Original Article

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

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

[1]*Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Tehran, Tehran, Iran.*

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

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

Email: nazarian56@gmail.com

Received: 31 Oct, 2016

Accepted: 12 Jun, 2017

Abstract

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

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

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

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

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

مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره دوازدهم، شماره اول، فروردین ۹۷
صفحه ٤٤ الی ٥٣

مقاله پژوهشی
(Original Article)

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

ابوالفضل مقدم[1]، شهرام نظریان[2*]

چکیده

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

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

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

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

کلید واژه‌ها: *سالمونلا تیفی موریوم*؛ تنوع ژنتیکی؛ تایپینگ مولکولی.

[1]گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

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

[*]نویسنده مسئول مکاتبات:
شهرام نظریان، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:
nazarian56@gmail.com

تاریخ دریافت:۹۵/۸/۹

تاریخ پذیرش:۹۵/۱۰/۲۲

لطفاً به این مقاله به‌صورت زیر استناد نمایید:

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

مقدمه

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

در حال حاضر از روش‌های مولکولی متعددی برای بررسی و تفریق سویه‌های سالمونلا استفاده می‌شود. تایپینگ براساس REP-PCR (Repetitive Extragenic Elements) روشی معتبر، تکرارپذیر و سریع بوده و از قدرت تفکیک بالایی در میان جدایه‌های باکتری‌ها برخوردار است (۸). سه گروه از توالی‌های تکرارشونده پراکنده در ژنوم باکتری‌ها به‌نام‌های REP، BOX و ERIC در بررسی تنوع، شناسایی گونه‌ها و زیرگونه‌ها کاربرد داشته و استفاده از آنها رو به فزونی است. الگوی ژنومی به‌دست‌آمده به‌وسیله روش‌های BOX-PCR، REP-PCR و ERIC-PCR برای جدایه‌ها و پاتوارها، اختصاصی عمل کرده و تایپینگ حاصل از REP-PCR، ابزار تشخیصی مناسبی به‌منظور گروه‌بندی، شناسایی و بررسی سیر تکاملی پاتوارها می‌باشد (۹). توالی‌های ERIC در واقع توالی‌های 124-127bp هستند که واجد یک ناحیه معکوس تکرارشونده مرکزی حفاظت‌شده بوده و به‌شکل خارج ژنی در ژنوم باکتری‌های روده‌ای قرار دارند. پرایمرهای مورد استفاده در ERIC-PCR، مکمل این توالی‌ها می‌باشد و برای ژنوتایپینگ باکتری‌های گرم منفی روده‌ای مانند گونه‌های *سالمونلا* به‌کار می‌رود. این روش، یک روش ارزشمند و کارا جهت تایپینگ مولکولی سویه‌های مربوط به جنس *سالمونلا* ارزیابی شده است (۱۲-۱۰).

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

روش بررسی

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

نمونه‌ها برای شناسایی جنس *سالمونلا* با روش‌های استاندارد سرولوژی و باکتریولوژی در محیط راپاپورت واسیلیادیس (ساخت مرک آلمان) در مجاورت یخ به آزمایشگاه میکروب‌شناسی منتقل شدند. کشت اولیه و افتراقی بر روی نمونه‌ها در محیط‌های انتخابی مانند سالمونلا – شیگلا (SS) آگار، بیسموت سولفیت آگار، صورت گرفت. محیط‌های کشت به‌مدت 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 (ساخت مرک آلمان)، کلنی‌های مشکوک به *سالمونلا* جداسازی و پس از انجام آزمون‌های افتراقی مذکور، آزمون‌های سروتایپینگ با آنتی‌سرم‌های O و H انجام شد (۱۵). واکنش آگلوتیناسیون به‌عنوان واکنش مثبت ثبت گردید، سپس با استفاده از روش‌های استاندارد باکتریولوژیک، باکتری‌ها در محیط LB براث کشت داده شدند. به‌منظور استخراج DNA، از روش CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) استفاده شد. تک‌کلنی از باکتری‌ها انتخاب و به ۵ میلی‌لیتر از محیط مایع LB منتقل گردید، سپس در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و سرعت چرخش ۱۵۰ دور در دقیقه تا رسیدن OD کشت سلولی به ۰/۷، نگهداری شد. رسوب حاصل از سانتریفوژ شامل ۱/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون سلولی در ۵۶۷ میکرولیتر بافر TE و ۳۰ میکرولیتر از بافر SDS 10% یکنواخت گردید. در ادامه، ۳ میکرولیتر از آنزیم Proteinase K به آن اضافه و پس از به‌هم زدن به‌مدت یک‌ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری شد. به نمونه حاصل ۱۰۰ میکرولیتر نمک NaCl ۵ مولار و ۸۰ میکرولیتر محلول CTAB/NaCl اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در ۶۵ درجه سانتیگراد گرمادهی شد. حذف پروتئین‌ها با افزودن فنل – کلروفرم – ایزوآمیل الکل (به نسبت ۱/۲۴/۲۵) انجام گرفت. اسید نوکلئیک موجود در نمونه با استفاده از ایزوپروپانل و استات سدیم ۳ مولار ترسیب داده شد. رسوب حاوی DNA بعد از شست‌وشو با اتانول ۷۰٪، در ۲۰ میکرولیتر بافر TE حل گردید. جهت حذف RNA، از RNase A (با غلظت ۲۰ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر) استفاده شد. برای اندازه‌گیری غلظت نمونه‌های استخراج‌شده، از دستگاه نانودراپ و طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر استفاده گردید.

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

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

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

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

۶ میکرولیتر محصول PCR به همراه ۱ میکرولیتر بافر 6X بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ ساخته‌شده با بافر TAE 1X بارگذاری و به مدت ۴۰ دقیقه در ولتاژ ۱۲۰ ولت الکتروفورز گردید، سپس با رنگ اتیدیوم برماید، رنگ‌آمیزی و در نهایت، زیر نور ماوراءبنفش

مورد بررسی قرار گرفت. در ادامه، سویه‌های شناسایی‌شده *سالمونلا تیفی موریوم* با استفاده از آزمایش ERIC-PCR تایپینگ شدند. توالی پرایمرهای مورد استفاده برای این آزمایش طبق جدول شماره ۱ بود.

آزمایش ERIC-PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد که شامل: یک میکرولیتر از هرکدام از پرایمرها (با غلظت ۱۰ پیکومول برمیکرولیتر)، ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس Amplicon 2X، ۴ میکرولیتر آب دیونیزه و ۴ میکرولیتر DNA الگوی استخراج‌شده (۱۵۰ نانوگرم) بود.

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

جدول شماره ۱: مشخصات پرایمرهای استفاده‌شده

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

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

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

در این فرمول:

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

S: تعداد تیپ‌های ژنتیکی محاسبه‌شده؛

n_j: تعداد سویه‌های متعلق به تیپ j می‌باشد.

جدول شماره ۲: مشخصات ایزوله‌های سالمونلا *انتریکا سروار تایفی موریوم*

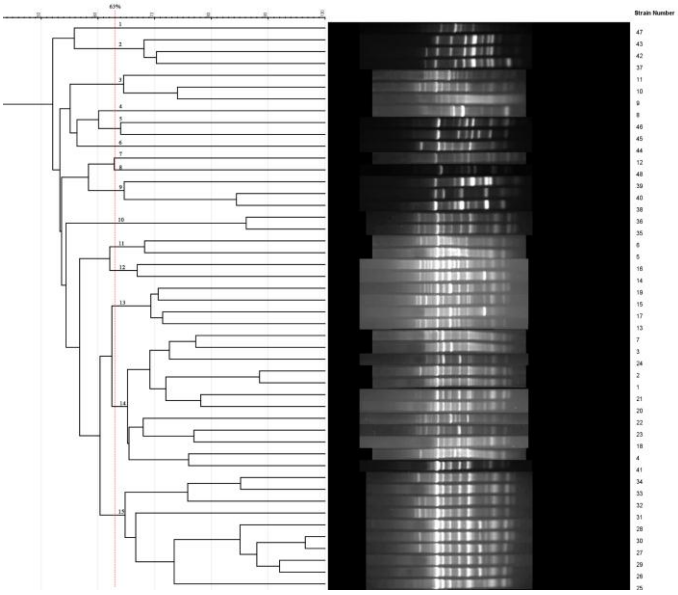
شماره سویه	نوع نمونه	کلاستر	شماره سویه	نوع نمونه	کلاستر	شماره سویه	نوع نمونه	کلاستر
۱	مدفوع	E14	۱۷	مدفوع	E13	۳۳	مدفوع	E15
۲	خون	E14	۱۸	خون	E14	۳۴	مدفوع	E15
۳	مدفوع	E14	۱۹	مدفوع	E13	۳۵	مدفوع	E10
٤	خون	E14	۲۰	خون	E14	۳۶	مدفوع	E10
۵	مدفوع	E11	۲۱	مدفوع	E14	۳۷	مدفوع	E2
٦	مدفوع	E11	۲۲	مدفوع	E14	۳۸	مدفوع	E9
۷	مدفوع	E14	۲۳	مدفوع	E14	۳۹	مدفوع	E9
۸	مدفوع	E4	۲۴	خون	E14	۴۰	مدفوع	E9
۹	مدفوع	E3	۲۵	مدفوع	E15	۴۱	خون	E14
۱۰	مدفوع	E3	۲۶	مدفوع	E15	۴۲	مدفوع	E2
۱۱	مدفوع	E3	۲۷	مدفوع	E15	۴۳	مدفوع	E2
۱۲	مدفوع	E7	۲۸	مدفوع	E15	۴۴	مدفوع	E6
۱۳	مدفوع	E13	۲۹	مدفوع	E15	۴۵	مدفوع	E5
۱٤	مدفوع	E12	۳۰	مدفوع	E15	۴۶	مدفوع	E5
۱۵	مدفوع	E13	۳۱	مدفوع	E15	۴۷	مدفوع	E1
۱٦	خون	E12	۳۲	مدفوع	E15	۴۸	مدفوع	E8
شماره سویه	**نوع نمونه**	**کلاستر**	**شماره سویه**	**نوع نمونه**	**کلاستر**	**شماره سویه**	**نوع نمونه**	**کلاستر**
۱	مدفوع	E14	۱۷	مدفوع	E13	۳۳	مدفوع	E15
۲	خون	E14	۱۸	خون	E14	۳۴	مدفوع	E15
۳	مدفوع	E14	۱۹	مدفوع	E13	۳۵	مدفوع	E10
٤	خون	E14	۲۰	خون	E14	۳۶	مدفوع	E10
۵	مدفوع	E11	۲۱	مدفوع	E14	۳۷	مدفوع	E2
٦	مدفوع	E11	۲۲	مدفوع	E14	۳۸	مدفوع	E9
۷	مدفوع	E14	۲۳	مدفوع	E14	۳۹	مدفوع	E9
۸	مدفوع	E4	۲۴	خون	E14	۴۰	مدفوع	E9
۹	مدفوع	E3	۲۵	مدفوع	E15	۴۱	خون	E14
۱۰	مدفوع	E3	۲۶	مدفوع	E15	۴۲	مدفوع	E2
۱۱	مدفوع	E3	۲۷	مدفوع	E15	۴۳	مدفوع	E2
۱۲	مدفوع	E7	۲۸	مدفوع	E15	۴۴	مدفوع	E6
۱۳	مدفوع	E13	۲۹	مدفوع	E15	۴۵	مدفوع	E5
۱٤	مدفوع	E12	۳۰	مدفوع	E15	۴۶	مدفوع	E5
۱۵	مدفوع	E13	۳۱	مدفوع	E15	۴۷	مدفوع	E1
۱٦	خون	E12	۳۲	مدفوع	E15	۴۸	مدفوع	E8

یافته‌ها

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

میانگین سنی افراد تحت مطالعه، ۵۵-۱۵ سال تعیین شد که ۲۵ مورد مرد و مابقی زن بودند. به‌طورکلی در آنالیز شکل‌ها و دندوگرام حاصل از آنها، تمامی سویه‌ها در سطح تشابه ۶۳٪ به ۱۵ کلاستر مجزا قابل‌تمایز بودند؛ به‌طوری‌که در گروه‌های E1، E4، E6، E7 و E8 هرکدام یک ایزوله، در گروه‌های E5، E10، E11 و E12، ۲ ایزوله؛ در گروه‌های E2، E3 و E9، ۳ ایزوله؛ در گروه‌های E13، ۴ ایزوله؛ در گروه E14؛ ۱۲ ایزوله و در گروه E15، ۱۰ ایزوله قرار گرفت (جدول شماره ۲).

دندوگرام سروتایپ‌های *سالمونلا تایفی موریوم* و نتایج حاصل از ERIC-PCR در شکل آمده است.



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

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

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

بحث

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

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

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

مباحث اپیدمیولوژی پیرامون اهمیت تیپ‌بندی سویه‌های میکروبی در بررسی کانون مشترک بیماری، بررسی انتشار عفونت از یک بیمار به بیمار دیگر، بررسی عفونت اسپورادیک، تعیین هویت تیپ‌های بیماریزای عوامل میکروبی، افتراق سویه‌های اندمیک از سویه‌های اپیدمی‌دهنده عوامل میکروبی، تمایز سویه‌های میکروبی به کار گرفته‌شده در همه‌گیری‌های عمدی از سویه‌های اندمیک جامعه، مونیتورینگ اقدامات درمانی، تعیین الگوی مقاومت و حساسیت آنتی‌بیوتیکی و بررسی شکست درمان دارویی می‌باشد (۱۴). دسته‌بندی سویه‌ها در چندین گروه متفاوت (با استفاده روش ERIC) می‌تواند یک زنگ خطر برای جامعه مورد بررسی باشد؛ از این نظر که گروه‌های متفاوت در ERIC می‌توانند به‌معنای منشأ تفاوت سویه‌ها و یا الگوهای مقاومت آنتی‌بیوتیکی، متفاوت باشند، لذا در ارائه و تجویز آنتی‌بیوتیک باید به نتایج روش ERIC توجه کرد تا اولاً نتایج درمانی بهتری به دست آید و دوماً با عدم تجویز نامناسب دارو، از بروز مقاومت آنتی‌بیوتیکی بیشتر جلوگیری شود. همچنین در صورتی‌که براساس نتایج ERIC مشخص گردد سویه‌ها منشأ متفاوتی داشته‌اند می‌توان این نتیجه را برداشت کرد که رعایت نکردن شرایط بهداشتی، همه‌گیری‌های عمدی مانند حملات بیوتروریستی، مصرف خودسرانه آنتی‌بیوتیک‌ها و یا سایر عوامل مؤثر در رفتارهای ژنتیکی باکتری‌ها، موجب ایجاد سویه‌ها با منشأ متفاوت شده است. بر این اساس باید یک جامعه را به‌طور مدام از نظر تغییر رفتارهای ژنتیکی باکتری‌ها زیر نظر داشت تا بتوان بهترین تصمیمات لازم را جهت جلوگیری از بروز خطرات و تهدیدات بهداشتی گرفت (۱۷،۱۴). بنابراین، این فرآیند از نظر اپیدمیولوژیکی جهت شناسایی همه‌گیری‌ها، تشخیص منبع عفونت‌ها، ردیابی و شناسایی سویه‌های بیماری‌زا، بررسی پاتوژن‌های کسب‌شده بیمارستانی و ارزیابی روش‌های کنترل عفونت، از اهمیت بالایی برخوردار است (۱۷). یافته‌های این پژوهش نشان داد ERIC-PCR می‌تواند ایزوله‌های *سالمونلا تایفی موریوم* را به‌خوبی تمیز دهد؛ چراکه تمامی ایزوله‌ها با این روش قابل‌تایپ‌بندی بودند، به‌طوری‌که این روش، سویه‌ها را به ۱۵ الگوی ژنتیکی متفاوت تقسیم‌بندی کرد. همچنین در این مطالعه مشاهده گردید برخی از سویه‌ها با الگوی یکسان ERIC-PCR، در مراکز درمانی مختلف یافت می‌شوند که نشان‌دهنده انتقال گسترده باکتری در بین این بیمارستان‌ها بود.

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

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

همچنین در مطالعات قبلی، ارزیابی قدرت تمایزی روش ERIC-PCR نیز محاسبه شد که براساس نتایج به‌دست‌آمده از تحقیق حاضر، قدرت تایپینگ روش ERIC-PCR، ۰/۸۳ به دست آمد. در مطالعه Gopal و همکاران در هند، تعداد ۱۱۳ سویه *سالمونلا* بررسی شد که از این تعداد، به‌صورت تصادفی ۸۹ و

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

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

نتیجه‌گیری

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

References:

1. Ranjbar R, Salimkhani E, Sadeghifard N, Yazdi JZ, Morovvati S, Jonaidi N, et al. An outbreak of gastroenteritis of unknown origin in Tehran, July 2003. Pak J Biol Sci 2007;10(7):1138-40.

2. Naghoni A, Ranjbar R, Tabaraie B, Farshad S, Owlia P, Safiri Z, et al. High prevalence of integron-mediated resistance in clinical isolates of Salmonella enterica. Jpn J Infect Dis 2010;63(6):417-21.

3. Lopez F, Mercedes Pescaretti, ML Morero R, Delgado M. Salmonella typhimurium general virulence factors: A battle of David against Goliath? Food Res Int 2012;45(2):4–8.

4. Skjolaas KA, Burkey TE, Dritz SS, Minton JE. Effects of Salmonella enterica serovars Typhimurium (ST) and Choleraesuis (SC) on chemokine and cytokine expression in swine ileum and jejunal epithelial cells. Vet Immunol Immunopathol 2006;111(3-4):199-209.

5. 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;37(5):1200–2.

6. 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.

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

8. De Bruijn F, Rademaker J, Schneider M, Rossbach U, Louws F. Rep- PCR genomic fingerprinting of plant- associated bacteria and computer- assisted phylogenetic analyses. APS Press; 1996. p. 497-502.

9. Louws FJ, Fulbright DW, Stephens CT, de Bruijn FJ. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic Xanthomonas and Pseudomonas pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. Appl Environ Microbiol 1994;60(7):2286–95.

10. Weigel RM, Qiao B, Teferedegne B, Suh DK, Barber DA, Isaacson RE, et al. Comparison of pulsed field gel electrophoresis and repetitive sequence polymerase chain reaction as genotyping methods for detection of genetic diversity and inferring transmission of Salmonella. Vet Microbiol 2004;100(3-4):205-17.

11. Chmielewski R, Wieliczko A, Kuczkowski M, Mazurkiewicz M, Ugorski M. Comparison of ITS profiling, REP- and ERIC-PCR of Salmonella Enteritidis isolates from Poland. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 2002;49(4): 163–8.

12. Burr MD, Josephson KL, Pepper IL. An evaluation of ERIC PCR and AP PCR fingerprinting for discriminating Salmonella serotypes. Lett Appl Microbiol 1998;27(1):24–30.

13. Ranjbar R, Hosseini Doust SR. A reveiw of molecular methods used for epidemiological studies of iological agent. J Mil Med 2003;5(2):157-64.

14. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: A review for healthcare epidemiologist. Infect Control Hosp Epidemiol 1997;18(6): 426-39.

15. Eshraghi S, Soltan Dalall M, Fardsanei F, 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. [Full Text in Persian]

16. Stevens A, Kerouanton A, Marault M, Millemann Y, Brisabois A, Cavin J-F, et al. Epidemiological analysis of Salmonella enterica from beef sampled in the slaughterhouse and retailers in Dakar (Senegal) using pulsed-field gel electrophoresis and antibiotic susceptibility testing. Int J Food Microbiol 2008;123(3):191–7.

17. Muin JK, Terri HB, Bernice HC. Fundamentals of genetic epidemiology. Oxford: Oxford University Press; 1993.

18. Lim H, Kyung HL, Chong-Hae H, Bahk GJ, Choi WS. Comparison of four molecular typing methods for the differentiation of Salmonella spp. Int J Food Microbiol 2005;105(3):411-8.

19. Saxena MK, Singh VP, Lakhcharua BD, Taj G, Sharma B. Strain differentiation of Indian isolates of Salmonella by ERIC-PCR. Res Vet Sci 2002;73(3):313-4.

20. Agin H, Ayhan FY, Gülay Z, Gülfidan G, Yaşar N. The evaluation of clusters of hospital infections due to multidrug-resistant Salmonella enterica serovar typhimurium in the neonatal unit: A two-year experience. Turk J Pediatr 2011;53(5):517-21.

21. Fardsanei F, Seifi M, Eshraghi S, Zahraie Salehi T, Poorman MR, Ranjbar R, et al. Genotyping of Salmonella entritidis strains isolated from human and food sources by ERIC-PCR and determining their antibiotic resistance patterns. Trop infect Dis J. 2010;15(51):7–13. [Full Text in Persian]

22. Nath G, Maurya P, Gulati AK. ERIC PCR and RAPD based fingerprinting of Salmonella Typhi strains isolated over a period of two decades. Infect Genet Evol 2010;10(4):530–6.

23. Ranjbar R, Torabi R, Mirzaie A. Molecular typing of Salmonella enteritidis strains isolated in several laboratory centers in Tehran by ERIC-PCR. Sci J Kurdestan Univ Med Sci 2013;18(2):77–85. [Full Text in Persian]

24. Soria G, Barbé J, Gibert I. Molecular fingerprinting of Salmonella typhimurium by IS200-typing as a tool for epidemiological and evolutionary studies. Microbiologia 1994;10(1-2):57-68.