مقاله تحقیقی

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره پانزدهم، شمارهٔ ۱، دی ۱۳۹۱، صفحه ۵۷-۵۱

# بررسی تنوع ژنوتایپی سویه های سالمونلا تایفی موریوم با استفاده از روش ERIC-PCR

رضا رنجبر(PhD) [*۱]، امیر میرزایی(MSc) [۱]

۱- مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله

دریافت: ۹۰/۱۲/۱۲، اصلاح: ۹۱/۲/۱۳، پذیرش: ۹۱/۴/۱۴

## خلاصه

**سابقه و هدف:** سالمونلا انتریکا سروار تایفی موریوم یکی از شایع ترین سرووارهایی است که در سراسر دنیا از نمونه های آلوده به سالمونلا جداسازی می شود. تایپینگ مولکولی سرووارهای سالمونلا، اهمیت اپیدمیولوژیک دارند. این مطالعه به منظور بررسی تنوع ژنوتایپی سویه های سالمونلا تایفی موریوم بر اساس واکنش زنجیره ای پلی مرازی مناطق بین ژنی تکراری حفاظت شده انتروباکتریایی Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC-PCR) انجام شد.

**مواد و روشها:** در این مطالعه مقطعی، طی سال های ۱۳۸۶ لغایت ۱۳۸۸، نمونه های بالینی از بیماران مراجعه کننده به سه بیمارستان مختلف شهر تهران جمع آوری شد. جداسازی ایزوله های سالمونلا از طریق کشت بر روی محیط های کشت مناسب انجام گرفت و سروتایپینگ سویه ها با استفاده از آنتی سرم های تجاری در دسترس صورت پذیرفت. سرانجام تنوع ژنتیکی سویه ها با استفاده از روش ERIC-PCR تعیین شد.

**یافته ها:** از مجموع ۶۵۰ نمونه بالینی مورد مطالعه، تعداد ۲۱ مورد بر اساس تست های میکروبیولوژی و سروتایپینگ، سالمونلا تایفی موریوم تشخیص داده شدند. با استفاده از روش ERIC-PCR، سویه های سالمونلا تایفی موریوم به ۹ الگوی ژنوتیپی (T1-T9) طبقه بندی شدند که ۳۳٪ از سویه ها متعلق به الگوی T1 (۷ سویه) بودند و به دنبال آن ۶ سویه (۲۹٪) در الگوی T2، ۲ سویه (۱۰٪) در الگوی T3 و یک سویه در الگوهای T4 تا T9جای گرفتند.

**نتیجه گیری:** نتایج این مطالعه نشان داد که سویه های اندمیک سالمونلا تایفی موریوم جداسازی شده در تهران دارای الگوهای متنوع ژنتیکی هستند و ERIC-PCR، روش مناسب تایپینگ جهت اهداف اپیدمیولوژیک سالمونلا تایفی موریوم می باشد.

**واژه های کلیدی: سالمونلا تایفی موریوم، ERIC-PCR، الگوهای ژنوتایپی.**

## مقدمه

گونه های سالمونلا (Salmonella spp) به عنوان یکی از مهم ترین آلوده کننده های مواد غذایی و گاستروانتریت در انسان به شمار می آیند (۳-۱). در جنس سالمونلا بیش از ۲۶۰۰ سروتیپ وجود دارد که بسیاری از این سروتایپ ها پاتوژن های مهمی برای انسان ها و حیوانات محسوب می شوند. در این میان، سالمونلا انتریکا سروار تایفی موریوم عامل بروز سالمونلوز غیرحصبه ای یا همان گاستروآنتریت است. از ویژگی های مهم این سروار، توانایی آن در باقی ماندن به شکل قابل تکثیر و زنده به مدت طولانی در محیط و نمونه های غذایی است (۴). انسان عمدتا" از طریق مصرف غذاهای خام همانند مرغ، تخم مرغ و گوشت به این باکتری آلوده می شود و از علایم بیماری می توان به تهوع، سردرد، استفراغ و اسهال شدید با مشاهده اندکی لوکوسیت در مدفوع اشاره کرد (۵). مهمترین اقدام درمانی در گاستروآنتریت سالمونلایی، از بین بردن دهیدراتاسیون و اختلالات الکترولیتی است و معمولا بدون نیاز به آنتی بیوتیک درمان می شود (۶). این باکتری علاوه بر انسان میزبان های زیاد دیگری دارد و به دلیل گسترش جغرافیایی و طیف وسیع میزبانی از اهمیت خاصی برخوردار است (۷). برای کنترل و نظارت اپیدمیولوژیک سروتایپ های سالمونلا، تایپینگ مولکولی سویه های سالمونلا اهمیت اساسی دارد. تعدادی از روش های تایپینگ برای سالمونلا انتریکا سروار تایفی بکار برده می شود. امروزه روش های مولکولی مانند Pulse Field Gel electrophoresis (PFGE) (۱۰-۸)، ریبوتایپینگ (۱۳-۱۰)، ERIC PCR (Intergenic Enterobacterial Repetitive Consensus Sequence PCR) (۱۴)، RAPD (۱۶ و۱۵)، AP-PCR (۱۸و۱۷)، انگشت نگاری DNA با استفاده از عنصر متحرک ژنتیکی IS200 (۱۹) و پلاسمید پروفایلینگ (۲۲-۲۰) برای تمایز سویه های میکروبی بکار

[*] مسئول مقاله:
آدرس: تهران، میدان ونک، خیابان ملاصدرا، نبش خیابان شیخ بهایی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تلفن: ۸۸۰۳۹۸۸۳-۰۲۱
e-mail: ranjbarre@gmail.com

[ DOR: 20.1001.1.15614107.1391.15.1.23.2 ]
[ DOI: 10.18869/acadpub.jbums.15.1.51 ]

می روند. روش PFGE، ریبوتایپینگ از نظر تکنیکی کامل هستند ولی وقت گیر می باشند. روش ERIC-PCR سریع تر بوده و دارای قدرت تمایزی مناسبی است و در هر آزمایشگاهی که دارای قابلیت انجام روش PCR است، قابل انجام می باشد (۲۳). توالی های ERIC در واقع توالی های 124-127bp هستند که واجد یک ناحیه معکوس تکرار شونده مرکزی حفاظت شده بوده که به شکل خارج ژنی در ژنوم باکتری های روده ای موجود بوده و پرایمرهای 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. در مطالعات مختلفی ERIC-PCR یک روش کارا و ارزشمند جهت تایپینگ مولکولی سویه های مربوط به جنس سالمونلا ارزیابی شده است (۲۶-۲۴).

از آنجاییکه در ایران در زمینه تایپینگ مولکولی سویه های سالمونلا انتریکا سروتایپ تایفی موریوم بر اساس روش ERIC-PCR مطالعه ای صورت نگرفته است، از این رو با توجه به شیوع این سروتایپ، این مطالعه به منظور بررسی تنوع ژنوتایپی سویه های جداسازی شده این سروتایپ از بیماران مراجعه کننده به سه بیمارستان شهر تهران با استفاده از روش ERIC-PCR صورت گرفت.

## مواد و روشها

این مطالعه مقطعی بر روی بیماران مراجعه کننده به بیمارستان های مرکز طبی کودکان (بعنوان یکی از بیمارستان های مرجع پذیرش کننده نمونه های شیگلوز کودکان)، شریعتی و بقیه الله (عج)، از سال ۸۸-۱۳۸۶ انجام شد. نمونه های بالینی از قبیل مدفوع و خون بیماران مشکوک به عفونت سالمونلا اخذ شد. نمونه های مدفوع بیماران بلافاصله پس از نمونه گیری به محیط کشت سلنیت F منتقل گردید. نمونه ها بلافاصله به مدت ۶ ساعت در این محیط نگهداری شدند. سپس به محیط های کشت انتخابی مانند سالمونلا- شیگلا (SS) آگار انتقال یافته و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. نمونه های خون نیز ابتدا در محیط های دی فازیک کشت داده شده و سپس به محیط های انتخابی انتقال داده شدند. در روز بعد کلنی های سیاه رنگ $H_2S$ مثبت سالمونلا بر روی محیط کشت شیب دار TSI منتقل شد. از محیط های کشت اوره، سیمون سیترات آگار و MRVP نیز جهت شناسایی و تعیین هویت ایزوله های سالمونلا استفاده گردید. پس از انجام آزمون های افتراقی، تست سروتایپینگ با استفاده از آنتی سرم O و H بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده (Staten Serum Institut, Copenhagen, Denmark) بر پایه اسلاید آگلوتیناسیون مورد شناسایی قرار گرفتند، بدین ترتیب که پس از تهیه سوسپانسیون باکتری و مجاور کردن آن با ۲۰ میکرولیتر از آنتی سرم، در صورت مثبت بودن به مدت ۱ تا ۲ دقیقه آگلوتیناسیون بر روی اسلاید مشاهده گردید (۲۷).

**استخراج DNA:** استخراج DNA به روش فنل-کلروفرم انجام گرفت، بطور خلاصه، بعد از کشت ۲۴ ساعته نمونه های خالص شده سالمونلا بر روی محیط کشت Luria broth، از سوسپانسیون باکتریایی رسوب تهیه شد و به رسوب موجود ۶۲۰ میکرولیتر بافر لیز، ۱۳ میکرولیتر ۲۰٪ SDS و ۳ میکرولیتر پروتئیناز K (۲۰mg/ml) اضافه شد و این سوسپانسیون در دمای ۶۰ درجه به مدت یک ساعت انکوبه گردید. در مرحله بعد از محلول فنل-کلروفرم-آیزوآمیل الکل با نسبت ۱-۲۴-۲۵ برای جداسازی پروتئین ها استفاده شد و در مرحله پایانی برای رسوب DNA از محلول اتانل سرد ۹۰ درصد و جهت شستشوی آن از اتانل ۷۰ درصد استفاده شد. DNA خالص شده در ۱۰۰-۵۰ میکرولیتر آب مقطر حل گردید (محصولات مورد استفاده در استخراج DNA از شرکت مرک آلمان خریداری شد). در مرحله پایانی برای تعیین غلظت و خلوص DNA، از بررسی باند توسط الکتروفورز بر روی ژل و تعیین نسبت جذب OD260/OD280 توسط اسپکتروفتومتر استفاده شد (۲۸).

**روش ERIC-PCR:** برای انجام روش ERIC-PCR، نمونه های DNA متعلق به ایزوله های جدا شده مختلف با استفاده از پرایمرهای ERIC1R 5′-ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC-3′ و ERIC2 5′-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3′ تکثیر داده شدند (۲۹). آزمایش PCR توسط ترموسایکلر اپندورف و در یک حجم ۲۰ میکرولیتری که شامل ۱۲ میکرولیتر آب دیونیزه، ۲ میکرولیتر از بافرPCR ۱۰x، یک میکرولیتر از MgCl2 ۵۰mM، یک میکرولیتر از dNTPs ۱۰mM، یک میکرولیتر از هر پرایمر دارای غلظت ۲۰pmol، یک میکرولیتر آنزیم Taq DNA polymerase و یک میکرولیتر DNA مورد نظر انجام شد. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر به صورت ۴ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد، سپس ۳۵ سیکل حرارتی شامل ۹۵ درجه سانتی گراد یک دقیقه، ۵۲ درجه سانتی گراد یک دقیقه، ۶۵ درجه سانتی گراد ۸ دقیقه و در نهایت یک سیکل پایانی در ۷۲ درجه سانتی گراد ۶ دقیقه انجام شد (۳۰) (جدول ۱). بعد از انجام واکنش، ۶ میکرولیتر از نمونه های PCR شده بر روی ژل آگارز ۱ درصد به همراه سایز مارکر ۱۰۰bp با ولتاژ ۷۰ به مدت یک ساعت الکتروفورز شدند و در نهایت از روی ژل عکسبرداری شد. در فرآیند PCR از آب به عنوان کنترل منفی استفاده شد (کلیه محصولات واکنش PCR از شرکت فرمنتاز، لیتوانی خریداری شد).

**آنالیز الگوهای ERIC-PCR:** 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 اساس محاسبه الگوها توسط پایگاه اینترنتی، نحوه قرارگیری آنها در ژل بر اساس وزن مولکولی آنها و مقایسه با مارکر مولکولی و شمارش باندها جهت هر نمونه بود. سپس دستجات الگوهای ژنتیکی بر اساس شباهت شکل گرفته و فراوانی این دستجات در میان سروتایپ های مجزا محاسبه گردید.

**جدول ۱. شرایط دمایی و زمانی واکنش PCR**

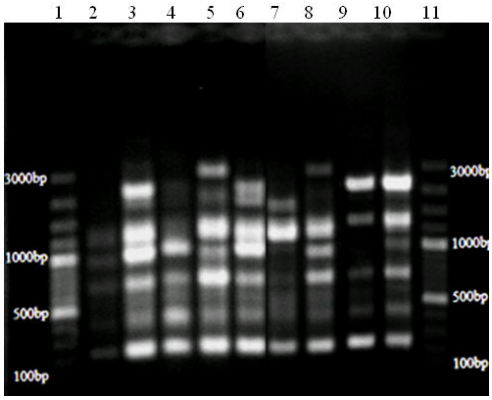
| شرایط مراحل | دما (سانتیگراد) | زمان (دقیقه) | تعداد چرخه |
|---|---|---|---|
| Initiation denaturation | ۹۴ | ۴ | ۱ |
| Denaturation | ۹۴ | ۱ | ۳۵ |
| Annealing | ۵۲ | ۱ | ۳۵ |
| Extention | ۷۲ | ۶ | ۳۵ |
| Final extention | ۶۵ | ۱۵ | ۱ |

[ DOR: 20.1001.1.15614107.1391.15.1.23.2 ]
[ DOI: 10.18869/acadpub.jbums.15.1.51 ]

## یافته ها

**شناسایی سویه ها:** در این تحقیق از مجموع ۶۵۰ نمونه مدفوع و خون بیماران اسهالی مراجعه کننده به چند بیمارستان در تهران، ۲۱ سویه مربوط به سالمونلا تایفی موریوم بود که مورد بررسی بیشتر مولکولی قرار گرفت (جدول ۲).

**نتایج ERIC-PCR:** پس از انجام کلیه مراحل ERIC-PCR بر روی سویه های سالمونلا آنتریکا سروار تایفی موریوم و تهیه عکس از الگوهای الکتروفورزی این سروتایپ، مقایسه هر کدام از الگوها بصورت تک تک با هم، نشان داد که تعداد باندهای ایجاد شده در ERIC-PCR هر سروتایپ بین ۴ تا ۱۱ باند با وزن مولکولی ۲۰۰ تا ۳۲۰۰bp بود (تصویر ۱). بطور کلی تعداد ۹ الگوی ژنتیکی مختلف از ERIC-PCR مشاهده شد. ۹ ایزوله (۳۳٪)، با داشتن الگوی مشابه در گروه اول (T1) قرار گرفتند. در گروه دوم (T2) تعداد ۶ ایزوله (۲۹٪)، در گروه سوم (T3) ۲ ایزوله (۱۰٪) و مابقی سویه ها در گروه چهارم تا نهم (T4-T9) جای گرفتند (جدول ۲).




**تصویر ۱. الگوهای مختلف حاصل از ERIC-PCR در بین سویه های سالمونلا انتریکا سروار تایفی موریوم بر روی ژل آگارز ۱٪ و رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید.**
**ستون۱ و ۱۱: مارکر سایز مولکولی 100bp، ستون های ۲ تا ۱۰ محصولات ERIC-PCR سویه های سالمونلا انتریکا سروتایپ تایفی موریوم در سویه های نماینده الگوهای مختلف.**

**جدول ۲. مشخصات ایزوله های سالمونلا انتریکا سروار تیفی موریوم جداسازی شده از بیماران بر حسب 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 | شماره سویه | محل جداسازی | نوع نمونه | الگوی ERIC-PCR |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ۲۱ | CMC | مدفوع | T1 | ۷۸ | CMC | مدفوع | T1 | ۱۲۶ | CMC | مدفوع | T1 |
| ۴۴ | SL | مدفوع | T2 | ۷۹ | CMC | مدفوع | T2 | ۱۲۷ | CMC | خون | T3 |
| ۴۵ | SL | مدفوع | T2 | ۸۰ | CMC | مدفوع | T6 | ۱۳۸ | CMC | خون | T1 |
| ۵۹ | CMC | مدفوع | T4 | ۸۵ | CMC | مدفوع | T7 | ۱۴۱ | B | مدفوع | T1 |
| ۷۰ | CMC | خون | T5 | ۹۱ | CMC | مدفوع | T2 | ۱۴۲ | CMC | مدفوع | T3 |
| ۷۳ | CMC | مدفوع | T2 | ۹۶ | CMC | مدفوع | T8 | ۱۴۶ | CMC | مدفوع | T1 |
| ۷۴ | CMC | مدفوع | T2 | ۱۱۶ | CMC | مدفوع | T9 | ۱۵۱ | CMC | مدفوع | T1 |

* SL : بیمارستان شریعتی، CMC: مرکز طبی کودکان، B: بیمارستان بقیه الله

## بحث و نتیجه گیری

نتایج نشان داد که روش ERIC-PCR می تواند تمام ایزوله های سالمونلا تایفی موریوم را تایپ بندی نماید، بطوریکه این روش سویه ها را به ۹ الگوی ژنتیکی متفاوت بر پایه ERIC-PCR تقسیم بندی نمود. در انتخاب روش یا روشهای تایپ بندی، باید علاوه بر قدرت افتراق دهی، به سادگی روش، وسعت کاربرد، سرعت انجام و سادگی تفسیر روش نیز توجه نمود. در سالهای اخیر چندین تکنیک مولکولی به عنوان روشهای انتخابی برای تایپ بندی میکروبها روشهای ساترن بلات از DNA کروموزومی مانند ریبوتایپینگ، RFLP و غیره که بر پایه برش DNA کروموزومی از طریق آنزیمهای محدودالاثر و سپس بلات نمودن قطعات حاصل از برش و رویت آنها استوار می باشند، ابزارهای مناسبی برای بررسی های اپیدمیولوژیکی بوده و تکرار پذیری بالایی دارند. آنالیز ژنوم کروموزومی از طریق روش PFGE با اینکه یکی از بهترین روشهای تایپ بندی است اما پر زحمت و گران می باشد. روشهای انگشت نگاری مبتنی بر PCR از سادگی، وسعت کاربرد و سرعت مناسبی برخوردار می باشند. ERIC-PCR با استفاده از اولیگونوکلئوتیدهای تکرار شونده به عنوان آغازگر سنتز DNA، یکی از روشهای قدرتمند تایپینگ به شمار می رود. بر خلاف روش PCR معمولی که نیازمند اطلاعات خاصی در ارتباط با سکانس DNA است و در آن از سکانس هدف ویژه ای استفاده می شود، در ERIC-PCR نیازی به این اطلاعات نیست و همین مسأله آنرا به یک روش قدرتمند با کاربرد عمومی تبدیل نموده است از اینرو در این مطالعه از این روش استفاده شد.

در مطالعه ای که در عربستان بر روی ۱۳۶ نمونه مدفوع گرفته شده از بیماران گاستروآنتریتی انجام شد، سروتایپ تایفی موریوم با فراوانی ۴۵٪ و سپس سروتایپ انتریتیدیس با فراوانی ۹/۶٪ گزارش شد (۳۱). در مطالعه Fardsanei

[ DOR: 20.1001.1.15614107.1391.15.1.23.2 ]
[ DOI: 10.18869/acadpub.jbums.15.1.51 ]

و همکاران، ۱۹۵۰ نمونه مدفوع از بیماران اسهالی مربوط به کودکان زیر ۵ سال در بیمارستان مرکز طبی کودکان مورد مطالعه قرار گرفت که ۵۴ درصد سویه ها متعلق به سالمونلا انتریتیدیس، ۴ درصد متعلق به سالمونلا پاراتایفی A، ۲۳ درصد متعلق به پاراتایفی C و ۸ درصد متعلق به پاراتایفی D بود و این سویه ها دارای ۴ الگوی متفاوتی از ERIC-PCR بودند (۳۲).

Agin و همکارانش سویه های ۸۶ نمونه مدفوع و خون را جهت شناسایی سالمونلا انتریکا سروار تایفی موریوم مورد مطالعه قرار داده و به دنبال شناسایی سویه ها، الگوهای ژنتیکی و ارتباطات کلونالیتی را در سویه ها توسط روش ERIC-PCR مورد ارزیابی قرار دادند. در مطالعه ایشان، روش ERIC-PCR توانست سویه ها را به ۷ الگوی ژنتیکی تقسیم بندی کند (۳۳). همچنین Sexana و همکارانش در هند، ۲۴ ایزوله از سروارهای سالمونلا را با روش ERIC-PCR مورد تمایز قرار دادند. در آن مطالعه ۲۱ تیپ ژنتیکی بدست آمد و نتایج نشان داد که این روش قادر است واریانت های ژنتیکی مختلفی را در سالمونلا تایفی موریوم از هم تمایز دهد (۳۴).

در مطالعه Gopa و همکارانش در هند، تعداد ۱۱۳ سویه سالمونلا، توسط روش ERIC-PCR ژنوتایپ شدند. با استفاده از این روش دو الگوی ژنتیکی و دو کلون متفاوت در میان سویه ها شناسایی شد (۳۵). با مقایسه نتایج فوق و نتایج بدست آمده از بررسی مشابه در ایران و سایر کشورهای جهان در مورد بکارگیری این روش بنظر می رسد که روش ERIC-PCR کارایی مناسبی جهت بررسی تنوع ژنتیکی در سویه های سالمونلا دارد. از آنجاییکه اپیدمی های عفونت معمولا" توسط یک کلون خاص و عفونت های تک گیر معمولا" توسط کلون های مختلف ایجاد می شوند، به همین دلیل باید همه ایزوله های مرتبط کلینیکی توسط روش های تایپینگ مناسب انگشت نگاری شوند تا سویه های مربوطه شناسایی و تعیین هویت شوند. همچنین سروتایپ های غالب در طی زمان تغییر نموده و بر این اساس در مناطق جغرافیایی مختلف سروتایپ های متفاوتی به عنوان سروتایپ های غالب وجود دارند زیرا سویه های غالب اندمیک در مناطق مختلف دنیا از کلون های متفاوتی نشات گرفته اند و وجود کلون های متفاوت امکان پیدایش سویه های جدید و چرخش آنها بین انسان، محیط و حیوانات را فراهم می آورد.

لذا لازم است که بررسی های مستمر، برنامه های نظارتی و غربالگری انجام شود و نوع سالمونلای غالب یا ژنوتایپ غالب آن جامعه مشخص گردد. تشخیص سروتایپ غالب در نمونه های بالینی افراد واجد گاستروآنتریت در یک جامعه کمک بزرگی به حفظ و کنترل شیوع بیماری می کند به ویژه در کشورهای در حال توسعه از جمله کشور ما که عفونت های سالمونلایی همچنان از اهمیت ویژه ای برخوردار است.

بطور کلی نتایج ین مطالعه نشان داد که سویه های آندمیک سالمونلا تایفی موریوم جدا شده در شهر تهران دارای الگوهای ژنتیکی متنوعی هستند و روش ERIC-PCR برای تمایز سویه های سالمونلا تایفی موریوم از کارایی مناسبی برخوردار بوده و جهت مطالعات اپیدمیولوژیک سالمونلا، کاربردی است.

## تقدیر و تشکر

بدینوسیله از همکاران محترم آزمایشگاه مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، آقای دکتر هاشمی مدنی، خانم سفیری و خانم پورعلی تشکر و قدردانی می گردد.

[ DOR: 20.1001.1.15614107.1391.15.1.23.2 ]
[ DOI: 10.18869/acadpub.jbums.15.1.51 ]

# Determining of the Variety of Genotypes in Salmonella Typhimurium by ERIC-PCR

**R. Ranjbar (PhD)[1×], A. Mirzaee (MSc)[1]**

1. Molecular Biology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

**J Babol Univ Med Sci; 15(1); Jan 2013; PP: 51-57**

**Received: Mar 2nd 2012, Revised: May 2nd 2012, Accepted: Jul 4th 2012.**

## ABSTRACT

**BACKGROUND AND OBJECTIVE:** Salmonella enterica serovar Typhimurium is one of the most prevalent Salmonella serovars worldwide. Molecular typing of Salmonella serovars is of epidemiologic importance. The current research was carried out to study the genetic diversity of Salmonella typhimurium by enterobacterial repetitive intergenic consensus polymerase chain reaction (ERIC-PCR).

**METHODS:** In a cross-sectional descriptive study that was carried out from 2007 to 2009, clinical samples including stool and blood were collected from the patients admitted to three hospitals in Tehran, Iran. All Salmonella stains were cultured and diagnosed by standard microbiological methods. Serotyping was carried out by commercially available antisera and the genetic diversity between the strains was determined by ERIC-PCR.

**FINDINGS:** Among 650 clinical samples, twenty one salmonella typhimurium were identified. ERIC-PCR differentiated Salmonella typhimurium strains into nine genetic clusters (T1-T9). Thirty three percent of the strains were clustered into T1 (7 isolates) followed by T2 (6 strains, 29%), T3 (2 strains, 10%) and T4-T9 (each one strain).

**CONCLUSION:** The results showed that endemic Salmonella typhimurium strains isolated in Tehran could be attributed to divers ERIC clusters and ERIC-PCR has been evaluated as a good approach for molecular typing of Salmonella typhimurium strains.

**KEY WORDS:** *Salmonella typhimurium, ERIC-PCR, Genotype patterns.*

**×Corresponding Author;**
**Address:** Molecular Biology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Vanak Sq, Sheikh Bahaee St, Tehran, Iran
**Tel:** +98 21 88039883
**E-mail:** ranjbarre@gmail.com

[ DOR: 20.1001.1.15614107.1391.15.1.23.2 ]
[ DOI: 10.18869/acadpub.jbums.15.1.51 ]

## References

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

2.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.

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

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. Brooks GF, Butel JS, Morse SA. Jawetz, Melnick and Adelberg's medical microbiology. 23rd ed. New York: McGraw-Hill; 2004; pp: 248-61.

6.Monack DM. Salmonella persistence and transmission strategies. Curr Opin Microbiol 2012;15(1):100-7.

7.Switt AI, Soyer Y, Warnick LD, Wiedmann M. Emergence, distribution, and molecular and phenotypic characteristics of Salmonella enterica serotype 4,5,12:i:-. Foodborne Pathog Dis 2009;6(4):407-15.

8.Us E, Erdem B, Tekeli A, et al. Investigation of Salmonella serotype enteritidis isolates by plasmid profile analysis and pulsed field gel electrophoresis. Mikrobiyol Bul 2011;45(2):210-27.

9.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;7:62.

10.Ranjbar R, Giammanco GM, Aleo A, et al. Characterization of the first extended-spectrum b-lactamase–producing nontyphoidal Salmonella strains isolated in Tehran, Iran. Foodborne Pathog Dis 2010;7(1):91-5.

11.Bailey JS, Fedorka-Cray PJ, Stern NJ, Craven SE, Cox NA, Cosby DE. Serotyping and ribotyping of Salmonella using restriction enzyme PvuII. J Food Prot 2002;65(6):1005-7.

12.Ranjbar R, Mammina C, Pourshafie MR, Soltan-Dallal MM. Characterization of endemic Shigella boydii strains isolated in Iran by serotyping, antimicrobial resistance, plasmid profile, ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis. BMC Res Notes 2008;1:74.

13.Ranjbar R, Soltan Dallal 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(4):426-30.

14.Li Y, Fang YH, Zhu H, Sun P, Wei J, Yin ZJ. The analysis of ERIC-PCR genomic polymorphism of salmonella isolated strains in pig carcass. J Anim Vet Adv 2011;10(13):1694-8.

15.Sadeghifard N, Ranjbar R, Zaeimi J. Antimicrobial susceptibility, plasmid profiles, and RAPD-PCR typing of Acinetobacter bacteria. Asian Biomedicine 2010;4 (6):901-11.

16.Pourshafie MR, Bakhshi B, Ranjbar R, et al. Dissemination of a single Vibrio cholerae clone in cholera outbreaks during 2005 in Iran. J Med Microbiol; 2007;56(Pt 12):1615-19.

17.Ranjbar R, Sadeghifard N, Ahmadi A, et al. Antimicrobial susceptibility and AP-PCR typing of Iranian isolates of Acinetobacter Spp. Strains. Iran J Public Health 2007;36(4):50-6.

18.Ranjbar R, Sadeghifard N, Soltan dallal MM, Farshad S. Evaluation of a PCR based approach to study the relatedness among Shigella. sonnei strains. Iran J Clin Infect Dis 2009;4(3):163-6.

19.Wattiau P, Boland C, Bertrand S. Methodologies for Salmonella enterica subsp. enterica subtyping: gold standards and alternatives. Appl Environ Microbiol 2011;77(22):7877-85.

[ DOR: 20.1001.1.15614107.1391.15.1.23.2 ]
[ DOI: 10.18869/acadpub.jbums.15.1.51 ]

20.Benacer D, Thong KL, Watanabe H, Puthucheary SD. Characterization of drug resistant Salmonella enterica serotype Typhimurium by antibiograms, plasmids, integrons, resistance genes and PFGE. J Microbiol Biotechnol 2010;20(6):1042-52.

21.Ranjbar R, Owlia P, Saderi H, et al. Isolation of clinical strains of Pseudomonas aeruginosa harboring different plasmids. Pak J Biol Sci 2007;10(17):3020-2.

22.Ranjbar R, Owlia P, Saderi H, et al. Characterization of Pseudomonas aeruginosa strains isolated from burned patients hospitalized in a major burn center in Tehran, Iran. Acta Med Iran 2011;49(10):675-9.

23.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.

24.Weigel RM, Qiao B, Teferedegne B, 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.

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

26.Chmielewski, R, Wielicko 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):163-9.

27.Ranjbar R, Sarshar M, Morovvati S. A Study of ribotype patterns of salmonella enterica serovar enteritidis strains isolated in Tehran, Iran. J Isfahan Med Sch 2001;30 (180):1-10. [in Persian]

28.Karami A, Ranjbar R, Ahmadi Z, Safiri Z. Rapid detection of different serovares of Salmonella entrica by multiplex PCR. Iranian J Publ Health 2007;36(2):38-42.

29.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.

30.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.

31.Ramadan F, Unni AG, Hablos R, Rizk MS. Salmonella indused enteritis. Clinical, serotype and treatment. J Egypt Public Health Assoc 1992;67(3-4):357-67.

32.Fardsanei F, Seifi M, Eshraghi SS, et al. Genotyping of Salmonella enteritidis 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. http:/www.iiccom.org/journal/PDF/51/2.PDF [in Persian]

33.Agin H, Ayhan FY, Gulay Z, 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.

34.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(3):313-4.

35.Gopa N, Pushpa P, Anil KG. ERIC PCR and RAPD based fingerprinting of Salmonella typhi strains isolated over a period of two decades. Infect Genet Evol 2010;10:530-6.

[ DOR: 20.1001.1.15614107.1391.15.1.23.2 ]
[ DOI: 10.18869/acadpub.jbums.15.1.51 ]