Journal of Military Medicine
Spring 2014 ,Volume 16, Issue 1
Pages: 17-22

Molecular Typing of Salmonella Infantis Clinical Strains Isolated in Tehran

Ranjbar R.[*1] PhD, Mirzaie A.[1] MSc, Sadeghifard N.[2] PhD, Jonaidi N.[3] MD

[1]*Molecular Biology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
[2]*Clinical Microbiology Research Center, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran*
[3]*Health Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran*

Abstract

Aims: *Salmonella* spp are among the most important food-borne pathogens both in humans and animals. The purpose of this study was to investigate the molecular types of *S. infantis* strains isolated in Tehran, Iran.

Methods: Over a two year study, *S. infantis* strains isolated from various clinical samples in several hospitals of Tehran, were included in the study. Then, standard microbiological and serological methods were applied in order to identify isolated strains. Phenol-chlorophorm technique also was used to extract bacterial DNA. The clonal relatedness between the isolated strains was studied by Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Polymerase Chain Reaction (ERIC- PCR).

Results: 40 isolated strains were identified as *S. infantis* which were further studied by ERIC-PCR. This technique produced 4 to 11 DNA bands. Besides, it divided all *S. infantis* strains into 8 genotype groups (I1-I8). I1 genotype group was the most common cluster (47.5%).

Conclusion: The results of study suggest that *S. infantis* strains recovered from clinical cases in Tehran, had a large genetic diversity. We also found the ERIC-PCR as a useful method for molecular typing of *S. infantis* isolated strains.

Keywords: *Salmonella Infantis*, Genetic Diversity, Molecular Typing

[*]Corresponding author: Ranjbar R. Email: ranjbar@bmsu.ac.ir

مجله طب نظامی
دوره ۱۶، شماره ۱، بهار ۱۳۹۳
صفحات: ۲۲-۱۷

مولکولار تایپینگ ایزوله‌های بالینی سالمونلا اینفنتیس جدا شده در تهران

رضا رنجبر[1*] PhD، امیر میرزایی[1] MSc، نورخدا صادقی فرد[2] PhD، نعمت‌الله جنیدی جعفری[3] MD

[1] مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران
[2] مرکز تحقیقات میکروب‌شناسی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، ایلام، ایران
[3] مرکز تحقیقات بهداشت نظامی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران

چکیده

اهداف: گونه‌های سالمونلا یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای انسان و حیوانات بوده که عمدتاً از راه مواد غذایی منتقل می‌شوند. هدف این مطالعه تعیین تایپ‌های ایزوله‌های بالینی سالمونلا اینفنتیس جداسازی شده در شهر تهران می‌باشد.

روش‌ها: این مطالعه توصیفی- مقطعی بر روی ایزوله‌های سالمونلا اینفنتیس که از چند بیمارستان شهر تهران جداسازی شده بودند، انجام گرفت. تمامی ایزوله‌ها با استفاده از روش‌های معمول میکروبیولوژی و توسط آنتی سرم های تجاری در دسترس مورد شناسایی قرار گرفتند. استخراج ژنوم از ایزوله‌های مورد نظر از طریق روش فنل-کلروفرم انجام و در نهایت رابطه ژنتیکی سویه‌ها از طریق بررسی گوناگونی نواحی بین ژنی انتروباکتریایی تعیین شد.

یافته‌ها: تعداد ۴۰ ایزوله سالمونلا انتریکا سرووار ایفنتیس از نمونه‌های بالینی مشکوک به وجود سالمونلا، جداسازی و جهت مطالعه بیشتر مولکولی، مورد استفاده قرار گرفت. تکثیر نواحی بین ژنی انتروباکتریایی، باندهایی کاملاً مشخص به تعداد ۴ تا ۱۱ ایجاد نمود. هشت الگوی مختلف حاصل شد که بیش‌ترین تعداد ایزوله‌ها در گروه اول (I1) با تعداد ۱۹ ایزوله (۴۷/۵٪) جای گرفتند.

نتیجه‌گیری: سویه‌های سالمونلا اینفنتیس در بیمارستان‌های مورد بررسی از نظر ژنتیکی متنوع بودند که این موضوع نشان‌دهنده شیوع پلی کلونال سویه‌ها در نمونه‌های انسانی می‌باشد. همچنین نشان داده شد که ERIC-PCR روش مناسبی جهت تایپینگ مولکولی سویه‌ها سالمونلا و تعیین کانون‌های شیوع عفونت می‌باشد و می‌توان از آن جهت مطالعات اپیدمیولوژیک و تعیین راهبردهای کنترل عفونت استفاده نمود.

کلیدواژه‌ها: سالمونلا اینفنتیس، تنوع ژنتیکی، تایپینگ مولکولی

*نویسنده مسئول: رضا رنجبر. پست الکترونیک: ranjbar@bmsu.ac.ir
دریافت مقاله: ۹۱/۱/۲۸ پذیرش مقاله: ۹۲/۱۲/۱۵

مقدمه

سالمونلوز یکی از مهم‌ترین بیماری‌های باکتریایی روده‌ای است که توسط گونه‌های سالمونلا ایجادشده و در سرتاسر جهان میلیون‌ها انسان و حیوان را درگیر می‌کند. گونه‌های سالمونلا، باکتری‌های گرم منفی و جزء عوامل بیماری‌زای ایجادکننده گاستروانتریت و منتقله از راه مواد غذایی هستند [۱, ۲]. به طور کلی در یک نوع تقسیم‌بندی، سروتایپ‌های سالمونلا به دو دسته سالمونلا تیفوئیدی و سالمونلا غیر تیفوئیدی تقسیم می‌شوند. سالمونلاهای غیر تیفوئیدی معمولاً باعث ایجاد گاستروانتریت های خود محدود شونده در میزبان‌های سالم می‌شوند. به گزارش سازمان بهداشت جهانی، سالیانه بالغ بر ۱۶ تا ۳۳ میلیون مورد بیمار و ۵۰۰ تا ۶۰۰ هزار مرگ ناشی از سالمونلا اتفاق می‌افتد که این مسئله به عنوان یک معضل بزرگ بهداشتی در کشورهای در حال توسعه از جمله کشور ما می‌باشد [۱, ۳]. میزان بروز عفونت‌های سالمونلاهای غیر تیفوئیدی در بعضی از کشورها از جمله کانادا در سال ۲۰۰۹ به میزان ۱۸/۹ نفر در هر ۱۰۰۰۰۰ نفر و در سال ۲۰۰۷ در ایالات‌متحده به ۱۴/۸۶ در هر ۱۰۰۰۰۰ نفر گزارش شده است. در میان نوزادان کمتر از ۳ ماه که با سالمونلاهای غیر تیفوئیدی آلوده می‌شوند، گاهی اوقات تهاجم نیز مشاهده می‌شود و منجر به باکتریمی و عفونت‌های روده‌ای می‌گردد [۴, ۵].

گسترش سالمونلاهای غیر تیفوئیدی یکی از مهم‌ترین موضوعات قابل بررسی در تحقیقات امروزی می‌باشد زیرا برای درمان آن در نوزادان و خردسالان گزینه‌های درمانی کمی وجود دارد و بنابراین تشخیص و تایپینگ سریع این پاتوژن ها و تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی، اطلاعات مناسبی در مورد انتخاب داروی مناسب، ردیابی و کنترل عفونت و کاهش مصرف داروهای غیر ضروری، در اختیار قرار می‌دهد [۶]. یکی از رایج‌ترین سروتایپ‌های سالمونلاهای غیر تیفوئیدی زیرگونه انتریکا سرووار اینفنتیس است که معمولاً، سالمونلا اینفنتیس نامیده می‌شود. سالمونلا اینفنتیس عمدتاً از طریق تماس مستقیم و غیرمستقیم انسان با منشأ آلوده منتقل می‌شود [۷].

قبل از ابداع روش‌های بیولوژی مولکولی، دانشمندان برای تحقیق در مورد گسترش بیماری، یافتن منابع عفونت و نیز نحوه انتشار عفونت، با مشکلات زیادی مواجه بودند و مطالعات اولیه اپیدمیولوژیک در مورد عفونت‌های سالمونلاهای غیر تیفوئیدی توسط روش‌های فنوتیپیک از جمله سروتایپینگ، بیوتایپینگ، کولیسین تایپینگ، بررسی الگوهای مقاومت آنتی بیوتیکی و تعیین پروفایل پلاسمیدی انجام می‌شد. به علت این که روش‌های فنوتیپیک زمان بر، پر هزینه و خسته کننده است، از نظر اپیدمیولوژیک دارای ارزش محدود بوده و قدرت افتراق دهی بین سویه‌هایی که ارتباط بسیار نزدیکی با هم دارند را ندارند [۸-۱۰]. در سال‌های اخیر، تکنیک‌های مولکولی همانند ریبوتایپینگ، RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) [۱۱]، AP PCR (arbitrary primers-PCR)، rep-PCR (Repeated sequences-PCR) [۱۲]، RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) [۱۳]، ERIC PCR (Enterobacterial Repetitive Intragenic Consensus Sequence PCR) [۱۴]، PFGE (Pulse Field Gel Electrophoresis) جهت تایپینگ و تمایز ایزوله‌های سالمونلا بکار گرفته می‌شود [۱۵].

تایپینگ مولکولی بر اساس روش ERIC-PCR با استفاده از اولیگونوکلئوتیدهای تکرارشونده به عنوان آغازگر سریع تر بوده و دارای قدرت تمایزی مناسبی است و در هر آزمایشگاهی که دارای قابلیت انجام روش PCR است قابل انجام است.

توالی‌های ERIC در واقع توالی‌های 124-127bp هستند که واجد یک ناحیه معکوس تکرارشونده مرکزی حفاظت‌شده 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 می‌روند [۱۶]. هدف این مطالعه تعیین تایپ‌های مولکولی سویه‌های سالمونلا انتریکا سروتایپ اینفنتیس جداشده در تهران از طریق بررسی گوناگونی نواحی بین ژنی انتروباکتریایی با استفاده از روش ERIC-PCR است.

روش‌ها

ایزوله‌های باکتریایی

در این مطالعه توصیفی-مقطعی طی مدت ۲ سال (از سال ۱۳۸۶ تا ۱۳۸۸)، تمام نمونه‌های بالینی بیماران مشکوک به عفونت سالمونلا که به بیمارستان‌های مرکز طبی کودکان، بقیه الله (عج) و برخی از آزمایشگاه‌های سطح شهر مراجعه کرده بودند، اخذ شد. سویه‌های سالمونلا انتریکا سروتایپ ایفنتیس از نمونه‌های بالینی از جمله مدفوع بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان‌های بقیه الله (عج) و مرکز طبی کودکان جداسازی شد. همه این ایزوله‌ها توسط روش‌های متداول بیوشیمیایی و میکروسکوپی شناسایی شدند، بدین ترتیب که ابتدا نمونه‌ها بر روی محیط‌های کشت انتخابی سالمونلا-شیگلا آگار انتقال یافته و بعد از ۲۴ ساعت انکوبه گذاری، کلنی‌های مشکوک به سالمونلا جداسازی و توسط تست‌های بیوشیمیایی شناسایی شدند و در انتها پس از انجام آزمون‌های افتراقی تست سروتایپینگ با استفاده از آنتی سرم O و H بر پایه اسلاید آگلوتیناسیون تعیین هویت گردیدند [۱۷]. هم چنین تمامی ایزوله‌های سالمونلای مورد نظر در نوترینت براث حاوی ۲۰ درصد گلیسرول در ۸۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان انجام آزمایشات مولکولی نگه‌داری شدند.

استخراج DNA

به منظور استخراج DNA از ایزوله‌های مورد نظر از روش فنل-کلروفرم استفاده شد، بطوریکه در ابتدا کلنی‌های خالص سالمونلا به مدت ۲۴ ساعت بر روی محیط کشت LB broth کشت داده شد. بعد از گذشت این زمان، به منظور تهیه رسوب

باکتریایی، سوسپانسیون باکتریایی به مدت ۱۰ دقیقه و در rpm ۱۶۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. سپس به رسوب حاصله، ۶۲۰ میکرولیتر بافر لیز، ۱۳ میکرولیتر پروتئیناز K (20mg/ml) افزوده شد و این سوسپانسیون در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت انکوبه گذاری شد. بعد از این مدت از محلول فنل-کلروفرم ایزوآمیل الکل برای جداسازی پروتئین‌ها استفاده شد و در مرحله نهایی جهت خالص‌سازی DNA، از محلول اتانول ۹۰ و ۷۰ درصد سرد استفاده شد و در نهایت برای تعیین خلوص DNA، از الکتروفورز بر روی ژل و تعیین نسبت جذب OD260/OD280 توسط اسپکتروفتومتر انجام شد.

انجام روش ERIC-PCR

طبق بررسی‌های به عمل آمده و مرور مطالعات انجام‌شده قبلی توسط سایر محققین، جفت پرایمرهای:

ERIC1R 5′-ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC-3′
ERIC2 5′-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3′

جهت انجام ERIC-PCR انتخاب گردید [۱۸] و DNA های متعلق به سویه‌های مختلف تکثیر داده شدند. 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 بود، انجام شد. شرایط دمایی و زمانی واکنش ERIC-PCR با کمی اصلاحات به ترتیب ذکر شده در جدول ۱ انجام گرفت [۱۹].

جدول ۱. نحوه انجام واکنش PCR

مراحل	دما (سانتیگراد)	زمان (دقیقه)	تعداد چرخه
Initiation denaturation	۹۴	۴	۱
Denaturation	۹۴	۱	۳۵
Annealing	۵۲	۱	۳۵
Extension	۶۵	۸	۳۵
Final extension	۶۵	۱۵	۱

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.

روش تجزیه تحلیل داده‌ها

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. سپس دستجات الگوها بر اساس شباهت شکل‌گرفته و فراوانی این دستجات در میان سرو تایپ‌های مجزا محاسبه گردید.

نتایج

از طریق شناسایی میکروبی و بیوشیمیایی ۱۳۸ نمونه بالینی مشکوک به وجود سالمونلا، تعداد ۴۰ ایزوله سالمونلا انتریکا سرووار ایفنتیس جداسازی و جهت مطالعات مولکولی و ERIC-PCR مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۲).

جدول ۲. مشخصات ایزوله‌های سالمونلا اینفنتیس

شماره سویه	بیمارستان	الگوی ERIC	شماره سویه	بیمارستان	الگوی ERIC
۱	مرکز طبی کودکان	I1	۸۱	مرکز طبی کودکان	I7
۲	مرکز طبی کودکان	I1	۸۳	مرکز طبی کودکان	I1
۳	مرکز طبی کودکان	I1	۹۷	مرکز طبی کودکان	I1
۴	مرکز طبی کودکان	I1	۹۸	مرکز طبی کودکان	I1
۵	مرکز طبی کودکان	I1	۹۹	مرکز طبی کودکان	I1
۷	مرکز طبی کودکان	I1	۱۰۳	مرکز طبی کودکان	I1
۸	مرکز طبی کودکان	I2	۱۰۴	مرکز طبی کودکان	I2
۹	مرکز طبی کودکان	I2	۱۰۵	مرکز طبی کودکان	I2
۱۰	مرکز طبی کودکان	I6	۱۰۶	مرکز طبی کودکان	I8
۱۱	مرکز طبی کودکان	I1	۱۱۲	مرکز طبی کودکان	I2
۱۲	مرکز طبی کودکان	I1	۱۱۳	مرکز طبی کودکان	I2
۱۳	مرکز طبی کودکان	I1	۱۱۷	مرکز طبی کودکان	I2
۱۴	مرکز طبی کودکان	I1	۱۲۰	مرکز طبی کودکان	I2
۳۷	مرکز طبی کودکان	I1	۱۲۱	مرکز طبی کودکان	I2
۳۹	مرکز طبی کودکان	I3	۱۳۵	مرکز طبی کودکان	I4
۴۰	مرکز طبی کودکان	I3	۱۳۹	بقیه الله	I4
۴۳	بقیه الله	I3	۱۴۳	بقیه الله	I5
۴۷	بقیه الله	I5	۱۴۷	بقیه الله	I1
۶۴	مرکز طبی کودکان	I3	۱۴۸	بقیه الله	I1
۶۷	مرکز طبی کودکان	I3	۱۴۹	بقیه الله	I1

پس از انجام کلیه مراحل PCR و تهیه عکس از الگوهای الکتروفورزی این سروتایپ و بررسی تشابه ژنتیکی آن‌ها، تعداد باندهای کاملاً مشخص به تعداد ۴ تا ۱۱ به‌دست آمده بود. پس از مقایسه این باندها با هم، هشت الگوی مختلف حاصل شد. بیش‌ترین تعداد متعلق به گروه اول (I1) با تعداد ۱۹ ایزوله، گروه دوم (I2) شامل ۹ ایزوله، گروه سوم (I3) ۵ ایزوله، گروه چهارم و پنجم (I4,I5) هر کدام دو ایزوله و گروه‌های ششم، هفتم و هشتم (I6,I7,I8) هر کدام یک ایزوله را شامل می‌شدند (شکل ۱).

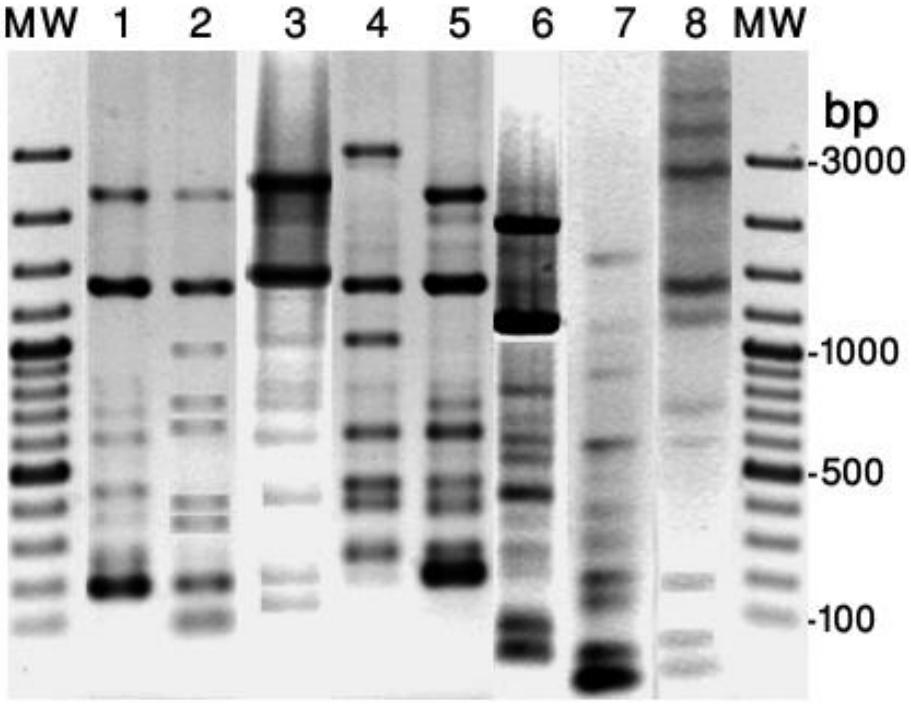
بحث

سرو تایپ‌های سالمونلا از جمله سروتایپ اینفنتیس جزء رایج‌ترین سروتایپ در اکثر نقاط جهان از جمله ایران است. این سروتایپ در طی زمان دچار تغییرات ژنتیکی شده و از نظر جغرافیایی در مناطق مختلف دارای ویژگی‌های ژنوتیپی متفاوت می‌باشد؛ بنابراین ژنوتایپینگ دقیق این سروتایپ، اطلاعات زیادی در مورد اپیدمیولوژی و شناسایی منابع عفونت آن به منظور کنترل عفونت و نظارت اپیدمیولوژیک در اختیار قرار می‌دهد [۲۰].

روش‌های مختلفی بر پایه DNA جهت ژنوتایپینگ سویه‌ها وجود دارد اما بسیاری از آن‌ها زمان بر و خسته‌کننده بوده، از نظر اقتصادی مقرون به صرفه نبوده و دارای قدرت افتراق دهی مناسبی نیستند. از ویژگی‌های مهم دیگر روش ERIC-PCR، دسترس بودن، سرعت بالا، راحتی استفاده و قابل انجام بودن در هر آزمایشگاه تحقیقاتی است [۲۱].

در این مطالعه سویه‌های سالمونلا اینفنتیس از فراوانی نسبتاً بالایی (۳۰٪) برخوردار بود. در مطالعه‌ای که توسط Nogrady و همکاران در سال ۲۰۰۷ در مجارستان انجام شد، تعداد ۱۷ سویه سالمونلا اینفنتیس از نمونه‌های مدفوعی انسان و تعداد ۱۲۸ سویه از نمونه‌های مدفوعی جوجه‌ها جدا کردند و در این مطالعه نیز این سروتایپ از فراوانی بیشتری برخوردار بود [۲۲]. در مصر در سال ۲۰۰۹ از مجموع ۱۰۵ ایزوله سالمونلا جداشده از نمونه‌های مواد غذایی ۲۵ ایزوله مربوط به سالمونلا سروتیپ اینفنتیس بود که نسبت به سایر سروتیپ های سالمونلا بیش‌ترین موارد جداشده از نمونه‌های مواد غذایی بود [۲۳]. هم چنین در سال ۲۰۰۳ در آرژانتین، سالمونلا انتریکا سرووار اینفنتیس دومین عامل شایع در میان سرو تیپ‌های سالمونلا در میان کودکان بستری‌شده در بیمارستان بود [۲۴].

در مطالعه حاضر از روش ERIC-PCR جهت ژنوتایپینگ سویه مورد استفاده قرار گرفت. نتایج مطالعه ما نشان داد که روش ERIC-PCR دارای قدرت افتراق پذیری مناسبی جهت تمایز ایزوله‌های سالمونلا اینفنتیس بود. کاربرد روش ERIC-PCR جهت ژنوتایپینگ سویه‌های سالمونلا در مطالعات مختلف دیگری نیز نشان داده شده است. Cheielewsk و همکارانش در سال ۲۰۰۲، ۳۱ ایزوله سالمونلا را با روش‌های ERIC-PCR و Rep-PCR و ریبوتایپینگ تفریق سویه‌ای نموده و این سه روش را مورد مقایسه قراردادند و نتیجه گرفتند که در بین این سه روش ERIC و Rep دارای قدرت افتراق بیشتری از ریبوتایپینگ می‌باشند. در این مطالعه، ERIC-PCR بهترین حساسیت و قدرت افتراق دهی را دارا بود [۲۵].



شکل ۱. نتایج الکتروفورز ERIC-PCR ایزوله‌های سالمونلا اینفنتیس بر روی ژل آگارز رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید. ستون MW: سایز مارکر، ستون‌های ۱ تا ۸ محصولات ERIC-PCR سویه‌های نماینده ۸ الگوی مختلف سالمونلا انتریکا سروتایپ اینفنتیس.

هم چنین Suh و همکاران، ۲۲ ایزوله سالمونلا انسانی و طیوری جداشده از مناطق مختلف در کره را مورد مطالعه قراردادند. آن‌ها از روش‌های تعیین حساسیت دارویی، پلاسمید تایپینگ و ERIC-PCR برای افتراق سویه‌های سالمونلا بهره بردند که شباهت ژنتیکی بسیار زیادی در این تحقیق با استفاده از پرایمرهای ERIC در این ایزوله‌ها دیده شد [۲۶].

نتایج مطالعه ما با مطالعات Van Lith و همکارانش نیز قابل مقایسه بود. در این مطالعه نشان دادند که روش ERIC-PCR دارای قدرت تمایزی مناسبی بوده و سویه‌های سالمونلا را به الگوهای متفاوتی تقسیم‌بندی می‌کند و ارتباطات ژنتیکی سویه‌ها را نیز نشان می‌دهد [۲۷]. در مطالعه‌ای که توسط صانعی و همکارانش در سال ۱۳۸۷ و در شهر تهران بر روی ۳۰ ایزوله جداشده سالمونلا اینتریتیدیس صورت گرفت، از دو پرایمر ERIC و (GTG)5 استفاده شد و نتایج ERIC-PCR، ایزوله‌های موجود را در دو گروه بزرگ با درصد تشابه ۹۵ درصدی قرارداد. نتیجه نهایی در آن مطالعه نشان‌دهنده آن بود که منشأ تمام سویه‌ها از یک کلون واحد یا کلون‌های محدود بسیار محتمل می‌باشد [۲۸] ولی نتایج این مطالعه نشان‌دهنده افزایش تعداد کلون‌ها در شهر تهران و هشداری برای پیدایش سویه‌های جدیدتر در محیط بین انسان و حیوانات می‌باشد.

بررسی ارتباطات کلونالیتی و الگوهای ژنتیکی توسط روش ERIC-PCR در مطالعات مختلف دیگری نیز نشان داده شده است. Agin و همکارانش در سال ۲۰۱۱ سویه‌های ۸۶ نمونه مدفوع و خون از بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان طی دو سال جهت شناسایی سالمونلا را مورد مطالعه قراردادند و به دنبال شناسایی سویه‌ها، الگوهای ژنتیکی و ارتباطات کلونالیتی را در سویه‌ها توسط روش ERIC-PCR مورد ارزیابی قراردادند و روش ERIC-PCR توانست سویه‌ها را به ۷ الگوی ژنتیکی تقسیم بندی کند [۲۹].

با توجه به مطالعه انجام‌شده قبلی ما با استفاده از ریبوتایپینگ روی این ایزوله‌ها، تعداد ۹ ریبوتایپ یافت شد، در صورتی که در این مطالعه با استفاده از روش ERIC-PCR تعداد ۸ الگوی ژنتیکی یافت شد که نشان می‌دهد تکنیک ERIC-PCR بکار گرفته شده در مطالعه حاضر نسبت به ریبوتایپینگ از قدرت افتراق دهی نسبتاً کمتری برخوردار است [۳۰].

نتیجه‌گیری

به طور کلی نتایج این مطالعه نشان داد که سویه‌های سالمونلا اینفنتیس در بیمارستان‌های مورد بررسی از نظر ژنتیکی متنوع هستند و این موضوع نشان‌دهنده شیوع پلی کلونال سویه‌ها در نمونه‌های انسانی می‌باشد. همچنین روش ERIC-PCR روش مناسبی جهت تایپینگ مولکولی سویه‌های سالمونلا و تعیین کانون‌های شیوع عفونت می‌باشد که می‌توان از آن جهت مطالعات اپیدمیولوژیک و تعیین راهبردهای کنترل عفونت استفاده نمود. پیشنهاد می‌شود مطالعات بیشتری از این دست در استان‌های دیگر کشور انجام شود تا تصویر جامع تری از مولکولار اپیدمیولوژی و ارتباط کلون‌های سالمونلا اینفنتیس در کشور به‌دست آید. هم چنین پیشنهاد می‌گردد از سایر روش‌های تایپینگ مولکولی همانند FGE نیز جهت مقایسه نتایج استفاده شود.

تشکر و قدردانی: این تحقیق برگرفته از نتایج یکی از طرح‌های تحقیقاتی مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) می‌باشد. بدین وسیله از همکاران آزمایشگاهی این مرکز که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند کمال تشکر را داریم.

منابع

1. Naghoni A, Ranjbar R, Tabaraie B, Farshad S, Owlia P, Safiri Z, et al. High prevalence of integron mediated resistance among clinical isolates of Salmonella enterica strains. Jpn J Infect Dis. 2010;63(6):417-21.
2. 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.
3. Ranjbar R, Giammanco G, Aleo A, Plano M, Naghoni A, Owlia P, et al. Characterization of the first extended-spectrum β lactamase–producing non typhoidal Salmonella strains isolated in Tehran, Iran. Foodborne Pathog Dis. 2010;7(1):91-5.
4. Amini K, Salehi TZ, Nikbakht G, Ranjbar R, Amini J, Ashrafganjooei SB. Molecular detection of invA and spv virulence genes in Salmonella enteritidis isolated from human and animals in Iran. Afr J Microbiol Res. 2010;4(21):2202-10.
5. Fierer J, Swancutt M. Non-typhoid Salmonella: a review. Curr Clin Top Infect Dis. 2000;20:134-57.
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. Wilson R, Feldman RA, Davis J, Laventure M. Salmonellosis in infants: the importance of intrafamilial transmission. Pediatrics. 1982;69(4):436-8.
8. Llanes C, Kirchgesner V, Plesiatl P. Propagation of TEM and PSE type β lactamases among amoxicillin resistant Salmonella spp. isolated in France. Antimicrob Agents Chemother. 1999;43:2430-6.
9. 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.
10. Munoz P, Diaz MD, Rodriguez-Creixems M, Cercenado E, Pelaez T ,Bouza E. Antimicrobial resistance of Salmonella isolates in a Spanish hospital. Antimicrob Agents Chemother.

1993;37(5):1200-2.
11. Tompkins L, Troup N, Lbaignea-Roussel A, Cohen M. Cloned random chromosomal sequences as probes to identify Salmonella species. J Infect Dis. 1986;154:156-62.
12. Albufera U, Bhugaloo-Vial P, Issack M, Jaufeerally-Fakim Y. Molecular characterization of Salmonella isolates by REP PCR and RAPD analysis. Infect Genet Evol. 2009 May;9(3):322-7.
13. Lin AW, Usera MA, Barrett TJ ,Goldsby RA. Application of random amplified polymorphic DNA analysis to differentiate strains of Salmonella enteritidis. J Clin Microbiol. 1996;34(4):870-6.
14. 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(5):413-6.
15. Hudson C, Garcia M, Gast R, Maurer J. Determination of close genetic relatedness of the major Salmonella enteritidis phage types by pulsed-field gel electrophoresis and DNA sequence analysis of several Salmonella virulence genes. Avian Dis. 2001;48:875-86.
16. Hulton CS, Higgins CF, Sharp PM. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of Escherichia coli, Salmonella typhimurium and other enterobacteria .Mol Microbiol. 1991;5(4):825-34.
17. Eshraghi S, Soltan Dalall MM, Fardsanei F, Zahraii Salehi T, Ranjbar R, Nikmanesh B, et al. Salmonella enteritidis and antibiotic resistance patterns: A study on 1950 children with diarrhea. Tehran Univ Med J. 2010;67(12):876-82. Persian.
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(24):6823-31.
19. Ranjbar R, Rahbar M, Naghoni A, Farshad S, Davari A, Shahcheraghi F. A cholera outbreak associated with drinking contaminated well water. Arch Iran Med. 2011;14(5):339-40.
20. Ross IL, Heuzenroeder MW. A comparison of three molecular typing methods for the discrimination of Salmonella enterica serovar Infantis. FEMS Immunol Med Microbiol. 2008;53(3):375-84.
21. 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;104(1):93-103.
22. Nogrady N, Kardos G, Bistyak A, Turcsanyi J, Meszaros D, Galantai E, et al. E, Kaszanyitzky J, Paszti I. Prevalence and characterization of Salmonella infantis isolates originating from different points of the broiler chicken-human food chain in Hungary. Int J Food Microbiol. 2008;127:162-7.
23. Bouchrif B, Paglietti B, Murgia M, Piana A, Cohen N, Ennaji MM, et al. Prevalence and antibiotic-resistance of Salmonella isolated from food in Morocco. J Infect Dev Ctries. 2009;3(1):35-40.
24. Merino L, Ronconi M, Navia M. Analysis of the clonal relationship among clinical isolates of Salmonella enterica serovar Infantis by different typing methods. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2003;45:119-23.
25. Chmielewsk R, Wieliczko A, Kuczkowski M, Mazurkiewicz M, Ugorski M. Comparison of ITS profiling, Rep- and ERIC PCR of Salmonella enteritidis. J Vet Med Sci. 2001;49:163-8.
26. Suh D, Song G. Analysis of Salmonella enterica serotype entreritidis isolated from human and chickens by repetitive sequence- PCR Fingerprinting, antibiotic resistance and plasmid profiles. J Vet Sci. 2006;7(1):37-41.
27. Van Lith LA, Aarts HJ. Polymerase chain reaction identification of Salmonella serotypes. Lett Appl Microbiol. 1994;19(4):273-6.
28. Fard Sanei F, Seifi M, Eshraghi S, Zahraie Salehi T, Pourmand MR, Ranjber R, et al. [Molecular epidemiology and plasmid profiling of Salmonella enteritidis isolated from clinical samples and determination of antibiotic resistant profile]. Iranian J Infect Dis Trop Med. 2008;14(1):55-60. Persian.
29. Agin H, Ayhan FY, Gulay Z, Gulfidan G, Yasar N, Erac B, et al. 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.
30. Ranjbar R, Sarshar M, Sadeghifard N. Characterization of genetic diversity among clinical strains of Salmonella enterica serovar infantis by ribotyping method. J Zanjan Univ Med Sci Health Serv. 2012;20(81):75-84.