

Genotyping of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, isolated from human and animal by REP-PCR

Abbas Ali-Shiroodi¹, Mahmood Jamshidian¹, Taghi Zahraei Salehi*¹,
Gholam Reza Nikbakht Boroujeni², Kumarss Amin³

1. Department of Microbiology, Faculty of Specialized Veterinary Science, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran

2. Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

3. Department of Microbiology, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh,

(Received:2015/11/20 Accept:2016/07/2)

Abstract

Background: Salmonellosis is a zoonotic disease of human and animals. One of the most important serovars in human, livestock and poultry is *Salmonella enteritidis*, which is a worldwide common foodborne pathogen. Conventional culture, biochemical and serological methods has been shown to have limited value as molecular analysis tool with low discriminatory power but molecular typing methods such as REP-PCR produced DNA profiles for differentiation and characterization of *Salmonella* strains. The aim of this study was differentiation of isolates of *Salmonella enteritidis* by molecular fingerprinting method based on repeated sequences (rep-PCR).

Materials and Methods: In a cross-sectional study, 64 isolates of *Salmonella Enteritidis* from various sources (cows, poultry and humans) were studied by rep-PCR method and REP1R and REP2I primers. The molecular patterns were determined on the basis of the existence or absence of DNA fragments were separated according to their size by agarose gel electrophoresis. By using a computer program NTSYS, dendrogram were drawn.

Results: The number of 5-14 bands with the approximate size ranging from 100 to 3,000 base pairs with a common fragment (400 bp) were observed. The number of molecular profiles obtained by REP1R and REP2I primers for 64 isolates of *Salmonella Enteritidis* was 38 profiles. The similarities between avian and human isolates based on cluster analysis were more than bovine isolates and about 72% to 81%. However, a bovine strain known as B13 was found with 82% similarity to human strains.

Conclusion: In this study, rep-PCR demonstrated a high discriminatory power in analyzing *Salmonella Enteritidis* isolates. High heterogeneity (92.8%) was measured in a population of 64 different isolates of *Salmonella enteritidis* by Shannon-Wiener index. Meanwhile, according to the results, *Salmonella enteritidis* strains isolated from poultry and human have more similarities together (almost 72-81%) than bovine strains (48% similarity). Therefore, it suggests that epidemiologically risk of human infections caused by *Salmonella enteritidis* strains, which originates from poultry and its products is higher.

Keywords: *Salmonella enteritidis*, Genotyping, REP-PCR.

* Corresponding author: Taghi Zahraei Salehi
E-mail: tsalehi@ut.ac.ir

ژنوتایپینگ سویه‌های سالمونلا انتریکا سرووار انترتیپدیس جدا شده از انسان و حیوانات با روش REP-PCR

دکتر عباس علی شیروودی^۱، دکتر محمود جمشیدیان^۱، دکتر تقی زهرائی صالحی^{۱*}،

دکتر غلامرضا نیکبخت بروجنی^۲، دکتر کیومرث امینی^۳

۱- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران
 ۲- گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران
 ۳- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ساوه، ساوه، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۸/۲۹ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۵/۴/۱۲

چکیده:

مقدمه: سالمونلوز بیماری مشترک در انسان و حیوانات است. یکی از سرووارهای مهم از لحاظ بیماری‌زایی در انسان، دام و طیور، سالمونلا انترتیپدیس است که عامل رایج بیماری‌های منتقله از طریق غذا نیز هستند. روش‌های مرسوم کشت، بیوشیمیایی و سرولوژیکی نشان داده است که ارزش محدودی از لحاظ آنالیز مولکولی و قدرت تفریق کمی دارند، ولی روش‌های تایپینگ مولکولی نظیر REP-PCR الگوهای DNA برای تمایز و شناسایی سویه‌های سالمونلا ایجاد می‌کنند. هدف از این مطالعه تفریق و تمایز و تعیین قرابت بین جدایه‌های مختلف سرووار سالمونلا انترتیپدیس به وسیله روش انگشت‌نگاری مولکولی مبتنی بر توالی‌های تکرارشونده (rep-PCR) بود.

روش بررسی: طی یک مطالعه مقطعی تعداد ۶۴ جدایه سالمونلا انترتیپدیس از منابع مختلف (گاو، طیور و انسان) به وسیله روش انگشت‌نگاری مولکولی rep-PCR با پرایمرهای REP1R و REP2I بررسی شد و الگوی مولکولی قطعات DNA براساس وجود یا غیاب باندها و اندازه آن‌ها در ژل الکتروفورزس مشخص شد. با استفاده از برنامه کامپیوتری NTSYS نمودار درختی یا دندروگرام ترسیم شد.

یافته‌ها: تعداد ۵ تا ۱۴ باند با اندازه تقریبی ۱۰۰ تا ۳۰۰۰ جفت باز (bp) با یک باند مشترک (400 bp) مشاهده شد. تعداد پروفایل مولکولی حاصل توسط پرایمرهای REP1R و REP2I در ۶۴ جدایه سالمونلا انترتیپدیس در این تحقیق برابر با ۳۸ پروفایل مولکولی بود که به سه خوشه (کلاستر) اصلی و پنج تحت خوشه (R1، R2a، R3، R4) با ۴۸ تا ۸۱ درصد تشابه تقسیم شدند. شباهت بین جدایه‌های طیور و انسانی براساس دندروگرام بیشتر و حدود ۷۲ تا ۸۱ درصد بوده است. البته یک سویه گاوی به نام B13 دارای ۸۲ درصد تشابه با سویه‌های انسانی مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه rep-PCR قدرت تفریق بالایی در آنالیز سویه‌های سالمونلا انترتیپدیس نشان داده است. با استفاده از ضریب شانون-وینر (index Shannon Wiener) هتروژنیسیته بالا (۰/۹۲۸) در جمعیت شامل ۶۴ جدایه مختلف سالمونلا انترتیپدیس مشاهده شد. همچنین با توجه به نتایج کار مولکولی در این تحقیق سویه‌های سالمونلا انترتیپدیس جدا شده از طیور با سویه‌های جدا شده از انسان دارای تشابه بیشتر (به طور تقریبی ۷۲ تا ۸۱ درصد) نسبت به سویه‌های گاوی (تشابه ۴۸ درصد) هستند که بیانگر این موضوع است که از لحاظ اپیدمیولوژیکی احتمال خطر ابتلای موارد انسانی به سویه‌های سالمونلا انترتیپدیس با منشاء طیور بیشتر است.

واژگان کلیدی: سالمونلا انترتیپدیس، ژنوتایپینگ، REP-PCR

مقدمه:

به طیفی از آنتی بیوتیک‌ها به دلیل استفاده از آن‌ها در خوراک دام و طیور نیز ظهور یافته‌اند که به‌عنوان یک مشکل سلامت عامه مطرح هستند (۲، ۳). طبق گزارش سازمان بهداشت جهانی در سال ۲۰۱۳، بیماری‌های ناشی از مصرف آب و غذای آلوده سالانه جان ۲/۲ میلیون انسان را می‌گیرد که بیشتر آن‌ها کودکان

سالمونلوز غیرتیفوئیدی (NTS) به‌عنوان عفونت زونوتیک (مشترک) تاثیر زیان‌آوری بر سلامت عامه و تحمیل هزینه‌های درمانی و تحمیل خسارت اقتصادی بر صنایع دامپرووری و طیور دارد (۱). به‌ویژه آنکه از دهه ۱۹۹۰ سویه‌های مقاوم

نویسنده مسئول: دکتر تقی زهرایی صالحی

پست الکترونیکی: tsahehi@ut.ac.ir

هويت شده بودند. در آغاز بذره‌های منجمد از مخزن فریزر خارج و در دمای اتاق آزمایشگاه قرارداد شده. بعد از خروج از حالت انجماد، کشت‌های باکتریایی اولیه ابتدا به لوله آزمایش حاوی دو میلی‌لیتر محیط کشت مایع آنگوست قلب و مغز یا (BHI (Brain Heart Infusion broth #110493, Merck, Germany) و انتقال و تلقیح شدند و به مدت ۴۸-۲۴ ساعت، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در درون انکوباتور قرارداد شده و سپس بعد از ۴۸ ساعت، از نظر کدورت (رشد باکتری) بررسی شدند. سپس دوباره در پلیت حاوی محیط کشت جامد، آگار لوریا-برتانی یا (LB (Luria Bertani agar # 110283, Merck, Germany) کشت داده شدند و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸-۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند.

DNA نمونه‌ها طبق دستورالعمل کیت فرمنتاس (Fermentas genomic DNA purification Kit #K0512, Thermo Fisher Scientific, USA) استخراج شدند. استوک‌های DNA در فریزر در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. کمیت و کیفیت و خلوص DNA استخراج شده با استفاده از دو روش اسپکتروفتومتری (طول موج ۲۶۰ نانومتر و ۲۸۰ نانومتر) و الکتروفورز DNA روی ژل آگارز ۱/۵ درصد بررسی شد. غلظت مطلوب DNA مقدار ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر است و اگر نمونه فاقد آن باشد یا غلظت آن کمتر از حد مطلوب باشد، دانسیته اپتیک صفر یا پایین بوده و باند قابل رویت در ژل الکتروفورز، به دلیل عدم جذب پرتو فرابنفش (UV) تشکیل نمی‌شود.

شرایط انجام واکنش پلیمرز زنجیره‌ای (PCR Amplification)

برای انجام واکنش REP-PCR از پرایمر REP1R با توالی 3-5-IIIGCGCCGICATCAGGC و پرایمر REP2I با توالی 3-ACGTCTTATCAGGCCTAC-5 استفاده شد (۱۰). انجام واکنش REP-PCR با استفاده از میکروتیوب حاوی پرمیکس (حاوی مستر میکس لیوفیلیزه) (AccuPower PCR PreMix, Bioneer Corporation, Korea) در حجم ۲۵ میکرولیتر و با افزودن آب دیونیزه و نمونه DNA استخراج شده و پرایمرها در دستگاه ترموسیکلر BIORAD انجام شد. برای انجام واکنش REP-PCR یک سیکل در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه، ۳۰ سیکل در ۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، در ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، در ۵۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه سپس یک سیکل در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت هشت دقیقه به دستگاه ترموسیکلر برنامه داده شد (۱۰). الکتروفورز محصولات PCR در دستگاه الکتروفورز افقی در ژل آگارز ۱/۵ درصد در شرایط بافری (بافر 1x TBE) در ولتاژ ۱۲۰ میلی‌ولت به مدت ۴۵ دقیقه تا یک ساعت انجام شد (۱۰ و ۱۱). سپس ژل با ۰/۵ میکروگرم/ میلی‌لیتر اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شد و در پرتو ماورای بنفش در دستگاه ژل داکت بیورد (Gel Doc; Bio-Rad) مشاهده و از آن عکسبرداری شد. از سالمونلا تیفی موریوم استاندارد ATCC ۱۴۰۲۸ اخذ شده از دانشکده دامپزشکی تهران به‌عنوان شاهد مثبت استفاده شد و در دندروگرام به نام M33 است.

باند‌ها و الگوهای حاصله از انگشت‌نگاری مولکولی واکنش‌های REP-PCR ابتدا با چشم و به صورت بصری تحلیل شدند و با تهیه جدول (برنامه Notepad) وجود باند با یک سایز مشخص (از ۵۰ تا ۳ هزار) جفت باز با عدد یک و نبود باند با عدد صفر مشخص شد. این اعداد سپس در جدول‌های برنامه Notepad قرار گرفتند و با برنامه نرم‌افزاری NTSYS ورژن ۲، دندروگرام تهیه شد. در مطالعه حاضر قطعه‌های متعدد DNA به دست آمده در واکنش Rep-PCR متشکل از باندهای قابل رویت، پایدار و دارای قابلیت تولید دوباره بودند و تجزیه و تحلیل شدند. الگوها یا پروفایل مولکولی براساس تفاوت در تعداد و اندازه باندهای حاصل در ژل الکتروفورز تعیین شدند.

یافته‌ها:

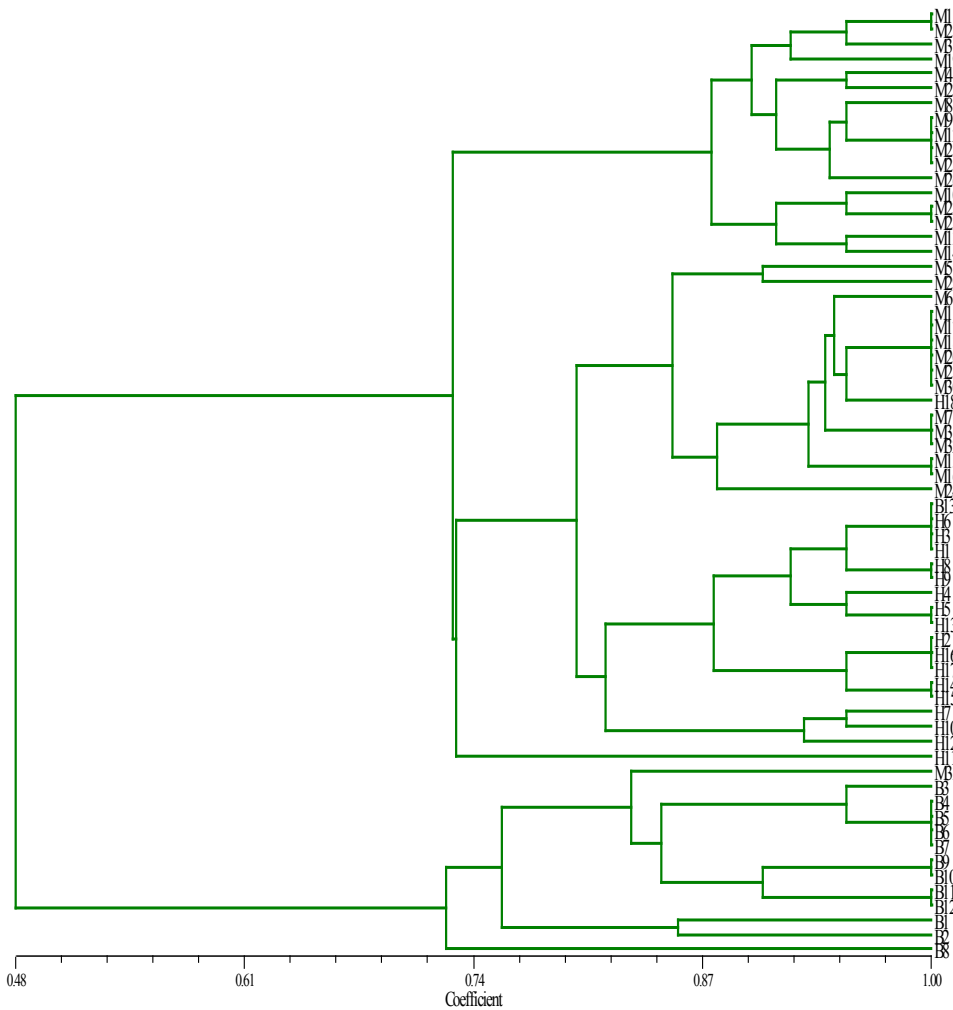
در واکنش REP-PCR در سالمونلا انتریتیدیس، در نمونه‌های گاوی (۱۳ جدایه)، انسانی (۱۹ جدایه) و طیور (۳۲ جدایه) تعداد ۱۴ تا ۱۴۵ باند با اندازه تقریبی ۱۰۰ تا

هستند و شایع‌ترین علامت آن اسهال حاد است (۴). به طور جهانی تخمین زده می‌شود که سالمونلوز غیرتیفوئیدی سالانه سبب ۱/۳ بلیون مورد عفونت می‌شود که بیشتر آنها به شکل ملایم دچار شده و خودبخود بهبود می‌یابند. حدود ۹۳ میلیون عفونت روده‌ای و ۱۵۵ هزار مورد مرگ در اثر گاستروانتریت شدید و اسهال در انسان در هر سال در پنج قاره دنیا در اثر بیش از ۲۶۰۰ سرووار سالمونلا غیرتیفوئیدی (NTS) رخ می‌دهد. در مقابل تعداد مبتلایان به حصبه (تیفوئید) ۱۶ میلیون نفر است (۵). این تخمین شامل شکل تهاجمی و سیستمیک سالمونلوز غیرتیفوئیدی (invasive NTS) نمی‌شود. سالمونلوز غیرتیفوئید تهاجمی که عامل مهم عفونت گردش خون در سراسر جهان است و به‌ویژه افراد دچار ضعف سیستم ایمنی مانند اشخاص دچار عفونت با ویروس HIV، مالاریا و کودکان دچار سوء‌تغذیه و انگل‌های خونی در افزایش خطر ابتلا به بیماری هستند. تخمین زده می‌شود سالانه ۳/۴ میلیون نفر در دنیا دچار شکل تهاجمی (iNTS) سالمونلوز می‌شوند که بیشترین موارد در قاره آفریقا در بین جمعیت نوزادان، کودکان خردسال و نوجوانان دچار مالاریا و سوء‌تغذیه دیده می‌شود و نسبت و مرگ میر شکل تهاجمی سالمونلوز غیرتیفوئید سالانه ۲۰ درصد یعنی ۶۸/۳۱۶ نفر در هر سال است. بیشترین و متداول‌ترین سرووارهای عامل شکل تهاجمی (iNTS) مانند شکل روده‌ای سالمونلا انتریتیدیس و سالمونلا تیفی موریوم هستند (۶). از این رو شناخت منبع عفونت و اپیدمیولوژی بیماری و شناسایی و تعیین میزان قرابت ژنتیکی بین جدایه‌های مختلف یک سرووار دارای اهمیت ویژه است. توالی REP (Repetitive Extragenic Palindrome) نخستین توالی تکرار شونده پالیندرومی است که توصیف شد و مورد مطالعه قرار گرفت. این توالی‌ها به‌شدت محافظت شده هستند و با اندازه آن ۳۰ تا ۴۰ جفت باز است (معمولاً ۳۸ جفت باز) و نخستین بار در اشریشیا کولی و سالمونلا تیفی موریوم و لیستریا منوسیتوژنز شناسایی شد. این توالی‌ها خارج یا بیرون ژنی هستند و در نواحی غیرکد دهنده و در بسیاری از اپرانها در ناحیه دیستال پروموتور قرار دارند و کپی‌های متعدد آن ممکن است تا یک درصد ژنوم E. coli و سالمونلا تیفی موریوم را شامل شود (۱۱). سروتایپینگ و روش‌های فنوتیپی مرسوم زمان‌بر بوده و قادر به بررسی ژنتیکی و آنالیز مولکولی DNA ژنوم باکتری نیستند. بنابراین دارای ارزش محدودی از لحاظ بررسی تفاوت‌های ژنتیکی و تحقیق‌های اپیدمیولوژی هستند (۱۲). این تکنیک (rep-PCR) از لحاظ انجام ساده بوده و دارای قدرت تفریق و قابلیت تفکیک و تمایز سویه‌های بسیار نزدیک باکتری‌هاست. همچنین تکرارپذیری خوب و مناسبی داشته و با موفقیت در طبقه‌بندی و تمایز بسیاری از سویه‌های باکتری‌های مختلف گرم منفی و گرم مثبت و قارچ‌ها به کار برده شده است (۷، ۸). هدف از این مطالعه بررسی کاربرد روش REP-PCR (Repetitive sequence-based PCR) در شناسایی و تفریق و تمایز و تعیین مقدار قرابت و شباهت بین جدایه‌های مختلف سرووار سالمونلا انتریتیدیس بوسیله این روش انگشت‌نگاری مولکولی مبتنی بر توالی‌های تکرار شونده کوتاه پراکنده در سراسر ژنوم و تکثیر آنها با واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و مقایسه الگوهای حاصل در ژل الکتروفورز بود. تمامی آزمایش‌های مربوط به این تحقیق در آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران از سال ۱۳۹۲ تا ۱۳۹۳ انجام شد.

مواد و روش‌ها:

مطالعه اخیر از نوع مقطعی است که از سال ۱۳۹۲ تا ۱۳۹۳ در دانشگاه علوم و تحقیقات تهران انجام شده است. به طور کلی بذر همه جدایه‌های سالمونلا انتریتیدیس مورد مطالعه در این تحقیق از مطالعات قبلی و پیشین اخذ شده‌اند (۹). جدایه‌ها شامل ۶۴ جدایه سالمونلا انتریتیدیس که از مناطق جغرافیایی مختلف ایران شامل کشتارگاه‌های استان کرمان، گله‌های مختلف مرغ گوشتی، بیماران ارجاعی به بیمارستان طبی کودکان امام خمینی تهران و گاوداری‌های سطح تهران اخذ و جمع‌آوری شدند و با روش استاندارد کشت جداسازی شده بودند و از لحاظ تست‌های بیوشیمیایی، سرولوژی و توسط آنتی‌سرم پلی‌والان تازکی (H) و آنتی‌سرم پلی‌والان سوماتیک (O) تعیین

شدند (۲۰). در مطالعه Rasschaert و همکاران (۲۰۰۵) از پنج نوع پرایمر در روش مولکولی rep-PC شامل ERIC1R-ERIC2 و BOXA1R و REP1R-REP2I و GTG5 استفاده شد و بیش از ۸۰ سروروار و پنج جدایه که قابل شناسایی توسط سرولوژی نبودند، انگشت‌نگاری مولکولی شدند و ضریب تشابه ساده بین پنج سروروار با پرایمر ERIC و GTG5 به ترتیب ۷۴ درصد و ۸۳ درصد بوده است. بر این اساس قدرت تفریق برای پرایمرهای ERIC و GTG5 به ترتیب ۹۵ درصد و ۹۴ درصد است (۱۲). Weigel همکاران (۱۹۹۹) با کار روی ۶۸ جدایه سالمونلا از ۱۰ واحد پرورش خوک در ایلینویز، بر قدرت تفریق بزرگ‌تر و تغییرهای بیشتر در پروفایل‌های قطعه‌های حاصل از rep-PCR در مقایسه با PFGE تاکید کردند (۲۱). کاستی‌های موجود در تفکیک‌پذیری سیستم ژل الکتروفورز معمولی توان rep-PCR را به ویژه برای تمییز بین سویه‌های با قرابت ژنتیکی بسیار نزدیک، محدود می‌کند (۲۲). Rajabi و همکاران (۲۰۱۱) با به



شکل ۲. دندروگرام میزان شباهت و قرابت سویه‌های سالمونلا اتریتیدیس جداسازی شده از منابع انسانی (H)، گاو (B) و طیور (M) را نشان می‌دهد که به وسیله روش انگشت‌نگاری مولکولی DNA با روش REP-PCR انجام شده است. M1-M32 جدایه‌های طیور، H1-H19 جدایه‌های انسانی و B1-B13 جدایه‌های گاو هستند.

REP-RCR مبتنی بر توالی‌های تکراری و انگشت‌نگاری مولکولی در مطالعه بر ۵۲ جدایه سالمونلا اتریکا سروروار سنت پل (شامل ۵ سویه از چپس سبب زمینی و ۳۹ سویه جدا شده از موارد انسانی سالمونلوز و هفت سویه دیگر از موارد انسانی، طیور و آزمایشگاه محل کار) هنگام اپیدمی سالمونلوز ناشی از مصرف غذا پرداختند. آن‌ها نتیجه گرفتند هرچند که روش‌های فنوتیپی برای تعیین خصوصیات جرم بیماری‌زا هنوز مفید است، اما آنالیز مولکولی ژنوم از لحاظ اپیدمیولوژیکی حائز اهمیت است و روش REP-PCR ساده، سریع، ارزان، حساس و دارای قابلیت تفریق‌پذیری بالا بین سویه‌های یک سروروار است (۱۸). در سال ۲۰۰۰ Benna Sar و همکاران سه روش مولکولی شامل REP، ERIC و RNA ریبوزومی 16S و 23S را انتخاب کردند و به ۱۵ تا ۱۹ باند دست یافتند. آن‌ها دریافتند که الگوهای حاصل از روش ERIC نسبت به روش REP از قدرت تفکیک‌پذیری بالاتری برخوردار نبودند (۱۹). در مطالعه Tien و همکاران (۲۰۱۱) که روی ۵۵ جدایه سالمونلا پاراتیفی A انجام شد، ضمن بررسی اندیکس تفریق دریافتند روش پالس فیلد ژل الکتروفورز (PFGE) برای تفریق جدایه‌ها کافی نیست و جدایه‌ها به ۱۴ تیپ با اندیکس تفریق ۰/۷۴۱ تقسیم شدند، اما با روش MLVA (Multiple Locus Variable-number Tandem Repeat Analysis) به ۲۳ تیپ با اندیکس تفریق ۰/۹۳۷ تقسیم

کارگیری روشی خاص (semi-automated rep-PCR) سیستم نیمه اتوماتیک و برنامه Diversilab Bio Merieux) اذعان کردند این روش دارای قدرت مساوی با روش PFGE است و به دلیل کنترل داخلی اندازه قطعه‌ها و استفاده از معرف‌های استاندارد شده و سیستم الکتروفورز مویرگی و قابلیت تکرارپذیری بالا از سایر روش‌های rep-PCR مرسوم بهتر است (۲۳). Wise و همکاران (۲۰۰۷) دریافتند که این سیستم نیمه اتوماتیک برای پیشگویی سروروار نیز مفید است (۲۴) و Kilic و همکاران (۲۰۱۰) آن را جایگزینی مناسب برای PFGE معرفی کردند (۲۵). Chmielewski و همکاران (۲۰۰۲) اذعان کردند روش rep-PCR با پرایمرهای REP و ERIC دارای قدرت افتراق بالا میان جدایه‌ها در لهستان است، ولی قابلیت تکرارپذیری، تعداد و موقعیت باندها وابسته به نوع دستگاه ترموسیکلر است (۱۷). در مطالعه Mohapatra و همکاران (۲۰۰۷) روی ۲۳۲ جدایه مدفوعی اشریشیا کولی و مربوط به نمونه‌های انسان و پرندگان اهلی و وحشی با پرایمرهای REP، BOX، GTG5 و ERIC براساس پروفایل‌های آشکار شده به ترتیب ۳۴، ۲۸، ۲۲ و ۱۵ و ۱۱ کلاستر مشاهده شد. اندیکس افتراق سیمپسون به ترتیب به مقدار ۰/۹۸۱۸ در GTG5-PCR، ۰/۹۳۳۲ در BOX-PCR، ۰/۸۸۲۵ در REP-PCR و ۰/۸۲۵۹ در ERIC-PCR بوده است. به طور عمومی کلاسترها دارای ۶۵ درصد تشابه در این پنج روش rep-PCR بوده‌اند (۲۶). هرچند سایر روش‌های انگشت‌نگاری مولکولی DNA برای شناسایی و گروه‌بندی باکتری‌ها مفید هستند (نظیر PFGE)، اما روش rep-PCR تکنیکی سریع و ساده است و دارای قدرت تفریق کافی و مناسب برای شناسایی و تعیین هویت در سطح زیرگونه و سویه است (۱۱). ولی در مقایسه روش هیبریدیژاسیون DNA:DNA و تعیین توالی ژن RNA ریبوزومی

باکتریایی نیز افزایش می‌یابد. بنابراین با توجه به این موارد و قدرت تفریق مناسب و بالا، و نتایج به‌دست آمده در این تحقیق روش rep-PCR که با مجموعه‌ای از پرایمرها REP 1 و REP 2 انجام شد، انتخابی مناسب و معقولانه کاربردی برای بررسی آنالیز مولکولی و اپیدمیولوژی جدایه‌های سالمونلا و سایر باکتری‌ها است. با این وجود پیشنهاد می‌شود از سیستم خودکار (Automated Repetitive-Sequence-Based PCR) که در مقایسه با روش دستی (Manual rep-PCR) به دلیل مجهز بودن به برنامه نرم‌افزاری DiversiLab که به طور اتوماتیک به تهیه نتایج شامل دندروگرام، الکتروفورگرام، تصویر مجازی ژل و الگوهای پراکندگی می‌پردازد (Healy و همکاران ۲۰۰۳) استفاده گردد (۲۹) و همچنین از سایر روش‌های مختلف ژنوتایپینگ مولکولی تا تفکیک و تمایز بیشتر بین جدایه‌ها ایجاد شود.

تشکر و قدردانی:

این مقاله حاصل پایان نامه دانشجویی دکتر عباس علی شیرودی در دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات تهران است. از جناب آقای دکتر علی مسعودنژاد، استاد محترم و بزرگ منش و ارجمند و عضو هیات علمی دانشگاه تهران (بخش بیوانفورماتیک) به دلیل کمک شایان و ارزنده‌شان در تحلیل داده‌ها و رسم نمودارها تشکر ویژه می‌شود.

منابع:

- Malorny B, Hoorfar J, Bunge C, Helmuth R. Multicenter validation of the analytical accuracy of Salmonella PCR: towards an international standard. *J Appl Environ Microbiol* 2003;69(1):290-6.
- Blood D, Radostits O, Henderson J, Arundel J, Gay C. *Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, sheep, goats and horses*. London: Bailliere Tindall. 1983.
- Calnek B. *Diseases of poultry* 10th ed. Iowa State University Press, Ames, IA; 1997.
- World Health Organization. *Salmonella (non-typhoidal)* [database on the Internet]. 2013. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/>.
- Pui C, Wong WC, Chai LC, Tunung R, Ponniah J, Anyi U, et al. Salmonella: a foodborne pathogen. *International Food Research Journal* 2011;18(2):465-73.
- Ao TT. Global Burden of Invasive Nontyphoidal Salmonella Disease, 2010. *On the Cover* 2013;2012:941.
- Stern MJ, Ames GF-L, Smith NH, Robinson EC, Higgins CF. Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. *Cell* 1984;37(3):1015-26.
- Versalovic J, Schneider M, De Bruijn FJ, Lupski JR. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in molecular and cellular biology* 1994;5(1):25-40.
- 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):2202-10.
- 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;9(3):322-7.
- Versalovic J, Lupski JR. Interspersed repetitive sequences in bacterial genomes. *Bacterial Genomes*: Springer; 1998. p. 38-48.
- Rasschaert G, Houf K, Imberechts H, Grijspeerd K, De Zutter L,

(ریبوتایپینگ) روش‌های مفیدتر و دقیق‌تری برای تشخیص باکتری‌ها در سطح جنس و گونه هستند. سایر مطالعه‌ها نشان می‌دهد روش rep و PFGE قدرت تفریقی به طور تقریبی برابر دارند، ولی روش rep-PCR قابل انجام با وسایل استاندارد با زحمت کمتر، مدت زمان کمتر، هزینه کمتر و توان عملیاتی بیشتر است و همچنین قدرت افتراق بالایی در سطح سویه یا جدایه و تکرارپذیری بالایی دارد. از مقایسه rep-PCR، multiplex-PCR، ریبوتایپینگ و AFLP نتیجه گرفته شد که روش rep و PFGE دارای بیشترین توان تفریق کردن در انگشت‌نگاری مولکولی DNA هستند. در مقایسه روش ریبوتایپینگ و هیبریداسیون DNA-DNA، تعیین توالی و سکانسینگ DNA (مانند تعیین توالی ژن RNA ریبوزومی 16S)، در سطح جنس و گونه مفیدترند و دارای قدرت تفریق بسیار بالایی هستند (۲۷). در مطالعه Spigaglia و همکاران (۲۰۰۳) روی ۳۴ جدایه کلوستریدیوم دیفیسل از موارد بالینی اسهال در ایتالیا، روش rep-PCR در مقایسه با PCR ریبوتایپینگ و PFGE قدرت تفریق بیشتری نشان داد (۲۸)، با این حال عواملی مانند جهش‌ها و انتقال افقی توالی‌های غیرهمولوگ و پدیده‌های الحاقی یا حذف یا هر نوع نوترکیبی ژنتیکی الگوهای انگشت‌نگاری مولکولی را متاثر می‌کند. نتایج مطالعه ما توافق خوبی با سایر مطالعه‌های انجام شده نشان می‌دهد. با استفاده از پرایمرهای مختلف قدرت تفریق بین جدایه‌های

- Heyndrickx M. Comparison of five repetitive-sequence-based PCR typing methods for molecular discrimination of Salmonella enterica isolates. *JCM* 2005;43(8):3615-23.
- Foley SL, White DG, McDermott PF, Walker RD, Rhodes B, Fedorka-Cray PJ, et al. Comparison of subtyping methods for differentiating Salmonella enterica serovar Typhimurium isolates obtained from food animal sources. *JCM* 2006;44(10):3569-77.
- Oliveira SdD, Bessa MC, Santos LRd, Cardoso MRdI, Brandelli A, Canal CW. Phenotypic and genotypic characterization of Salmonella Enteritidis isolates. *Braz J Microbiol*. 2007;38(4):720-8.
- Bhowmick PP, Srikumar S, Devegowda D, Shekar M, Ruwandepika HD, Karunasagar I. Serotyping & molecular characterization for study of genetic diversity among seafood associated nontyphoidal Salmonella serovars. *Indian J Med Res Pharm Sci* 2012;135(3):371.
- Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *JCM* 1988;26(11):2465-6.
- 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.
- Beyer W, Mukendi F, Kimmig P, Böhm R. Suitability of repetitive-DNA-sequence-based PCR fingerprinting for characterizing epidemic isolates of Salmonella enterica serovar Saintpaul. *JCM* 1998;36(6):1549-54.
- Bennasar A, de Luna G, Cabrer B, Lallucat J. Rapid identification of Salmonella typhimurium, S. enteritidis and S. virchow isolates by polymerase chain reaction based fingerprinting methods. *International Microbiology* 2010;3(1):31-8.
- Tien Y-Y, Wang Y-W, Tung SK, Liang S-Y, Chiou C-S. Comparison of multilocus variable-number tandem repeat analysis and pulsed-field gel electrophoresis in molecular subtyping of Salmonella enterica serovars

- Paratyphi A. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011;69(1):1-6.
21. Weigel R, Barber D, Isaacson R, Bahnson P, Jones C. Reservoirs of Salmonella infection on swine farms in Illinois. *Proceedings of the 3rd International Symposium on the Epidemiology and Control of Salmonella in Pork* 1999; 180-183.
22. Johnson LK, Brown MB, Carruthers EA, Ferguson JA, Dombek PE, Sadowsky MJ. Sample size, library composition, and genotypic diversity among natural populations of *Escherichia coli* from different animals influence accuracy of determining sources of fecal pollution. *J Appl Environ Microbiol* 2004;70(8):4478-85.
23. Rajabi M, Jones M, Hubbard M, Rodrick G, Wright AC. Distribution and genetic diversity of *Salmonella enterica* in the Upper Suwannee River. *Int J Microbiol*. 2011;13:1-9.
24. Wise MG, Healy M, Reece K, Smith R, Walton D, Dutch W, et al. Species identification and strain differentiation of clinical *Candida* isolates using the DiversiLab system of automated repetitive sequence-based PCR. *J Med Microbiol* 2007;56(6):778-87.
25. Kilic A, Bedir O, Kocak N, Levent B, Eyigun CP, Tekbas OF, et al. Analysis of an outbreak of *Salmonella enteritidis* by repetitive-sequence-based PCR and pulsed-field gel electrophoresis. *J Intern Med* 2010;49(1):31-6.
26. Mohapatra BR, Broersma K, Mazumder A. Comparison of five rep-PCR genomic fingerprinting methods for differentiation of fecal *Escherichia coli* from humans, poultry and wild birds. *FEMS Microbiol Lett* 2007;277(1):98-106.
27. Olive DM, Bean P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *JCM* 1999;37(6):1661-9.
28. Spigaglia P, Mastrantonio P. Evaluation of Repetitive Element Sequence-Based PCR as a Molecular Typing Method for *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol*. 2003;41(6):2454-57.
29. Healy M, Huang J, Bittner T, et al. Microbial DNA Typing by Automated Repetitive-Sequence-Based PCR. *J Clin Microbiol*. 2005;43(1):199-207.