

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 سرووار 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 سروتاپینگ 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 سروتاپینگ، 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 T9 جای 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

الکترولیتی است و معمولاً 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 سروتاپ های سالمونلا، تایپینگ مولکولی سویه های سالمونلا اهمیت اساسی دارد. تعدادی از روش های تایپینگ برای سالمونلا انتریکا سرووار تایفی بکار برده می شود. امروزه روش های مولکولی مانند Pulse Field Gel electrophoresis (PFGE) (۸-۱۰)، ریبوتاپینگ (۱۱-۱۳)، Intergenic Enterobacterial Repetitive (ERIC) PCR (Consensus Sequence PCR) (۱۴)، RAPD (۱۶ و ۱۵)، IS200 (۱۷ و ۱۸)، انگشت نگاری DNA با استفاده از عنصر متحرک ژنتیکی (۱۹) و پلاسمید پروفایلینگ (۲۰-۲۲) برای تمایز سویه های میکروبی بکار

گونه های سالمونلا (*Salmonella* spp) به عنوان یکی از مهم ترین آلوده کننده های مواد غذایی و گاستروانتریت در انسان به شمار می آیند (۱-۳). در جنس سالمونلا بیش از ۲۶۰۰ سروتیپ وجود دارد که بسیاری از این سروتاپ ها پاتوژن های مهمی برای انسان ها و حیوانات محسوب می شوند. در این میان، سالمونلا انتریکا سرووار تایفی موریوم عامل بروز سالمونلوز غیرحصبه ای یا همان گاستروانتریت است. از ویژگی های مهم این سرووار، توانایی آن در باقی ماندن به شکل قابل تکثیر و زنده به مدت طولانی در محیط و نمونه های غذایی است (۴). انسان عمدتاً 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 گاستروانتریت سالمونلایی، از بین بردن دهیدراتاسیون و اختلالات

* مسئول مقاله:

آدرس: تهران، میدان ونک، خیابان ملاصدرا، نبش خیابان شیخ بهایی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تلفن: ۰۲۱-۸۸۰۳۹۸۸۳

e-mail: ranjbarre@gmail.com

درجه به مدت یک ساعت انکوبه گردید. در مرحله بعد از محلول فنل-کلروفرم-آیزوامیل 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 ۵۰-۱۰۰ 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'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-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 بافر PCR ۱۰x، یک میکرولیتر از ۵۰mM MgCl₂، یک میکرولیتر از ۱۰mM dNTPs، 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	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

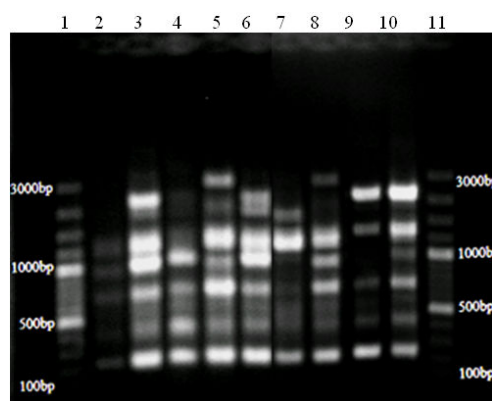
می روند. روش PFGE، ریبوتایپینگ از نظر تکنیکی کامل هستند ولی وقت گیر می باشند. روش ERIC-PCR سریع تر بوده و دارای قدرت تمایزی مناسبی است و در هر آزمایشگاهی که دارای قابلیت انجام روش PCR است، قابل انجام می باشد (۲۳). توالی های ERIC در واقع توالی های ۱۲۷-۱۲۴bp هستند که واجد یک ناحیه معکوس تکرار شونده مرکزی 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 فازیگ کشت داده شده و سپس به محیط های انتخابی انتقال داده شدند. در روز بعد کلنی های سیاه رنگ H₂S 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



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

جدول ۲. مشخصات ایزوله های سالمونلا انتریکا سرووار تیفی موریوم جداسازی شده از بیماران بر حسب شماره سویه، محل جداسازی، نوع نمونه، الگوی ERIC-PCR.

شماره	محل* جداسازی	نوع نمونه	الگوی ERIC-PCR	شماره	محل جداسازی	نوع نمونه	الگوی ERIC-PCR	شماره	محل* جداسازی	نوع نمونه	الگوی ERIC-PCR
۲۱	CMC	مدفوع	T1	۷۸	CMC	مدفوع	T1	۲۶	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 سترن بلات از DNA کروموزومی مانند ریبوتا پینگ، RFLP و غیره که بر پایه برش DNA کروموزومی از طریق آنزیمهای محدودالتر 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 اولیگونوکلوئیدهای 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 گاستروانتریتی انجام شد، سروتا پ تایفی موریوم با فراوانی ۴۵٪ و سپس سروتا پ انتریتیدیس با فراوانی ۹/۶٪ گزارش شد (۳۱). در مطالعه Fardsanei

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 نشأت 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.

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 سرووار 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 معمولاً توسط یک کلون خاص و عفونت های تک گیر معمولاً توسط کلون های مختلف ایجاد می شوند، به همین دلیل باید همه ایزوله های مرتبط کلینیکی

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

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.

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, Sadari 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, Sadari 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* induced 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.