Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol. 25, No.7, Oct 2017
Pages: 564-571

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره ۲۵، شماره ۷، مهر ۱۳۹۶
صفحه: ۵۷۱-۵۶۴

مقایسه پلی‌مورفیسم ژنومی و ارتباط ژنتیکی سویه‌های بالینی سالمونلا انتریکا سرووار تیفی موریوم در استان کرمان به روش ERIC- PCR و Box-PCR

ارغوان گرانمایه[۱]، فرزانه حسینی*[۲]، رباب رفیعی طباطبایی[۳]

چکیده

مقدمه: سالمونلا از مهم‌ترین عوامل ایجادکننده گاستروانتریت در انسان هستند. سالمونلا انتریکا سرووار تیفی موریوم علاوه بر انسان، میزبان های زیادی داشته و امکان شیوع آن در جامعه بالاست. هدف از انجام این مطالعه، ارزیابی تنوع ژنتیکی سالمونلا انتریکا سرووار تیفی موریوم جدا شده از نمونه مدفوع انسانی توسط هر دو روش ERIC-PCR و BOX-PCR می‌باشد.

روش بررسی: در این مطالعه مقطعی، ۶۰ سویه سالمونلا انتریکا سرووار تیفی موریوم از نمونه مدفوع انسانی به دست آمد. تمامی سویه‌ها با استفاده از آزمون‌های استاندارد میکروبیولوژیکی و بیوشیمیایی تایید شدند. سپس، ERIC-PCR و BOX-PCR برای تعیین تنوع ژنتیکی سویه‌های سالمونلا انتریکا سرووار تیفی موریوم با پرایمرهای اختصاصی انجام گردید.

نتایج: تفکیک پلی‌مورفیسم ۶۰ ایزوله سالمونلا انتریکا سرووار تیفی موریوم با استفاده از روش‌های ERIC1، ERIC2 و BOXAIR انجام گردید. در الکتروفورز ۱۱-۲ باند با اندازه ۳۲۰۰-۲۰ باز برای ERIC-PCR و ۱۰-۲ باند با اندازه ۱۵۰۰-۲۰۰ باز برای BOX-PCR مشاهده شد؛ بنابراین، ۱۳ کلاستر مختلف (C1-C13) در ERIC-PCR و ۲۱ کلاستر مختلف در BOX-PCR شناسایی شد.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که گونه‌های سالمونلا انتریکا سرووار تیفی موریوم گونه‌های غیر هومولوگ بودند؛ بنابراین، روش‌های ERIC-PCR و BOX-PCR روش مناسبی برای تایپ‌بندی مولکولی سویه‌های سالمونلا و تشخیص گسترش منبع عفونت برای بررسی اپیدمیولوژیک و برنامه پیشگیری از عفونت هستند.

واژهای کلیدی: سالمونلا انتریکا سرووار تیفی موریوم، BOX-PCR و ERIC-PCR

۱- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه سلولی و مولکولی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران
۲- استادیار میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران
۳- دانشیار میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران
*(نویسنده مسئول)؛ تلفن: ۰۹۱۲۳۴۷۲۴۴۱، پست الکترونیکی: farzaneh953@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۳/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۰/۲

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]

مقدمه

سالمونلاها گروه بزرگی از باسیل‌های گرم منفی دارای ویژگی‌های عمومی خانواده انتروباکتریاسه می‌باشند که به‌طور گسترده‌ای در محیط انتشار داشته و به‌عنوان پاتوژن‌های روده‌ای عامل طیف وسیعی از بیماری‌های در انسان و حیوانات می‌باشند (۱). سالمونلاها باسیل‌های گرم منفی به اندازه ۵-۲ و ۱/۵-۰/۷ میکرون و غیر اسپورزا هستند. بیماری‌های ناشی از سالمونلا در انسان و حیوانات از زمان‌های قدیم وجود داشته ولی تشخیص تفریقی آن از سایر بیماری‌ها مشکل بوده است. این جنس بر اساس آنتی‌ژن‌های فلاژل و سوماتیک به بیش از ۲۶۰۰ سرووار تقسیم می‌شود که بیشتر آن‌ها برای انسان و حیوان بیماری‌زا هستند (۲). از بین سروتیپ‌های مختلف سالمونلا، سروتیپ‌های اینتریتیدیس و تیفی موریوم در مقام اول عفونت یا مسمومیت غذایی قرار دارند. استفاده از روش‌های مولکولی برای تحقیقات در خصوص عوامل بیماری‌زا در دهه اخیر متداول و مرسوم شده است و روش‌های مولکولی تفریقی مختلفی امروزه استفاده می‌شود. روش‌های مولکولی بر اساس مقایسه DNA ژنومی، DNA پلاسمیدی یا اهداف ژنتیکی اختصاصی هستند و شامل PFGE، پلاسمید پروفایلینگ، ریبوتایپینگ AFLP, RAPD, VNTR, MLVA, rep.، مولتی لوکوس آنزیم الکتروفورز (MEE) و سایر روش‌ها هستند (۳). بسیاری از روش‌های ساب تایپینگ همانند خصوصیات شیمیایی و سرولوژی زمان‌بر، خسته‌کننده و پرهزینه بوده و ازلحاظ اپیدمیولوژیک دارای ارزش محدود می‌باشند و قدرت افتراق دهی بین سویه‌هایی که ارتباط بسیار نزدیکی باهم دارند را نداشته بنابراین مطالعات ژنوتیپی با قدرت تمایز بالا از اهمیت بیشتری برای تفریق سویه‌ای برخوردار است (۳،۴). خانواده‌های عناصر متحرک در یوباکتری‌ها توصیف شده و شامل عناصر REP و ERIC و BOX می‌باشند تعدادی از روش‌های تایپینگ برای سالمونلا انتریکا بکار برده می‌شود که از این میان روش ERIC-PCR و BOX-PCR سریع‌تر بوده و دارای قدرت تمایزی مناسبی است و در هر آزمایشگاهی که دارای قابلیت انجام روش PCR است قابل انجام است. توالی‌های ERIC درواقع توالی‌های bp ۱۲۷-۱۲۴ و سکانس BOX به طول ۱۵۴ جفت باز هستند که واجد یک ناحیه معکوس تکرار شونده مرکزی حفاظت شده بوده که به شکل خارج ژنی در ژنوم باکتری‌های روده‌ای وجود دارند. پرایمرهای مورد استفاده در ERIC-PCR مکمل این توالی‌ها هستند و برای ژنوتایپینگ باکتری‌های گرم منفی روده‌ای مانند گونه‌های سالمونلا بکار می‌رود (۵،۶). با استفاده از این روش دو الگوی ژنتیکی و دو کلون متفاوت در میان سویه‌ها شناسایی می‌شود. به نظر می‌رسد که روش ERIC-PCR کارایی مناسبی جهت بررسی تنوع ژنتیکی در سویه‌های سالمونلا دارد. مطالعات گذشته نشان داد که عفونت‌های اپیدمیک معمولاً توسط یک کلون خاص و عفونت‌های تک گیر (اسپورادیک) معمولاً توسط کلون‌های مختلفی ایجاد می‌شوند، لذا، توصیه می‌گردد تا ایزوله‌های مرتبط کلینیکی توسط روش‌های تایپینگ مناسب انگشت‌نگاری شوند تا سویه‌های مربوطه شناسایی و تعیین هویت شوند (۵)؛ بنابراین، هدف از انجام مطالعه پیش رو، بررسی تنوع ژنوتایپی سویه‌های سالمونلا انتریکا سرووار تیفی‌موریوم جدا شده از نمونه‌های مدفوعی بیماران مراجعه‌کننده به مراکز درمانی شهر کرمان بر اساس BOX-PCR و ERIC-PCR است.

روش بررسی

جمع‌آوری نمونه

در این مطالعه توصیفی- مقطعی (Cross sectional) و با در نظر گرفتن سطح اطمینان ۹۵٪ و d= ۰/۰۵ و $n=z^2P(1-P)/d^2$ تعداد ۶۰ ایزوله بالینی سالمونلا انتریکا سرووار تیفی موریوم از مجموع ۱۳۵ نمونه مدفوع بیماران مراجعه‌کننده به مراکز درمانی کرمان و در یک بازه زمانی ۶ ماهه (ابتدای اردیبهشت لغایت انتهای شهریور ۱۳۹۵) جمع‌آوری شد. نمونه‌گیری به روش برداشت مستقیم از مدفوع و با سواپ رکتال انجام گردید. این سواپ‌ها بلافاصله در شرایط استریل به محیط کشت سلنیت F (Merck ،Germany) منتقل و پس از انتقال به آزمایشگاه به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند. در روز دوم از محیط کشت سلنیت F در

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]

محیط‌های افتراقی مک کانکی، SS (سالمونلا-شیگلا) و XLD (Xylose-Lysine-Desoxycholate Agar) (مرک، آلمان) کشت داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند. کلنی‌های مشکوک به سالمونلا (تخمیر لاکتوز منفی، تولید سولفید هیدروژن) را به محیط‌های TSI، MR-VP، سیمون سیترات و SIM منتقل کرده و در نهایت شناسایی بر اساس جدول استاندارد باکتریایی، تعیین هویت شدند. از کیت سروتایپینگ (Biomerieux, France) جهت تعیین سروتایپ و طبق دستورالعمل کیت استفاده شد.

واکنش زنجیره‌ای پلی مراز

در ابتدا به منظور استخراج DNA، سوسپانسیون باکتریایی تهیه شده در آب مقطر به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه در داخل آب جوش (۹۵°C) قرار گرفت. پس از یک مرحله سانتریفیوژ به مدت ۳ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰، محلول رویی به عنوان منبع DNA، برای PCR مورد استفاده قرار گرفت. به منظور تکثیر توالی ژن BOXAIR، ERIC-1R و ERIC2 از توالی پرایمرهای جدول ۱-۱ استفاده شد (۹،۱۰). واکنش PCR در حجم نهایی ۵۰µL انجام شد. محلول واکنش شامل ۱µM از هر ماده اولیه، ۵µL از بافر 10X PCR، ۲۵۰ µM dNTP، ۳mM منیزیم کلرید و ۳U از آنزیم Taq پلیمراز انجام شد. برنامه سیکل حرارتی برای واکنش ERIC-PCR شامل یک سیکل در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۳ دقیقه، ۳۰ سیکل در دمای ۹۰ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، در ۴۰ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه و در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه، یک سیکل در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۸ دقیقه (۱۰) و برای انجام واکنش BOXAIR-PCR یک سیکل در ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۲ دقیقه، ۳۰ سیکل در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، در ۹۲ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، در ۵۰ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه و در ۶۵ درجه سلسیوس به مدت ۸ دقیقه و در ادامه یک سیکل حرارتی در ۶۵ درجه سلسیوس به مدت ۸ دقیقه انجام شد (۹). برای مشاهده نتیجه تکثیر هر یک از ژن‌های مورد مطالعه، الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱/۲٪ در شرایط ۱۵۰ ولت در بافر TBE ×10 تجاری (Fermentas، USA) انجام شد.

آنالیز باندهای ERIC-PCR و BOX-PCR

باندها و الگوهای حاصله از انگشت‌نگاری مولکولی واکنش‌های ERIC-PCR و BOXAIR-PCR در ابتدا با چشم و به صورت بصری تحلیل شدند و سپس با تهیه جدول برنامه (Notepad) وجود باند با یک سایز مشخص (از ۵۰ تا ۳۰۰۰) کیلو باز با عدد ۱ و عدم وجود باند با عدد صفر مشخص شد. این اعداد سپس در جداول برنامه Notepad وارد شد و سپس توسط برنامه نرم‌افزاری NTSYS نسخه شماره ۱۲ تجزیه و تحلیل شباهت‌ها و رسم دندوگرام انجام گرفت.

جدول ۱-۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده (۹، ۱۰)

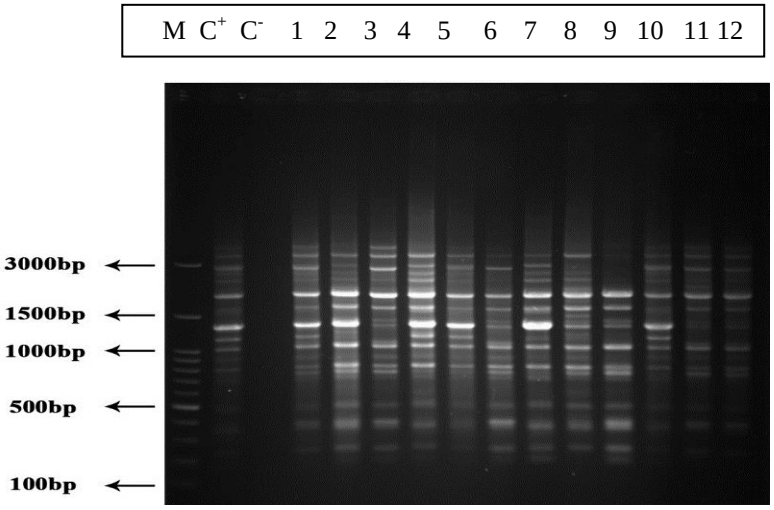
نام پرایمر	Oligonucleotide Sequence (5´- 3´)
BOXAIR	۵-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3
ERIC-1R	۵-ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC-۳
ERIC 2	۵-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-۳

نتایج

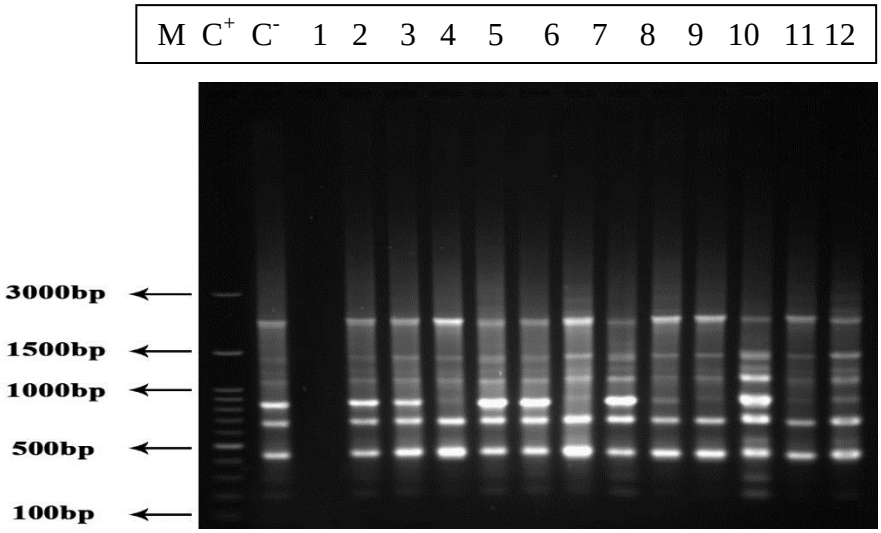
تعداد ۶۰ ایزوله بالینی سالمونلا انتریکا سرووار تیفی موریوم از افراد مراجعه‌کننده به مراکز درمانی استان کرمان جمع‌آوری گردید. میانگین سنی بیماران مورد مطالعه ۲/۷±۳۵ سال بود. کمترین و بیشترین سن بیماران ۵ ماه تا ۵۷ سال بود. از مجموع ۶۰ باکتری تعداد ۳۹ (۶۵٪) مراجعه کننده مرد و ۲۱ (۳۵٪) نفر زن بودند. بیشترین افرادی که سالمونلا از آن‌ها جدا شد در بازه سنی ۴۰-۳۰ سال ۲۲ نفر (۳۶/۶۷٪) بودند. نتایج تست‌های بیوشیمایی برای ۶۰ ایزوله سالمونلا انتریکا سرووار

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]

تیفی موریوم به صورت سیترات مثبت، تولید SH2 مثبت، نیترات مثبت، MR مثبت، VP منفی، اوره آز منفی و اندول منفی مشاهده شد. پس از انجام الکتروفورز محصول PCR، مشاهده باندهای در اندازه‌های ۱۰۰ و ۳۰۰۰، ۱۵۰۰، ۱۰۰۰، ۵۰۰ جفت باز بود. تعداد باندهای مشاهده شده برای پرایمرهای ERIC-PCR ۱۳-۲ عدد (شکل ۱) و برای پرایمرهای BOX-PCR، ۲-۱۰ عدد (شکل ۲) مشاهده شد. آنالیز دندوگرام با نرم‌افزار NTSYS برای ژن پرایمرهای ERIC-PCR برای ۶۰ ایزوله بالینی سالمونلا انتریکا سرووار تیفی موریوم در ۱۳ گروه کلاستربندی و از ۱۳ کلاستر ۵ کلاستر به نام ST (sequence typing) با الگوی ژنتیکی منحصر بفرد شناسایی شد در حالی که برای ژن پرایمرهای BOX-PCR در ۲۱ گروه کلاستربندی و در میان ۲۱ کلاستر، ۸ کلاستر به نام ST با الگوی ژنتیکی منحصر بفرد شناسایی شد.



شکل ۱: ۱۲ الگوی باندی حاصل از ERIC PCR سویه‌های سالمونلا انتریکا سرووار تیفی موریوم با استفاده از پرایمرهای ERIC بر روی ژل آگارز و رنگ‌آمیزی شده با اتیدیوم برماید. به ترتیب از سمت چپ: ۱-M: استاندارد جرم مولکولی. ۲- C^+؛ کنترل مثبت. ۳- C^-؛ کنترل منفی (آب مقطر). ۴- ستون های ۱ تا ۱۲ محصولات ERIC PCR سویه‌های سالمونلا انتریکا سرووار تیفی موریوم



شکل ۲: ۱۲. الگوی باندی حاصل ازPCR BOX سویه‌های سالمونلا انتریکا سرووار تیفی موریوم با استفاده از پرایمرهای BOX بر روی ژل آگارز و رنگ‌آمیزی شده با اتیدیوم برماید. به ترتیب از سمت چپ: ۱-M: استاندارد جرم مولکولی. ۲- +C؛ کنترل مثبت. ۳- -C، کنترل منفی (آب مقطر). ۴- ستون های ۱ تا ۱۲ محصولات PCR BOX سویه‌های سالمونلا انتریکا سرووار تیفی موریوم.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]

بحث

سالمونلا یکی از اعضاء خانواده انتروباکتریاسه بوده که باعث ایجاد بیماری‌های عفونی در انسان و حیوان می‌گردد. از جمله بیماری‌های ایجاد شده می‌توان به تب روده‌ای (تیفوئید)، باکتریمی، انتروکولیت، سالمونلوز اشاره نمود که خود یک معضل بهداشتی محسوب می‌گردد؛ بنابراین تشخیص سریع، دقیق، مطمئن و به موقع آن برای جلوگیری از اپیدمی و عوارض مخرب این باکتری ضروری به نظر می‌رسد (۱۱). این مطالعه به منظور جداسازی و شناسایی ژنوتایپینگ ۶۰ ایزوله سالمونلا انتریکا سرووار تیفی موریوم جدا شده از نمونه مدفوع بیماران مراجعه کننده به مراکز درمانی کرمان با روش REP-PCR با دو پرایمر ERIC و BOX پرایمر انجام شد. در مطالعات مختلفی ERIC PCR یک روش کارا و ارزشمند جهت تایپینگ مولکولی سویه‌های مربوط به جنس سالمونلا ارزیابی شده است (۱۲-۱۴). تایپ‌بندی بر اساس روش‌های مولکولی (PCR-based fingerprinting) یک روش نسبتاً ساده، سریع، تکرارپذیر و دارای قدرت تکرارپذیری بالا جهت ژنوتایپینگ است. در مقایسه با روش‌های دیگر، این روش دارای معایبی نیز است که از جمله می‌توان به قدرت تفکیک (resolution) پذیری پایین، الگوی انگشت‌نگاری واضح و مشخص (clear fingerprint patterns) و آلودگی نمونه‌ها در آزمایشگاه (Contamination level) را نام برد. Versalovic و همکاران روشی را برای انگشت‌نگاری ژنوم باکتریایی به‌وسیله بررسی الگوهای مختص سویه که از تکثیر قسمت‌های تکراری موجود در ژنوم DNA به‌وسیله PCR به دست می‌آید را توصیف کردند. توالی‌های ERIC قسمت‌های ۱۲۶ جفت بازی هستند که حاوی تکرارهای معکوس و مرکزی به شدت حفاظت شده بوده و در نواحی خارج ژنی ژنوم باکتری‌ها قرار گرفته‌اند (۷). یکی دیگر از توالی‌های تکرار شونده BOX است که برای اولین بار در تمایز استرپتوکوک پنومونیه استفاده شده است (۱۵). توالی‌های BOX در نواحی داخلی ژنی واقع شده‌اند و همچنین می‌توانند ساختارهای stem-loop وابسته به قرینه جفت خود را تشکیل می‌دهند. آن‌ها قسمت‌های تکرار شونده موزاییکی هستند که از حالت‌های مختلفی از سه زیر واحد boxa و boxb و boxc تشکیل شده‌اند طول مولکولی این سه واحد به ترتیب ۵۹، ۴۵ و ۵۰ نوکلئوتید است. عناصر BOX از نظر ارتباطی با توالی‌های REP و ERIC ارتباطی ندارند (۱۳،۱۶). Lim و همکاران در کره جنوبی تعداد ۵۷ سویه سالمونلا را با روش ERIC-PCR تایپینگ مولکولی کردند که تعداد ۱۱-۶ باند مشاهده شد و نشان دادند که روش برای مطالعات اپیدمیولوژیکی سویه‌ها مفید است (۱۷). همچنین Oliviera و همکاران در سال ۲۰۰۷ تعداد ۱۰۲ سویه از سالمونلا انتریتیدیس را با روش ERIC PCR مورد بررسی قرار دادند و نتایج این مطالعه نشان داد که با استفاده از روش تعداد باندها بین ۱۳-۱۲ بود (۱۸). در مقایسه این دو مطالعه با مطالعه حاضر می‌توان نتیجه گرفت تعداد باندهای این الگوها شبیه مطالعه حاضر نبود که احتمالاً به دلیل تفاوت در ژل استفاده شده در الکتروفورز است. Chmielewski و همکاران 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 قرار دادند و نتیجه گرفتند که در بین این سه روش ERIC PCR و Rep PCR دارای قدرت افتراقی بیشتری از ریبوتایپینگ می‌باشند (۱۲). در مطالعه Nath و همکاران در هند تعداد ۱۱۳ سویه سالمونلا توسط ERIC PCR روش تایپ‌بندی شدند. با استفاده از این روش دو الگوی ژنتیکی و دو کلون متفاوت در میان سویه‌ها شناسایی شد (۵). Ashna و همکاران در سال ۲۰۱۴، با استفاده از روش BOX-PCR موفق به تایپینگ سالمونلا تیفی موریوم پرداخت. الگوی باندی مشاهده شده آن‌ها در این مطالعه ۱۰-۲ باند بود که رنج قطعات در محدوده ۱۵۰۰-۲۰۰ باز بود. آن‌ها موفق به تمایز ۹ کلاستر و ۳ مورد ST شدند (۱۹). Tikoo و همکاران در سال ۲۰۰۱ با استفاده از BOX-PCR موفق به تمایز ۶ گروه از سالمونلا انتریکا شده‌اند (۶). در این مطالعه الگوی باندی مشاهده شده در ERIC-PCR، ۱۳-۲ عدد و برای BOX-PCR، ۱۰-۲ مشاهده شد. هر دو تکنیک در افتراق سویه‌های سالمونلا مؤثر بوده و سایز باندهای مشاهده

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]

شده در اندازه‌های ۱۰۰ و ۳۰۰۰،۱۵۰۰،۱۰۰۰،۵۰۰ جفت باز بود؛ اما تعداد آن در BOX-PCR، ۲-۱۰ عدد است در حالی که در ERIC- PCR تعداد باندها ۲-۱۳ عدد می‌باشد. در روش ERIC-PCR کلاسترهای طبقه‌بندی نسبت به BOX-PCR کمتر است برای ERIC-PCR و BOX-PCR به ترتیب ۱۳ و ۲۱ کلاستر شناسایی شد. دلیل آن اختصاصیت بالاتر پرایمرهای جستجو در ناحیه ژنی سالمونلا در روش ERIC-PCR نسبت به BOX-PCR می‌باشد. طبق نتایج به دست آمده از این تحقیق ۶۸٪ از واریانس ژنتیکی کل جمعیت مربوط به واریانس درون زیر جمعیت‌های تحت بررسی و فقط ۳۲٪ آن متعلق به واریانس بین زیر جمعیت‌ها بود. در این مطالعه میزان واریانس بین جمعیت‌ها بیشتر و به میزان ۳۲٪ بود که یکی از دلایل آن می‌تواند قرابت جغرافیایی زیر جمعیت‌ها باشد و دلیل دیگر تشابه نژادهای مورد بررسی است.

نتیجه‌گیری

به طور کلی نتایج این مطالعه نشان داد که سویه‌های سالمونلا انتریکا سرووار تیفی موریوم از نظر ژنتیکی متنوع هستند و این موضوع نشان دهنده شیوع پلی کلونال سویه‌ها در نمونه‌های بالینی است. 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.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله تمامی نویسندگان این مقاله از دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال و آزمایشگاه تحقیقاتی پاسارگاد تشکر و قدردانی می‌نمایند.

References:

1- Golberg D, Kroupitski Y, Belausov E, Pinto R, Sela S. ***Salmonella Typhimurium internalization is variable in leafy vegetables and fresh herbs***. International j food microbiology 2011; 145(1): 250-7.

2- Williams C, McColl K. ***Review article: proton pump inhibitors and bacterial overgrowth.*** Alimentary pharmacology & therapeutics 2006; 23(1): 3-10.

3- Miao EA, Miller SI. ***A conserved amino acid sequence directing intracellular type III secretion by Salmonella typhimurium***. Proceedings of the National Academy of Sci 2000; 97(13): 7539-44.

4- Woo Y, Lee S. ***Genetic diversity of multi-resistant Salmonella enterica serotype Typhimurium isolates from animals and humans***. J microbiology-seoul 2006; 44(1): 106.

5 -Nath G, Maurya P, Gulati AK. ***ERIC PCR and RAPD based fingerprinting of Salmonella Typhi strains isolated over a period of two decades***. Infection, genetics and evolution 2010; 10(4): 530-6.

6- Anjali Tikoo†, A. K. Tripathi, S. C. Verma, *N. Agrawal, Gopal Nat.* ***Application of PCR fingerprinting techniques for identification and discrimination of Salmonella isolates***. Current Sci 2001; 80(8): 1048-52.

7- Versalovic J, Koeuth T, Lupski R. ***Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to finerpriting of bacterial enomes***. Nucleic acids research 1991; 19(24): 6823-31.

8- Albufera U, Bhugaloo-Vial P, Issack M, Jaufeerally-Fakim Y. ***Molecular characterization of Salmonella isolates by REP-PCR and RAPD analysis***. Infection, genetics and evolution 2009; 9(3): 322-7.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]

9-Johnson JR, Clabots C. ***Improved Repetitive-Element PCR Fingerprinting ofSalmonella enterica with the Use of Extremely Elevated Annealing Temperatures***. Clinical and diagnostic laboratory immunology 2000; 7(2): 258-64.

10-Fendri I, Hassena AB, Grosset N, Barkallah M, Khannous L, Chuat V, et al. ***Genetic diversity of food-isolated Salmonella strains through pulsed field gel electrophoresis (PFGE) and enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC-PCR)***. PloS one 2013; 8(12): e81315.

11-Karami A, Bagheri B, Ahmadi Z, Pourali F. ***Comparing Fluorescent Loop-Mediated Isothermal Amplification and PCR in Detecting Salmonella***. J Mazandaran Uni of Medical Sci. [Research(Original)] 2012; 22(95): 48-55 .[persion]

12-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 Veterinary Medicine, Series B 2002; 49(4): 163-8.

13-Rasschaert G, Houf K, Imberechts H, Grijspeerdt K, De Zutter L, Heyndrickx M. ***Comparison of five repetitive-sequence-based PCR typing methods for molecular discrimination of Salmonella enterica isolates***. J clinical microbiology 2005; 43(8): 3615-23.

14-Saxena M, Singh V, Lakhcharua B, Taj G, Sharma B. ***Strain differentiation of Indian isolates of Salmonella by ERIC-PCR. Research in veterinary science*** 2002; 73(3): 313-4.

15-Van Belkum A, Sluijuter M, De Groot R, Verbrugh H, Hermans P. ***Novel BOX repeat PCR assay for high-resolution typing of Streptococcus pneumoniae strains***. J clinical microbiology 1996; 34(5): 1176-9.

16-Tacão M, Alves A, Saavedra MJ, Correia A. ***BOX-PCR is an adequate tool for typing Aeromonas spp. Antonie van Leeuwenhoek*** 2005; 88(2): 173-9.

17- Lim H, Lee KH, Hong C-H, Bahk G-J, Choi WS. ***Comparison of four molecular typing methods for the differentiation of Salmonella spp.*** International journal of food microbiology 2005; 105(3): 411-8.

18 -Oliveira SDd, Bessa MC, Santos LRd, Cardoso MRdI, Brandelli A, Canal CW**.** ***Phenotypic and genotypic characterization of Salmonella Enteritidis isolates.*** Brazilian j microbiology 2007; 38(4): 720-8.

19- Ashna J, Farook K, Ali A-Z. ***Molecular epidemiology analysis of Salmonella enterica serotype Typhi used Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)***. J Biotechnology Research Center 2014; 8(2): 49-59.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]

Comparison of Genomic Polymorphisms and Genetic Relation of Clinical Salmonella Enterica Serovar Typhimurium Isolates in Kerman Province by ERIC- PCR and Box-PCR Methods

Arghavan Geranmayeh[1], Farzaneh Hoseini[2*], Robab Rafiei Tabatabaei[3]

[1] Department of Microbiology, College of Bioscience, Islamic Azad University of Tehran North Branch, Tehran, Iran
[2,3] Department of Microbiology, College of Bioscience, Islamic Azad University Tehran North Branch, Tehran, Iran

Received: 10 Jun 2016 **Accepted:** 22 Dec 2016

Abstract

Introduction: Salmonella is one of the most important causes of gastroenteritis in humans. Salmonella enterica Serovar Typhimurium has many hosts in addition to humans, and its prevalence in the community is high. The aim of the study was comparing the genetic diversity of Salmonella enterica serovar Typhimurium isolated from human fecal samples by both of ERIC-PCR and BOX-PCR method.

Methods: In this cross-sectional study, 60 Salmonella enterica serovar Typhimurium were obtained from the human fecal samples. These strains were identified by standard microbiological and biochemical tests. Then, ERIC-PCR and BOX-PCR were carried out for determination of molecular relatedness of Salmonella enterica serovar Typhimurium using specific primers.

Results: The results showed that all 60 Salmonella enterica serovar Typhimurium were separable using ERIC 1, ERIC 2 and BOXAIR. In electrophoresis, 2-11 bands with 20-3200bp for ERIC-PCR and 2-10 bands with 200-1500bp for BOX-PCR were observed. Therefore, 13 different clusters (C1-C13) in ERIC-PCR and 21 different clusters (C1-C21) in BOX-PCR were identified.

Conclusion: The results showed that Salmonella enterica serovar Typhimurium strains were non-homolog. Therefore, ERIC-PCR and BOX-PCR methods are appropriate methods for molecular typing of Salmonella strains and determine the original infection source for the epidemiological survey as well as infection prevention program.

Keywords: Salmonella enterica serovar Typhimurium, BOX-PCR, ERIC-PCR.

This paper should be cited as:

Geranmayeh A, Hoseini F, Rafiei Tabatabaei R. **Comparison of Genomic Polymorphisms and Genetic Relation of Clinical Salmonella Enterica Serovar Typhimurium Isolates in Kerman Province by ERIC- PCR and Box-PCR Methods.** J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2017; 25(7): 564-71.

***Corresponding author: Tel: 09123472441, email: farzaneh953@yahoo.com**

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]