکت سینا کلون سنتز گردید.

به منظور اطمینان از صحت عملکرد PCR از *سالمونلا انتریتیدیس* ATCC 13076 بعنوان کنترل مثبت و از *Acinetobacter baumanii* ATCC 19606 بعنوان کنترل منفی استفاده شد.به منظور بهینه سازی روش PCR، مقادیر و غلظت های 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 بافرPCR (10X) ۲ میکرولیتر، ۰,۲dNTPs میلی مول، پرایمر ها هرکدام ۰,۵ میکرومولار و ۱ واحد آنزیم Taqپلیمراز، MgCl2 ۲ میلی مول ، DNA الگو ۱۵۰ نانوگرم و آب مقطر استریل ۱۰,۵میکرولیتر راه اندازی گردید.

واکنش PCR با ۳۵ سیکل شامل مرحله واسرشت در درجه حرارت ۹۵ درجه سانتیگراد و ۴۰ثانیه، 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. محصولات PCR بر روی ژل آگارز لود و در بافر TBE، تحت ولتاژ ۱۰۰ و به مدت ۴۵ دقیقه الکتروفورز گردید. از با محلول اتیدیوم بروماتید با غلظت ۰,۵ میکروگرم در میلی لیتر برای رنگ آمیزی ژل استفاده شد. مشاهده و تصویر برداری با دستگاه ژل داک انجام گرفت.

واکنش ERIC-PCR:

سویه های شناسایی شده *سالمونلا انتریتیدیس* 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 که شامل ۱ میکرولیتر (۱۰پیکومول) از هرکدام از پرایمر ها،۱۰ میکرولیتر مسترمیکس Amplicon 2X، ۴ میکرولیتر آب دیونیزه و ۴ میکرولیتر DNA الگوی استخراج شده (۱۵۰ نانوگرم) بود.

واکنش PCR طی ۳۵ سیکل انجام شد. در ابتدای شروع واکنش به منظور واسرشت کردن رشته های DNA الگو، دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه اعمال شد و سپس توالی های DNA هدف طی ۳۵ چرخه شامل واسرشته سازی در ۹۵ درجه سانتی گراد و به مدت ۴۰ ثانیه،اتصال پرایمرها در ۵۶ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه و گسترش در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه تکثیر شدند. در انتها نیز مرحله تکثیر نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد انجام شد. نتیجه حاصل از واکنش PCR روی ژل آگارز الکتروفورز گردید.

تجزیه و تحلیل نتایج آزمایش ERIC-PCR توسط نرم افزار NTSYS:

مقایسه الگوهای ERIC-PCR توسط نرم افزار NTSYS انجام گرفت بدین صورت که وجود باند با عدد ۱ و عدم وجود باند با عدد ۰ در یک ماتریکس کد گذاری 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 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 سویه های مورد مطالعه جهت روش ERIC-PCR، S تعداد تیپ های ژنتیکی محاسبه شده، n_j تعداد سویه های متعلق به تیپ j است.

یافته‌ها

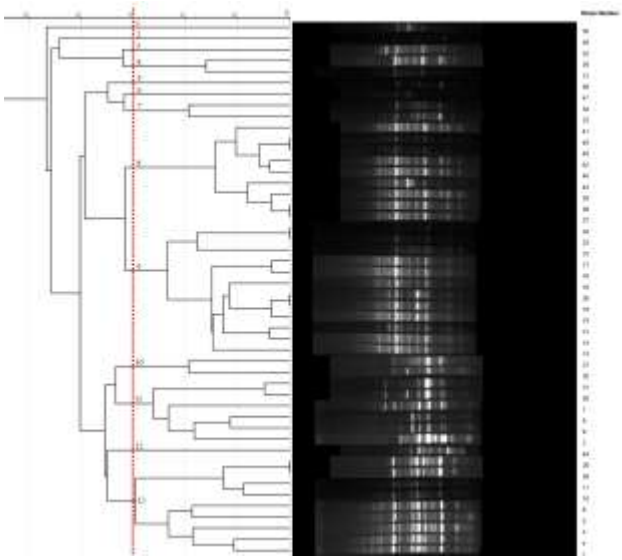
نتایج شناسایی سویه ها:

شناسایی سویه ها: در این پژوهش ۵۶۷ نمونه مدفوع و خون بیماران مبتلا به گاستروانتریت جداسازی گردید. از نظر خصوصیات مورفولوژی و تست های بیوشیمایی سویه به عنوان سالمونلا تعیین هویت شدند. نتایج سروتایپینگ بر روی نمونه های مثبت نشان داد که ۴۸ سویه جدا شده از ۱۰ نمونه خون و ۳۸ نمونه مدفوع *سالمونلا انتریتیدیس* بود. تکثیر قطعه ۳۰۴ جفت بازی مربوط به ژن *Sdf I* در ۴۸ سویه، نیز تائید کننده جداسازی *سالمونلا انترتیدیس* بود. نمونه های مثبت برای تایپینگ مولکولی مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج ERIC-PCR:

میانگین سنی افراد تحت مطالعه ۱۵-۵۵ سال که ۲۷ مورد (۵۶٪) مرد و مابقی زن بودند. به طور کلی با آنالیز شکل ها و دندوگرام حاصل از آنها، تمامی سویه ها در سطح تشابه ۷۰ درصدبه ۱۳ کلاستر مجزا قابل تمایز بودند. به طوری که در گروه های E1تاE3، E5، E6 و E12 هرکدام یک ایزوله، دو ایزوله در گروه E4، دو ایزوله در گروهE7، نه ایزوله در گروه E9، دو ایزوله در گروه E10، شش ایزوله در گروه E11، نه ایزوله در گروه E13 قرار گرفتند (جدول ۲). تعداد باندهای موجود در هر نمونه بین ۶ تا ۱۵ عدد بود که اندازه این باندها در گروه های E4,E8,E9,E11 و E13 بین ۲۰۰bpتا ۳۵۰۰bp ، در گروه های E1 و E3 بین ۲۰۰bp تا ۳۰۰۰bp، در گروه E2 بین ۳۵۰bp تا ۱۵۰۰bp، در گروه E6 بین ۵۰۰bp تا ۳۵۰۰bp، در گروه E7 بین ۲۰۰bp تا ۲۰۰۰bp، در گروه E10 بین ۴۰۰bp تا ۲۰۰۰bp و در گروه E12 بین ۲۰۰bp تا ۱۵۰۰bpبود. دندوگرام سروتایپ های *سالمونلا انتریتیدیس* و نتایج حاصل از ERIC-PCR در شکل ۱ آمده است.

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



شکل ۱: دندوگرام حاصل از آزمایش ERIC-PCR با ضریب تشابه جاکارد و روش UPGMA و Cut off ۷۰ درصد که نمونه ها به ۱۳ گروه تقسیم شده اند. الکتروفروز نمونه های PCR بر روی ژل آگارز ۲ درصد انجام شده است.

جدول ۱: مشخصات پرایمر های استفاده شده

منبع	دمای اتصال (سانتیگراد)	طول قطعه(bp)	توالی پرایمر F=فرادست،R=فرودست	توالی هدف	هدف
(۳۵،۳۶)	۵۶	۳۰۴	F:TGTGTTTTATCTGATGCAAGAGG R:TGAACTACGTTCGTTCTTCTGG	Sdf I	شناسایی سالمونلا انتریتیدیس
(۳۷)	۴۰	متغییر	F:ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC R:AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG	ERIC region	ERIC-PCR

جدول ۲: مشخصات ایزوله های سالمونلا انتریکا سرووار انترتیدیس (ب ۱: بیمارستان افضلی پور، ب۲: بیمارستان ارجمند، ب ۳: بیمارستان باهنر)

شماره سویه و بیمارستان	نوع نمونه	کلاستر	شماره سویه و بیمارستان	نوع نمونه	کلاستر	شماره سویه و بیمارستان	نوع نمونه	کلاستر
۱ (ب ۱)	مدفوع	E13	۱۷(ب۱)	مدفوع	E9	۳۳(ب۲)	مدفوع	E7
۲ (ب ۱)	مدفوع	E11	۱۸(ب۱)	مدفوع	E9	۳۴(ب۲)	مدفوع	E7
۳ (ب ۱)	مدفوع	E13	۱۹(ب۱)	مدفوع	E9	۳۵(ب۳)	مدفوع	E1
۴ (ب ۱)	مدفوع	E13	۲۰(ب۱)	مدفوع	E9	۳۶(ب۳)	مدفوع	E5
۵ (ب ۱)	مدفوع	E13	۲۱(ب۱)	مدفوع	E9	۳۷(ب۳)	خون	E8
۶ (ب ۱)	مدفوع	E13	۲۲(ب۱)	مدفوع	E9	۳۸(ب۳)	مدفوع	E8
۷ (ب ۱)	خون	E11	۲۳(ب۲)	مدفوع	E9	۳۹(ب۳)	مدفوع	E8
۸ (ب ۱)	مدفوع	E11	۲۴(ب۲)	خون	E9	۴۰(ب۳)	مدفوع	E8
۹ (ب ۱)	مدفوع	E11	۲۵(ب۲)	خون	E10	۴۱(ب۳)	خون	E8
۱۰ (ب ۱)	مدفوع	E13	۲۶(ب۲)	مدفوع	E13	۴۲(ب۳)	مدفوع	E8
۱۱ (ب ۱)	خون	E13	۲۷(ب۲)	مدفوع	E10	۴۳(ب۳)	مدفوع	E8
۱۲ (ب ۱)	مدفوع	E4	۲۸(ب۲)	مدفوع	E13	۴۴(ب۳)	مدفوع	E12
۱۳ (ب ۱)	مدفوع	E9	۲۹(ب۲)	مدفوع	E4	۴۵(ب۳)	خون	E8
۱۴ (ب ۱)	مدفوع	E9	۳۰(ب۲)	مدفوع	E12	۴۶(ب۳)	مدفوع	E8
۱۵ (ب ۱)	مدفوع	E9	۳۱(ب۲)	مدفوع	E12	۴۷(ب۳)	مدفوع	E6
۱۶ (ب ۱)	خون	E9	۳۲(ب۲)	خون	E3	۴۸(ب۳)	خون	E2

بحث و نتیجه گیری

یافته‌های این پژوهش نشان داد که ERIC-PCR می تواند ایزوله های *سالمونلا انتریتیدیس* را به خوبی تمیز دهد، چرا که تمامی ایزوله ها با این روش قابل تایپ بندی بودند بطوریکه این روش سویه ها را به ۱۳ الگوی ژنتیکی متفاوت تقسیم بندی نمود. در این مطالعه مشاهده شد که برخی از سویه های با الگوی یکسان ERIC-PCR، در مراکز درمانی مختلف یافت شدند که نشان دهنده انتقال گسترده باکتری در بین این بیمارستان ها است.

روش ERIC-PCR در پژوهش های قبلی در سراسر دنیا از جمله ایران برای تایپینگ مولکولی ایزوله های *سالمونلا* مورد استفاده قرار گرفته است، بطوری که در کره جنوبی 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 سویه ها مفید است (۲۸). تعداد باندهای مشاهده شده توسط Lim در کلاسترهای مختلف بین ۵ تا ۱۱ بود که تا حدود زیادی با تعداد باندهای ۶ تا ۱۲ به دست آمده در تحقیق حاضر همخوانی دارد. در مطالعات دیگری در کشور هند که توسط Sexana و همکارانش صورت گرفت، ۲۴ ایزوله از سرووار های *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 واریانت های ژنتیکی مختلفی در *سالمونلا تیفی‌موریوم* را از هم تمایز دهد(۲۹). همچنین Oliviera و همکارانش در سال ۲۰۰۷، 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 سویه ها دارای ۳ الگوی ژنتیکی هستند(۳۰). در ایران نیز مطالعاتی بر روی تایپینگ *سالمونلا انتریتیدیس* انجام شده است بطوریکه رنجبر و همکاران تعداد ۵۷ سویه *سالمونلا انتریتیدیس* را توسط ERIC-PCR مورد مطالعه قرار دادند و ۹ الگوی ERIC-PCR بدست آورند. نتایج این محققین نشان داد که روش ERIC-PCR می‌تواند ایزوله های *سالمونلا انتریکا* را به خوبی تمایز دهد زیرا تمامی ایزوله ها با این روش قابل تایپ بندی بودند(۳۱).

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، بطوریکه در مطالعه Gopal و همکارانش در سال ۲۰۱۰ 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 روش ها را به ترتیب ۰/۷۰ و ۰/۸۹ محاسبه کردند(۳۲)، 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(۳۱)که این اعداد نزدیک به عدد محاسبه شده در مطالعه ما می باشد و هر چقدر این عدد به عدد ۱ نزدیک تر باشد، نشان دهنده میزان بالای قدرت تمایزی روش تایپینگ می باشد. همچنین در مطالعه 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. در مقایسه با تحقیق حاضر که قدرت تمایزی بین جدایه ها ۸۳ درصد تعیین شد، توانایی روش مورد استفاده توسط Soriaو همکاران کمتر بوده و احتمالا سبب می شود که جدایه های متفاوت ژنتیکی در یک کلاستر قرار گیرند. 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 سویه های *سالمونلا* می باشد(۳۳).

در مطالعه انجام شده توسط پور حسن سنگری و همکاران از روش ERIC-PCR برای تمایز سویه های اینترتیدیس در نمونه های انسانی و دامی استفاده گردید که بر این اساس ۲ تا ۱۲ باند در کلاسترهای مختلف دیده شد که در مقایسه با تحقیق حاضر تنوع کمتری در تکثیر باندها دیده می شود(۳۴).

در مطالعه صانعی و همکاران گوناگونی ژنتیکی بین سویه های *سالمونلا انتریتیدیس* جدا شده دیده نشد و این در حالی است که در تحقیق حاضر با استفاده از روش ERIC-PCR سویه‌های *سالمونلا انتریتیدیس* دارای الگوهای متفاوتی بودند که نشان دهنده تنوع ژنتیکی سویه های *سالمونلا انتریتیدیس* در شهر کرمان می باشد. احتمالا این سویه ها منشاء متفاوتی داشته که در حال چرخش بین حیوانات و انسان است. بنابراین پیدایش سویه های جدید و شناسایی کلون‌های کم شیوع در مطالعات مولکولار اپیدمیولوژی به لحاظ پیش بینی‌های روش های کنترل بهداشتی به منظور محدود کردن آن ها از دیگر رویکردهای مفید این مطالعه است. روش ERIC-PCR روش مناسبی جهت تایپینگ مولکولی سویه های *سالمونلا* و تعیین کانون های سیوع عفونت می‌باشد که می‌توان از آن جهت مطالعات اپیدمیولوژیک و تعیین راهبردهای کنترل عفونت استفاده نمود. لذا لازم است بررسی های مستمر، برنامه های نظارتی و غربالگری انجام شود و گونه سالمونلای غالب یا

ژنوتایپ غالب آن در جامعه مشخص گردد. با توجه به محدود بودن تعداد نمونه ها و یکسان بودن منبع جداسازی آنها لازم است بررسی روی سویه های بیشتری با منابع غذایی و انسانی نیز صورت پذیرد. پیشنهاد می‌شود مطالعات بیشتری از این دست در استان های دیگر کشور انجام شود تا تصویر جامع تری از مولکولار اپیدمیولوژی و ارتباط کلون های سالمونلا انتریتیدیس در کشور بدست آید.

قدردانی

بدین وسیله از حمایت های حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه امام حسین (ع) و همچنین گروه پژوهشی میکروب شناسی پاسارگاد قدر دانی می گردد

منابع

1-Kirk MD, Pires SM, Black RE, Caipo M, Crump JA, Devleesschauwer B, et al. World Health Organization estimates of the global and regional disease burden of 22 foodborne bacterial, protozoal, and viral diseases, 2010: a data synthesis. PLoS Med. 2015 Dec 3;12(12):e1001921.

2-Yang X, Wu Q, Zhang J, Huang J, Guo W, Cai S. Prevalence and Characterization of Monophasic Salmonella Serovar 1,4,[5],12:i:- of Food Origin in China. Rishi P, editor. PLoS One. 2015 Sep 11;10(9):e0137967.

3-Fardsanei F, Nikkhahi F, Bakhshi B, Salehi TZ, Tamai IA, Soltan Dallal MM. 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.

4-Chaitram JM, Jevitt LA, Lary S, Tenover FC. The World Health Organization's External Quality Assurance System Proficiency Testing Program Has Improved the Accuracy of Antimicrobial Susceptibility Testing and Reporting among Participating Laboratories Using NCCLS Methods. J Clin Microbiol. 2003 Jun 1;41(6):2372–7.

5-van Pelt W, de Wit MAS, Wannet WJB, Ligtvoet EJJ, Widdowson MA, van Duynhoven YTHP. Laboratory surveillance of bacterial gastroenteric pathogens in The Netherlands, 1991-2001. Epidemiol Infect. 2003 Jun;130(3):431–41.

6-Muńoz 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 May;37(5):1200–2.

7-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 Oct;43(10):2430–6.

8-Wray C, McLaren I, Parkinson NM, Beedell Y. Differentiation of *Salmonella typhimurium* DT204c by plasmid profile and biotyping. Vet Rec. 1987 Nov 28;121(22):514–6.

9-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 Jun 3;100(3–4):205–17.

10-Rasschaert G, Houf K, Imberechts H, Grijspeerdt K, De Zutter L, Heyndrickx M. Comparison of five repetitive-sequence-based PCR typing methods for molecular discrimination of *Salmonella enterica* isolates. J Clin Microbiol. 2005 Aug;43(8):3615–23.

11-Thong KL, Puthucheary S, Yassin RM, Sudarmono P, Padmidewi M, Soewandojo E, et al. Analysis of *Salmonella typhi* isolates from Southeast Asia by pulsed-field gel electrophoresis. J Clin Microbiol. 1995 Jul;33(7):1938–41.

12-Pang T, Altwegg M, Martinetti G, Koh CL, Puthucheary S. Genetic variation among Malaysian isolates of *Salmonella typhi* as detected by ribosomal RNA gene restriction patterns. Microbiol Immunol. 1992;36(5):539–43.

13-Altwegg M, Hickman-Brenner FW, Farmer JJ. Ribosomal RNA gene restriction patterns provide increased sensitivity for typing *Salmonella typhi* strains. J Infect Dis. 1989 Jul;160(1):145–9.

14-Soler-García ÁA, De Jesús AJ, Taylor K, Brown EW. Differentiation of Salmonella strains from the SARA, SARB and SARC reference collections by using three genes PCR-RFLP and the 2100 Agilent Bioanalyzer. Front in microbiol. 2014 Aug 11;5:417.

15-Khoodoo MHR, Issack MI, Jaufeerally-Fakim Y. Serotyping and RAPD profiles of *Salmonella enterica* isolates from Mauritius. Lett Appl Microbiol. 2002 Aug;35(2):146–52.

16-Adzitey F, Huda N, Ali GR. Molecular techniques for detecting and typing of bacteria, advantages and application to foodborne pathogens isolated from ducks. 3 Biotech. 2013 Apr 1;3(2):97-107.

17-Eriksson J, Lofstrom C, Aspan A, Gunnarsson A, Karlsson I, Borch E, et al. Comparison of genotyping methods by application *to Salmonella livingstone* strains associated with an outbreak of human salmonellosis. Int J Food Microbiol. 2005 Sep;104(1):93-103.
18-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 Jul;60(7):2286–95.
19-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 Apr;5(4):825–34.
20-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 May;49(4):163–8.
21-Burr MD, Josephson KL, Pepper IL. An evaluation of ERIC PCR and AP PCR fingerprinting for discriminating Salmonella serotypes. Lett Appl Microbiol. 1998 Jul;27(1):24–30.
22-Eshraghi S, Soltan Dalall M, Fardsanei F, Zahraii 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.
23-Wang TY, Wang L, Zhang JH, Dong WH. A simplified universal genomic DNA extraction protocol suitable for PCR. Genet Mol Res 2011;10(1):519–25.
24-Hendriksen SWM, Orsel K, Wagenaar JA, Miko A, van Duijkeren E. Animal-to-human transmission of *Salmonella Typhimurium* DT104A variant. Emerg Infect Dis [Internet]. 2004 Dec;10(12):2225–7.
25-Boyd EF, Hartl DL. Salmonella virulence plasmid. Modular acquisition of the spv virulence region by an F-plasmid in *Salmonella enterica* subspecies I and insertion into the chromosome of subspecies II, IIIa, IV and VII isolates. Genetics. 1998 Jul;149(3):1183–90.
26-Ross IL, Heuzenroeder MW. A comparison of three molecular typing methods for the discrimination of *Salmonella enterica* serovar *Infantis*. FEMS Immunol Med Microbiol. 2008 July;53(3):375-84.
27-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 Apr 30;123(3):191–7.
28-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 Sep;105:411–418.
29-Saxena MK, Singh VP, Lakhcharua BD, Taj G, Sharma B. Strain differentiation of Indian isolates of Salmonella by ERIC-PCR. Res Vet Sci. 2002 Dec;73(3):313–4.
30-Madalena V, Mario G, Rogerio T, Concelicao M. 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;16:88–95.
31-Ranjbar R, Torabi R, Mirzaie A. Molecular typing of *Salmonella enteritidis* strains isolated in several laboratory centers in Tehran by ERIC-PCR. SJKU. 2013;18(2):77–85.
32-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 May;10(4):530–6.
33-Soria G, Barbé J, Gibert I. Molecular fingerprinting of *Salmonella typhimurium* by IS200-typing as a tool for epidemiological and evolutionary studies. Microbiol (Madrid, Spain). 10(1–2):57–68.
34-Amini K, Moradli G. Evaluation of genetic diversity of *salmonella enterica* serovar *enteritidis* isolated from human and animals samples by eric-pcr. Urmia Med Journal. 2016 Aug 15;27(5):411-8.
35-Agron PG, Walker RL, Kinde H, Sawyer SJ, Hayes DC, Wollard J, et al. Identification by subtractive hybridization of sequences specific for *Salmonella enterica* serovar *enteritidis*. Appl Environ Microbiol. 2001 Nov;67(11):4984–91.
36-de Freitas CG, Santana AP, da Silva PHC, Gonçalves VSP, Barros M de AF, Torres FAG, et al. PCR multiplex for detection of *Salmonella Enteritidis*, *Typhi* and *Typhimurium* and occurrence in poultry meat. Int J Food Microbiol. 2010 Apr 30;139(1–2):15–22.
37-Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acids Res. 1991 Dec;19(24):6823–31.

Genetic Variation of *Salmonella enteritidis* Isolated from Kerman Health Centers by ERIC-PCR

Abolfazl Moghadam[1], Shahram Nazarian[2*]

1-Master of Science in Cellular and Molecular Biology.
2-Assistant Professor of Biology.

1-Department of Science in Cellular and Molecular Biology, University of Tehran, Tehran, Iran.
2-Department of Biology, Faculty of Science, Imam Hossain University, Tehran, Iran.

**Corresponding author:*
Shahram Nazarian; Department of Biology, Faculty of Science, Imam Hossain University, Tehran, Iran.
Tel: 02177104934
Email: nazarian56@gmail.com

Abstract

Background and Objective: Salmonellosis is one the most important zoonotic infectious disease. *Salmonella enteritidis* is one of the most prevalent serotypes that cause gastroenteritis in human. Epidemiological studies and molecular typing of *Salmonella* strains could improve infectious disease prevention strategies and control measures. The purpose of the present study was evaluation of genetic diversity of *Salmonella enterica* serovar *enteritidis* isolated from human samples by ERIC-PCR method.

Subjects and Methods: In this cross sectional study, *Salmonella* strains were isolated from patients referred to health centers in Kerman. Enteritidis strains was identified by standard microbiological, biochemistry and serotyping methods. Molecular typing of strains was evaluated by ERIC-PCR method.

Results: Forty eight of isolated samples were identified as *S. enteritidis*. ERIC-PCR analysis differentiated strains into 13 clusters (E1-E13). Eighteen strains (37.5%) with the same pattern were clustered in E9 and E13.

Conclusion: The results showed that *Salmonella enteritidis* strains are genetically heterogeneous and could be attributed to diverse ERIC clusters. The results demonstrated that ERIC-PCR is a proper approach for genotypic discrimination of *S. enteritidis* isolates.

Key words: *Salmonella enteritidis*, Molecular typing, ERIC-PCR.

►*Please cite this paper as:*
Moghadam A, Nazarian Sh. Evaluation of Genetic Variation of Salmonella enteritidis Isolated from Kerman Health Centers by ERIC-PCR
Jundishapur Sci Med J 2017;16(1):53-63.

Received: Oct 31, 2016 **Revised: Mar 12, 2017** **Accepted: Apr 23, 2017**