

تایپینگ مولکولی سویه های سالمونلا انتریتیدیس جمع آوری شده از چند مرکز آزمایشگاهی شهر تهران با استفاده از روش ERIC-PCR

رضا رنجبر^۱، رضا توایی^۲، امیر میزایی^۲

۱. مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران. (مؤلف مسئول)، ۰۲۱-۸۲۴۸۲۵۵۶، ranjbarre@gmail.com

۲. مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران

چکیده

زمینه و هدف: سالمونلا انتریکا زیرگونه انتریکا سروتایپ انتریتیدیس یکی از رایج ترین سروتایپ هایی است که باعث گاستروانتریت و باکتری می در انسان می شود. هدف از انجام این مطالعه، تایپینگ مولکولی سویه های سالمونلا انتریتیدیس جمع آوری شده از چند مرکز آزمایشگاهی شهر تهران با استفاده از روش ERIC-PCR بود.

روش بررسی: در یک مطالعه توصیفی از سال ۱۳۸۶ تا ۱۳۸۸، سویه های سالمونلا انتریکا سروتایپ انتریتیدیس از بیمارانی که به چند بیمارستان شهر تهران مراجعه کرده بودند، جداسازی شد. شناسایی سویه های سالمونلا با استفاده از روش های استاندارد میکروبیولوژی و اسلاید آگلوتیناسیون با آنتی سرم های مونو و پلی والان انجام شد و سرانجام تایپینگ مولکولی سویه ها و ارتباطات ژنتیکی آنها با استفاده از روش ERIC-PCR مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: نتایج بدست آمده حاکی از آن بود که تمام ایزوله های مورد بررسی با روش ERIC-PCR قابل تایپ بندی بودند. تعداد باندهای ایجاد شده در هر سروتایپ بین ۶ تا ۱۷ باند با وزن مولکولی ۲۰۰ تا ۳۲۰۰ جفت باز متفاوت بود. بر این اساس بطور کلی ۹ الگوی مختلف (E1-E9) بدست آمد که بیشترین تعداد (۳۵٪)، با داشتن الگوی مشابه در گروه اول (E1) قرار گرفتند.

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که شایع ترین سروتایپ سالمونلا در شهر تهران، انتریتیدیس بوده و سویه ها به دستجات مختلف ژنوتایپی مبتنی بر ERIC-PCR تعلق دارند.

واژگان کلیدی: سالمونلا انتریتیدیس، ژنوتایپینگ، ERIC-PCR

وصول مقاله: ۹۰/۱۱/۱۹ اصلاحیه نهایی: ۹۱/۵/۱۱ پذیرش: ۹۱/۱۲/۲۰

مقدمه

شایع ترین سروتایپ هایی از سالمونلا که باعث گاستروانتریت انسانی و باکتری می شوند، سالمونلا انتریکا زیرگونه انتریکا سرووار انتریتیدیس می باشد (۴و۵). برای کنترل و نظارت اپیدمیولوژیک موثر و به منظور شناسایی منابع بالقوه عفونت سروتایپ های سالمونلا، به تایپینگ دقیق سویه ها نیاز می باشد. بطور معمول روش های فنوتیپی مختلفی مانند سروتایپینگ، فاژتایپینگ در مطالعات اپیدمیولوژیک گونه های سالمونلا بکار می روند اما به دلیل وقت گیر بودن و هزینه زیاد، سروتایپینگ و فاژتایپینگ روش های مناسبی برای ردیابی منبع عفونت ناشی از سالمونلا نمی باشند

باکتری سالمونلا یکی از معمول ترین پاتوژن های منتقله از راه مواد غذایی است که در سرتاسر جهان در انسان و حیوان ایجاد بیماری می کند. محصولات گوشتی آلوده، منبع اصلی سالمونلا معرفی شده اند و به گزارش سازمان بهداشت جهانی، سالیانه بالغ بر ۱۶ تا ۳۳ میلیون مورد بیمار و ۵۰۰ تا ۶۰۰ هزار مرگ ناشی از سالمونلا اتفاق می افتد که این مسئله به عنوان یک معضل بزرگ بهداشتی در کشورهای در حال توسعه از جمله کشور ما مطرح می باشد (۱-۳). همچنین بر اساس گزارش این سازمان، از سال ۱۹۹۰ یکی از

سویه‌های سالمونلا انتریتیدیس جمع آوری شده از چند مرکز آزمایشگاهی شهر تهران با استفاده از روش ERIC-PCR بود.

مواد و روش‌ها

در یک مطالعه توصیفی از سال ۱۳۸۶ تا ۱۳۸۸، سویه‌های سالمونلا انتریکا سروتایپ انتریتیدیس از ۶۵۰ نمونه بالینی مدفوع و خون بیماران مشکوک به عفونت سالمونلا که به بیمارستان‌های بقیه الله (عج)، مرکز طبی کودکان و برخی از آزمایشگاه‌های سطح شهر مراجعه کرده بودند، اخذ شد. نمونه‌های مدفوع بیماران بلافاصله پس از نمونه‌گیری به محیط کشت سلنیت F منتقل می‌گردید. نمونه‌ها به مدت ۶ ساعت در این محیط نگهداری می‌شدند و سپس به محیط‌های کشت انتخابی مانند سالمونلا-شیگلا (SS) آگار انتقال یافته و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده می‌شدند. نمونه‌های خون نیز ابتدا در محیط‌های دی‌فازیک کشت داده شده و سپس به محیط‌های انتخابی انتقال داده می‌شدند. در روز بعد، کلنی‌های مشکوک به سالمونلا جداسازی و توسط تست‌های بیوشیمیایی استاندارد نظیر انتقال بر روی محیط Triple sugar iron (TSI) agar، اوره، سیمون سیرتات آگار و MRVP مورد شناسایی قرار می‌گرفتند. پس از انجام آزمون‌های افتراقی، تست سروتایپینگ با استفاده از آنتی‌سرم O و H بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده (Staten Serum Institut, Copenhagen, Denmark) بر پایه اسلاید آگلوتیناسیون انجام گرفت.

استخراج DNA

استخراج DNA به روش فنل-کلروفرم انجام گرفت (۲۱)، بطور خلاصه، بعد از کشت ۲۴ ساعته نمونه‌های خالص شده سالمونلا بر روی محیط کشت Luria broth، از سوسپانسیون باکتریایی رسوب تهیه شد و به رسوب موجود

(۶) به همین دلیل روش‌های تایپینگ دیگری برای تمایز سویه‌های متعلق به یک سروتایپ و فاژ تایپ نیاز است. امروزه محققان از روش‌های مولکولی مختلفی مانند Restriction Fragment Length (RFLP) (Polymorphism arbitrary) AP PCR (۷) و پروب برای توالی الحاقی IS200 (۸) و اپران rrn (۹)، ریوتایپینگ (۱۰ و ۱۱)، تعیین پروفایل پلاسمیدی (۱۳)، RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA Enterobacterial Repetitive) (۱۴ و ۱۵)، Intergenic Consensus Sequence PCR (۱۶)، PFGE (Pulse Field Gel Electrophoresis) (۱۷ و ۱۸) و غیره برای تایپینگ گونه‌های باکتریایی بیمارزیا استفاده نموده‌اند. همه این روش‌ها برای بررسی اپیدمیولوژیک و تایپینگ مولکولی سرووارهای سالمونلا مفید می‌باشند ولی برای انتخاب نوع روش تایپینگ مشخصه‌هایی مانند سرعت روش، آسانی و توانایی تمایز دهندگی آن روش باید در نظر گرفته شود. امروزه روش PFGE بطور رایج برای ژنوتایپینگ گونه‌های سالمونلا انجام می‌گیرد اما به مقادیر زیادی از DNA نیاز دارد و پرهزینه و وقت‌گیر است (۱۹). اما تایپینگ بر اساس روش ERIC-PCR سریع‌تر بوده و دارای قدرت تمایزی مناسبی است و در هر آزمایشگاهی که دارای قابلیت انجام روش PCR است قابل انجام می‌باشد (۲۰).

توالی‌های ERIC در واقع توالی‌های 124-127bp و واجد یک ناحیه معکوس تکرار شونده مرکزی حفاظت شده هستند که به شکل خارج ژنی در ژنوم باکتری‌های روده‌ای موجود بوده و پرایمرهای مورد استفاده در ERIC-PCR مکمل این توالی‌ها هستند و برای ژنوتایپینگ باکتری‌های گرم منفی روده‌ای مانند گونه‌های سالمونلا بکار می‌رود. هدف از انجام این مطالعه، تایپینگ مولکولی

انجام روش ERIC-PCR

برای انجام این روش، نمونه های DNA متعلق به سویه های مختلف با استفاده از پرایمرهای 5'-ERIC1R ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3' and ERIC2 5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3' تکثیر داده شدند (۲۲). آزمایش PCR توسط ترموسایکلر اپندورف و در یک حجم ۲۰ میکرولیتری که شامل ۱۲ میکرولیتر آب دیونیزه، ۲ میکرولیتر از بافر 10x PCR، یک میکرولیتر از 50 mM MgCl₂، یک میکرولیتر از 10 mM dNTPs، یک میکرولیتر از هر پرایمر دارای غلظت 20 pmol، یک میکرولیتر آنزیم Taq DNA polymerase و یک میکرولیتر DNA مورد نظر انجام شد. اطلاعات کامل در مورد نحوه انجام ERIC-PCR در جدول ۱ آمده است.

۶۲۰ میکرولیتر بافر لیز، ۱۳ میکرولیتر 20% SDS و ۳ میکرولیتر پروتیناز K (20 mg/ml) اضافه شد و این سوسپانسیون در دمای ۶۰ درجه به مدت یک ساعت انکوبه گردید. در مرحله بعد از محلول فتل-کلروفرم-آیزوآمیل الکل با نسبت ۱-۲۴-۲۵ برای جداسازی پروتئین ها استفاده شد و در مرحله پایانی برای خالص سازی DNA، به فاز روئی محلول اتانل سرد ۹۰ و ۷۰ درصد افزوده شد و DNA خالص شده را در ۱۰۰-۵۰ میکرولیتر آب مقطر حل گردید. همچنین برای تعیین غلظت و خلوص DNA، بررسی باند از روی الکتروفورز بر روی ژل و تعیین نسبت جذب OD260/OD280 توسط اسپکتروفتومتر انجام شد.

جدول ۱: نحوه انجام واکنش ERIC-PCR

تعداد چرخه	زمان (دقیقه)	دما (سلسیوس)	شرایط
			مراحل
۱	۴	۹۴	واسرشت سازی اولیه
۳۵	۱	۹۴	واسرشت سازی
۳۵	۱	۵۲	متصل شدن پرایمرها
۳۵	۸	۶۵	طویل سازی پرایمرها
۱	۱۵	۶۵	طویل سازی نهایی

اساس محاسبه الگوهای ژنتیکی توسط پایگاه اینترنتی، مشاهده نحوه قرارگیری آنها در ژل بر اساس وزن مولکولی آنها و مقایسه با مارکر مولکولی و شمارش باندها جهت هر نمونه بود. قدرت تمایزی روش ERIC-PCR توسط معادله Simpson's Index of Diversity انجام گرفت که به ترتیب زیر است:

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

محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد با ولتاژ ۷۰ به مدت یک ساعت الکتروفورز شدند و در نهایت از روی ژل عکسبرداری شد. مقایسه الگوهای ERIC-PCR، با رویت و محاسبه نحوه قرارگیری آنها در ژل بر اساس وزن مولکولی آنها و مقایسه با مارکر مولکولی و شمارش باندها جهت هر نمونه صورت گرفت. مقایسه الگوهای ERIC-PCR در پایگاه اینترنتی Insilico.ehu.es انجام گرفت، بدین صورت که یک ماتریکس صفر و یک به منظور وجود یا عدم وجود باند تهیه شد و در پایگاه اینترنتی ثبت شد و

شده در ERIC-PCR هر سروتایپ، بین ۶ تا ۱۷ باند با وزن مولکولی ۲۰۰bp تا ۳۲۰۰bp بود و بیشترین تعداد (۲۰ ایزوله)، با داشتن الگوی مشابه در گروه اول (E1) قرار گرفتند. در گروه دوم (E2) تعداد ۱۶ ایزوله، در گروه سوم (E3) ۱۰ ایزوله، در گروه چهارم (E4) ۴ ایزوله، در گروه پنجم (E5) ۲ ایزوله، در گروه ششم (E6) نیز ۲ ایزوله و در گروه‌های هفتم تا نهم (E7-E9) نیز هر کدام یک ایزوله جای گرفتند. جدول ۲ مشخصات سویه‌ها و شکل ۱ دستجات (Clusters) ایجاد شده از ERIC-PCR سویه‌های سالمونلا انتریتیدیس را نشان می‌دهد. با توجه به اطلاعات مندرج در جدول ۲ و تعداد تیپ‌های ژنتیکی بدست آمده، قدرت تمایزی روش ERIC-PCR، ۰/۷۷ محاسبه شد.

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

یافته‌ها

از مجموع کل سرووارهای جداشده، ۵۷ ایزوله، مربوط به سالمونلا انتریکا زیرگونه انتریکا سرووار انتریتیدیس بود و بدین ترتیب شایع‌ترین سروتایپ، سالمونلا انتریتیدیس با فراوانی ۴۱/۳٪ بود، لذا سویه‌های این سروتایپ انتخاب و مورد بررسی بیشتری قرار گرفت. پس از انجام کلیه مراحل ERIC-PCR و تهیه عکس از الگوهای الکتروفورزی این سروتایپ و مقایسه هر کدام از الگوها بصورت تک تک با هم، نتایج بدست آمده حاکی از آن بود که تمام ایزوله‌ها با این روش قابل تایپ بندی بودند. تعداد باندهای ایجاد

جدول ۲: مشخصات ایزوله‌های سالمونلا انتریتیدیس.

شماره سویه	محل جداسازی	نوع نمونه	الگوی ERIC-PCR	شماره سویه	محل جداسازی	نوع نمونه	الگوی ERIC-PCR	شماره سویه	محل جداسازی	نوع نمونه	الگوی ERIC-PCR
۲۴	مرکز طبی کودکان	مدفوع	E1	۸۷	مرکز طبی کودکان	مدفوع	E1	۲۴	مرکز طبی کودکان	خون	E2
۲۹	مرکز طبی کودکان	مدفوع	E1	۸۸	مرکز طبی کودکان	مدفوع	E1	۲۹	مرکز طبی کودکان	مدفوع	E2
۳۲	بقیه الله	مدفوع	E1	۸۹	مرکز طبی کودکان	مدفوع	E8	۳۲	بقیه الله	خون	E2
۳۳	بقیه الله	مدفوع	E1	۹۲	بقیه الله	مدفوع	E1	۳۳	بقیه الله	خون	E2
۴۶	مرکز طبی کودکان	مدفوع	E1	۹۳	بقیه الله	مدفوع	E1	۴۶	مرکز طبی کودکان	خون	E2
۴۹	مرکز طبی کودکان	مدفوع	E5	۹۴	مرکز طبی کودکان	مدفوع	E1	۴۹	مرکز طبی کودکان	مدفوع	E4
۵۱	مرکز طبی کودکان	مدفوع	E1	۹۵	مرکز طبی کودکان	مدفوع	E1	۵۱	مرکز طبی کودکان	خون	E1
۵۳	مرکز طبی کودکان	مدفوع	E1	۱۰۰	بقیه الله	مدفوع	E1	۵۳	مرکز طبی کودکان	خون	E4
۵۴	مرکز طبی کودکان	مدفوع	E5	۱۰۱	مرکز طبی کودکان	مدفوع	E2	۵۴	مرکز طبی کودکان	خون	E3
۵۵	بقیه الله	خون	E1	۱۰۲	مرکز طبی کودکان	مدفوع	E2	۵۵	بقیه الله	مدفوع	E3
۵۸	مرکز طبی کودکان	مدفوع	E7	۱۰۹	مرکز طبی کودکان	مدفوع	E2	۵۸	مرکز طبی کودکان	مدفوع	E3
۶۰	مرکز طبی کودکان	مدفوع	E6	۱۱۰	مرکز طبی کودکان	مدفوع	E2	۶۰	مرکز طبی کودکان	مدفوع	E3
۶۱	مرکز طبی کودکان	مدفوع	E1	۱۱۵	مرکز طبی کودکان	مدفوع	E2	۶۱	مرکز طبی کودکان	مدفوع	E3
۶۲	مرکز طبی کودکان	مدفوع	E1	۱۱۸	بقیه الله	مدفوع	E4	۶۲	مرکز طبی کودکان	مدفوع	E3
۶۵	مرکز طبی کودکان	مدفوع	E1	۱۱۹	بقیه الله	مدفوع	E2	۶۵	مرکز طبی کودکان	مدفوع	E3
۶۶	بقیه الله	مدفوع	E1	۱۲۲	بقیه الله	خون	E2	۶۶	بقیه الله	مدفوع	E9
۶۹	مرکز طبی کودکان	خون	E4	۱۲۳	بقیه الله	مفصل	E2	۶۹	مرکز طبی کودکان	مدفوع	E3
۷۵	مرکز طبی کودکان	مدفوع	E1	۱۲۴	مرکز طبی کودکان	مدفوع	E2	۷۵	مرکز طبی کودکان	مدفوع	E3
۷۶	مرکز طبی کودکان	مدفوع	E4	۱۲۵	مرکز طبی کودکان	خون	E4	۷۶	مرکز طبی کودکان	مدفوع	E3

بحث

Oliviera و همکارانش در سال ۲۰۰۷، 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 و اندازه باندهای ERIC-PCR بین 190bp تا 1430bp بود و تعداد باندها بین ۱۲ تا ۱۳ تا بود (۲۸).

Sexana و همکارانش در هند، ۲۴ ایزوله از سروارهای سالمونلا را با روش ERIC-PCR مورد تمایز قرار دادند و ۲۱ تیپ ژنتیکی بدست آمد و نتایج نشان داد که این روش قادر است واریانت‌های ژنتیکی مختلفی را در سالمونلا تایفی موربوم از هم تمایز دهد (۲۹). در مطالعه دیگر Malalena و همکارانش در سال ۲۰۰۶ در پرتغال ۶۹ سویه از سالمونلا را با روش ERIC-PCR مورد مطالعه تایپینگ مولکولی قرار دادند و نشان دادند که این روش کاربردی می‌باشد (۲۰).

همچنین ارزیابی قدرت تمایزی روش ERIC-PCR در مطالعات قبلی نیز مورد محاسبه قرار گرفته است. در مطالعه حاضر قدرت تایپینگ روش ERIC-PCR، ۰/۷۷ 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، بصورت 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 که این اعداد نزدیک به عدد محاسبه شده در این مطالعه می‌باشد و هر چقدر این عدد به عدد ۱ نزدیک تر باشد، نشان دهنده میزان بالای قدرت تمایزی روش تایپینگ می‌باشد (۳۰). هم چنین در مطالعه Soria و همکارانش 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،

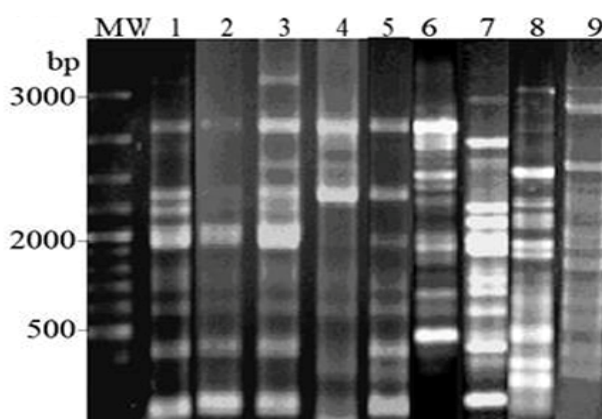
در این مطالعه از بین انواع سویه‌های سالمونلا، فراوانی سروتایپ انتریتیدیس در بین نمونه‌های بالینی بیماران مراجعه کننده به چند مرکز درمانی، ۴۱/۳٪ گزارش شد که نشان دهنده شیوع بالای این سروتایپ در شهر تهران است. فراوانی بالای سروتایپ انتریتیدیس در مطالعات قبلی نیز در آسیا، اروپا و آمریکای لاتین نیز گزارش شده است (۲۵-۲۳). بطور معمول مطالعات تشخیصی و اپیدمیولوژیک سویه‌های سالمونلا توسط تست‌های سرولوژیک انجام می‌شوند ولی چون نتایج حاصل از این تست‌ها اطلاعات محدودی در مورد سویه‌های باکتریایی می‌دهد بنابراین به تکنیک‌های مولکولی در مطالعات اپیدمیولوژیک نیاز است (۲۶).

در این مطالعه ۵۷ سویه سالمونلا انتریتیدیس توسط روش ERIC-PCR مورد مطالعه قرار گرفتند. نتایج نشان داد که روش ERIC-PCR می‌تواند ایزوله‌های سالمونلا انتریکا را بخوبی تمایز دهد، چرا که تمام ایزوله‌ها با این روش قابل تایپ بندی بودند بطوریکه این روش سویه‌ها را به ۹ الگوی متفاوت تقسیم بندی نمود. در این مطالعه مشاهده شد که برخی سویه‌هایی با الگوهای یکسان ERIC-PCR، در بیمارستان‌های مختلف یافت شدند که نشان دهنده انتقال گسترده باکتری در بین بیمارستان‌ها است. انتقال باکتری می‌تواند از طریق وسایل و پرسنل بیمارستانی و اشخاص دیگری که با بیماران در تماس بوده‌اند صورت پذیرد.

روش ERIC-PCR در مطالعات قبلی برای تایپینگ مولکولی ایزوله‌های سالمونلا مورد استفاده قرار گرفته است، بطوریکه Lim و همکارانش در کره جنوبی، تعداد ۵۷ سویه سالمونلا با روش ERIC-PCR تایپینگ مولکولی شد و ۵۰ الگوی ERIC-PCR یافت شد و تعداد ۶-۱۱ باند با اندازه مولکولی ۲۰۰ تا ۱۲۰۰ جفت باز مشاهده شد و نشان دادند که روش ERIC-PCR برای مطالعات اپیدمیولوژیک سویه‌ها مفید است (۲۷). همچنین

حیوانات را فراهم می آورد، بنابراین شناسایی سویه ها و منشا عفونت به لحاظ پیش بینی روش های بهداشتی به منظور کنترل و محدود کردن آنها لازم و ضروری است، در صورتی که در مطالعه ای که توسط صانعی و همکارانش در سال ۱۳۸۷ و در شهر تهران بر روی ۳۰ ایزوله جدا شده سالمونلا اینترتیدیس صورت گرفت، از دو پرایمر ERIC و 5(GTG) استفاده شد و نتایج ERIC-PCR، ایزوله های موجود را در دو گروه بزرگ با درصد تشابه ۹۵ درصدی قرار داد. نتیجه نهایی در آن مطالعه نشان دهنده آن بود که منشا تمام سویه ها از یک کلون واحد یا کلون های محدود بسیار محتمل می باشد (۳۲) و این نشان دهنده افزایش تعداد کلون ها در شهر تهران و هشدار برای پیدایش سویه های جدیدتر در محیط بین انسان و حیوانات می باشد.

وقت و قابلیت دسترس بودن روش، تکرار پذیری و مقایسه قدرت تمایزی، روش ERIC-PCR روش مناسبی جهت ژنوتایپینگ مولکولی سویه های سالمونلا می باشد (۳۱). همچنین یکی از مهم ترین مزیت های روش ERIC-PCR این است که به راحتی در هر آزمایشگاهی که دارای تجهیزات PCR است، قابل انجام است. سرعت بالا از دیگر ویژگی های آن می باشد ولی این روش دید کاملی از ارتباطات ژنتیکی سویه ها را فراهم نمی کند. در مطالعه حاضر با استفاده از پرایمر ERIC، سویه های سالمونلا اینترتیدیس دارای الگوهای ERIC متفاوتی بودند که نشان دهنده این است که سویه های سالمونلا اینترتیدیس در تهران دارای گوناگونی ژنتیکی هستند و این سویه ها از کلون های متفاوتی نشأت گرفته اند و وجود کلون های متفاوت امکان پیدایش سویه های جدید و چرخش آنها بین انسان، محیط و



شکل ۱. الگوهای مختلف حاصل از ERIC-PCR سویه های سالمونلا اینترتیدیس بر روی ژل آگارز ۱٪ و رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید. ستون MW مارکر مولکولی 100bp، ستون های ۱ تا ۹ سویه های نماینده ۹ الگوی مختلف بر پایه محصولات ERIC-PCR.

نتیجه گیری

ERIC-PCR برای تمایز سویه های سالمونلا اینترتیدیس ارزشمند بوده و جهت مطالعات اپیدمیولوژیک، کاربردی بوده و بکارگیری آن پیشنهاد می شود.

در این مطالعه شایع ترین سروتایپ سالمونلا در شهر تهران، اینترتیدیس بوده و سویه های در گردش این سروتایپ در این شهر به دستجات مختلف ژنوتایپی مبتنی بر ERIC-PCR تعلق دارند. همچنین این مطالعه نشان داد که روش

تشکر و قدردانی

محترم آزمایشگاه بیولوژی مولکولی، جناب آقای دکتر
هاشمی مدنی، سرکار خانم سفیری و خانم پورعلی کمال
تشکر و قدر دانی را دارند.

این مقاله برگرفته از یکی از طرح های تحقیقاتی انجام شده
در مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی
بقیه الله می باشد. بدینوسیله نویسندگان این مقاله از همکاران

Reference

1. 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: 547-553.
2. Karami A, Ranjbar R, Z Ahmadi, Z Safiri. Rapid detection of different serovares of Salmonella entrica by multiplex PCR. *Iranian J Publ Health* 2007;36:38-42.
3. Ranjbar R, Salimkhani E, Sadeghifard N, Zaeimi Yazdi J, Morovvati S, Jonaidi N and et al. An outbreak of gastroenteritis of unknown origin in Tehran, July 2003. *Pak J Biol Sci* 2007;10: 1138-40.
4. Patrick M E, Adcock P M, Gomez T M, Altekruise S F, Holland BH, Tauxe RV Swerdlow, and et al. Salmonella enteritids infection, United States, 1985-1999. *Emerg Infect Dis* 2004;10: 1-7.
5. Usera M A, Popovic T, Bopp C A and Strockbine N A. Molecular subtyping of Salmonella enteritidis phage type 8 strains from the United States. *J Clin Microbiol* 1994;32:194-198.
6. Torpdahl M, Skov MN, Sandvang D ta 6 nafar neveshteh shavad baad et al. Genotypic characterization of Salmonella by multilocus sequence typing pulsed field gel electrophoresis and amplification fragment length polymorphism. *J Microbiol Methods* 2005; 63:173-184
7. Us E, Erdem B, Tekeli A, Gerçeker D, Saran B, Bayramova M, and et al. Investigation of Salmonella serotype enteritidis isolates by plasmid profile analysis and pulsed field gel electrophoresis. *Mikrobiol Bul* 2011;45:210-27.
8. Tompkins LS, Troup N, Labaigne-Roussel A, Cohen M. Cloned random chromosomal sequences as probes to identify Salmonella species. *J Infect Dis* 1986; 154:156-162.
9. Ranjbar R, Sadeghifard N, Ahmadi A, Izadi M, Zaeimi- Yazdi J, Ghasemi A, and et al. A Antimicrobial susceptibility and AP-PCR typing of Iranian isolates of Acinetobacter spp. strains. *Iranian J Publ Health* 2007;36: 50-56.
10. Ranjbar R, Sadeghifard NKH, Soltan dalal MM, Farshad S. Evaluation of a PCR based approach to study the relatedness among S. sonnei strains isolated in Tehran. *Iranian J Clin Infect Dis* 2009;4:163-166.
11. Ranjbar R, Soltan dalal MM, Talebi M, Pourshafie MR. Increased isolation and characterization of Shigella sonnei obtained from hospitalized children in Tehran, Iran. *J Health Popul Nutr* 2008;26:426-430
12. Ranjbar R, Owlia P, Saderi H, Mansouri S, Jonaidi-Jafari N, Izadi M, and et al. Antibiotic susceptibility and plasmid profiles of Pseudomonas aeruginosa strains isolated from burned patients hospitalized in a major burn center in Tehran, Iran. *Acta Medica Iranica* 2011; 49:675-679.
13. Sadeghifard N, Ranjbar R. Antimicrobial susceptibility, plasmid profiles, and RAPD-PCR typing of Acinetobacter bacteria. *Asian Biomedicine* 2010;4:901-911
14. Pourshafie MR, Bakhshi B, Ranjbar R, Sedaghat M, Sadeghifard N, Zaemi Yazdi J et al. Dissemination of a single Vibrio cholerae clone in cholera outbreaks during 2005 in Iran. *J Med Microbiol* 2007;56: 1615-1619

15. Hulton CS, Higgins CF and Sharp PM. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Mol Microbiol* 1991;5:825-834.
16. Ranjbar R, Aleo A, Giammanco GM, Maria Dionisi A, Sadeghifard N KH, Mammina C. Genetic relatedness among isolates of *Shigella sonnei* carrying class 2 integrons in Tehran, Iran, 2002-2003. *BMC Infect Dis* 2007;22:62-69.
17. Ranjbar R, Giammanco GM, Aleo A, Plano MR, Naghoni A, Owlia P, and et al. Characterization of the first extended-spectrum b-lactamase-producing nontyphoidal *Salmonella* strains isolated in Tehran, Iran. *Foodborne Pathogens and Disease* 2010; 7:91-5.
18. Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res* 1991;19: 6823-6831.
19. Ranjbar R, Rahbar M, Naghoni A, Farshad S, Davari A, Shahcheraghi F. A cholera outbreak associated with drinking contaminated well water. *Archives of Iranian Medicine* 2011;14:339-340.
20. Ranjbar R, Hosseini MJ, Kaffashian AR, Farshad S. An outbreak of shigellosis due to *Shigella flexneri* serotype 3a in a prison in Iran. *Arch Iran Med* 2010;13:413-416.
21. Galanis ED, M, Lo Fo Wong, M. E. Patrick, N Binsztein, A Cieslik, T Chalermchikit, and et al. Wegener for World Health Organization global salm-surv. Web-based surveillance and global *Salmonella* distribution, 2000-2002. *Emerg Infect Dis* 2006; 12:381-388.
22. Herikstad H, Y Motarjemi, and R V Tauxe. *Salmonella* surveillance: a global survey of public health serotyping. *Epidemiol Infect* 2002;129:1-8.
23. Humphrey, T. J. 2000. Public-health aspects of *Salmonella* infections, p.245-263. In C. Wray and A. Wray (ed.), *Salmonella in domestic animals*. CABI Publishing, CAB International, Wallingford, United Kingdom.
24. Naghoni A, Ranjbar R, Tabaraie B, Farshad S, Owlia P, Safiri Z, and et al. High prevalence of integron mediated resistances among clinical isolates of *Salmonella enterica* strains. *Jpn J Infect Dis* 2010;63: 417-418.
25. 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; 105:411-418.
26. Oliveira SD, Bessa MC, Santos LR, Cardoso MR, Brandelli AC, and Canal CW. Phenotypic and genotypic characterization of salmonella enteritidis isolates. *Brazilian Journal of Microbiology* 2007;38:720-728.
27. Sexena MK, Singh VP, Lakhcharua BD, Tai G, Sharma B. Strain differentiation of Indian isolates of *Salmonella* by ERIC-PCR. *Res Vet Sci* 2002;73:313-314.
28. Madalena VP, 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. *Journal of Food and Drug Analysis* 2008;16: 88-95.
29. Saxena MK, Singh VP, Lakhcharua BD, Sharma B. Strain differentiation of Indian isolates of *Salmonella* by ERIC-PCR. *Journal of Reserch in Veterinary Science* 2002;73:313-314.

30. Gopal N, Pushpa M, Anil G. ERIC PCR and RAPD based fingerprinting of Salmonella typhi strains isolated over a period of two decades. *Infection, genetics and evolution*, 2010;10:530-536.
31. Soria G, Barbé J, Gibert I. Molecular fingerprinting of Salmonella typhimurium by IS200-typing as a tool for epidemiological and evolutionary studies. *Microbiologia* 1994 ;10:57-68.
32. Sanei F. molecular epidemiology and plasmid profiling of Salmonella enteritidis isolated from clinical samples and determination of antibiotic resistant profile. *Iranian Journal of Infectious Diseases* 2008;14:55-60.