



ژنوتایپینگ ایزوله های سالمونلا انتریتیدیس جدا شده از مواد غذایی به روش RAPD-PCR

فاطمه پارسا^۱، منوچهر مومنی شهرکی^{۲*}، فاطمه خداوردی پور^۲

۱. گروه زیست شناسی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

۲. مرکز تحقیقات تغذیه و محصولات ارگانیک، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

چکیده	اطلاعات مقاله
سالمونلوز بیماری مشترک در انسان و حیوانات است. یکی از سرووارهای مهم از لحاظ بیماری زایی در انسان، دام و طیور، سالمونلا انتریتیدیس است که عامل رایج بیماری های منتقله از طریق غذا نیز می باشند. روش های تایپینگ مولکولی نظیر RAPD-PCR الگوهای متفاوت برای تمایز گونه های سالمونلا ایجاد می کنند. هدف از این مطالعه تفریق و تمایز و تعیین قرابت بین جدایه های سالمونلا انتریتیدیس به وسیله روش RAPD-PCR بود. در سال ۱۳۹۷ در مجموع ۳۵۰ نمونه ماده غذایی شامل گوشت قرمز و مرغ، سبزی خوردن، سالاد ماکارونی و سالاد الویه از مراکز تولید و اغذیه فروشی های شهرستان شهرکرد جمع آوری گردید و در کوتاه ترین زمان ممکن و در شرایط استریل به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد منتقل گردید. پس از جداسازی و تأیید تشخیص به روش PCR جهت ژنوتایپینگ ایزوله های سالمونلا انتریتیدیس به روش RAPD-PCR از پرایمر P1254 با توالی CCGCAGCCAA استفاده شد. تعداد ۳۰ ایزوله سالمونلا انتریتیدیس جداسازی گردید. در سطح تشابه ۷۶ درصد ایزوله های مورد مطالعه دارای ۲۱ زیرگروه بودند که خود نشانگر تنوع ژنتیکی بالا در بین ایزوله های مورد مطالعه است.	تاریخچه مقاله: دریافت: پذیرش: چاپ: DOI: کلمات کلیدی: سالمونلا انتريتيديس، ژنوتايپینگ، مواد غذایی، RAPD-PCR
	* نویسنده مسئول: Email: m.momeni@iau.ir

مقدمه

سالمونلا^۱ یکی از اعضای خانواده انتروباکتریاسه^۲ می باشد که باسیل های گرم منفی، متحرک با داشتن تار لرزان یا فلاژن پیرامونی، بی هوازی اختیاری و فاقد اسپور می باشند. سالمونلا دارای دو گونه مهم سالمونلا/انتریکا^۳ و سالمونلا بونگوری^۴ است که گونه انتریکا خود دارای شش گونه می باشد (۱). سالمونلا/انتریکا زیرگونه انتریکا سروتیپ /انتریتیدیس است که به اختصار سالمونلا انتریتیدیس^۵ نیز نامیده می شود و مهم ترین عامل در ابتلا به سالمونلوزیس می باشد. باکتری سالمونلا به عنوان یک عامل بیماری زای قابل انتقال از طریق مواد غذایی، مسئول ایجاد بیماری در حیوان و انسان بوده و تاکنون اپیدمی های متعددی در دنیا ناشی از این باکتری گزارش شده است. پرندگان و دام ها منابع اصلی این باکتری هستند و آلودگی مواد غذایی حاصل از آنها با این باکتری، باعث ایجاد بیماری گوارشی در انسان می شود. از مهم ترین عوارض گوارشی ناشی از این باکتری تب روده ای است که به عنوان یک عامل تهدیدکننده حیات مطرح بوده و سالیانه بالغ بر ۲۰ میلیون نفر را در دنیا مبتلا می سازد که از بین آنها حدود ۲۰۰ هزار نفر می میرند. بر اساس گزارشات سازمان بهداشت جهانی بیش از ۹۰ درصد تب های روده ای در کشورهای آفریقایی و آسیایی بویژه آسیای جنوب شرقی رخ می دهد، که علت عمده آن عفونت با سویه های سالمونلا/انتریکا سروار تیفی و سالمونلا/انتریکا سروار پاراتیفی A، B و C می باشد (۲). وجود عفونت ناشی از سالمونلا در طیور و بررسی انتشار آن در زنجیره غذایی انسانی، شناسایی سریع این پاتوژن را در فرآورده های حیوان و بررسی تنوع ژنوتیپی و فنوتیپی در میان جدایه های تهیه شده را امکان پذیر نموده است. بنابراین در اکثر کشورها بررسی آلودگی به سالمونلا/انتریتیدیس و تشخیص به موقع آن از آزمایشات مهم در صنعت غذا و مراکز کنترل و پیشگیری بیماری ها محسوب می شود. با وجود قرابت ژنتیکی بسیار نزدیک در

جنس سالمونلا، تغییرات گسترده ای در بروز بیماری، ویرولاز و توزیع جغرافیایی وجود دارد (۳). از دست دادن و یا به دست آوردن برخی ژن ها نقش مهمی در تکامل سروتیپ های مختلف سالمونلا ایفا می کنند.

مواد و روش کار

جداسازی باکتری

در سال ۱۳۹۶ در مجموع ۳۵۰ نمونه ماده غذایی شامل گوشت قرمز و مرغ، سبزی خوردن، سالاد ماکارونی و سالاد الویه از مراکز تولید و اغذیه فروشی های شهرستان شهرکرد جمع آوری گردید و در کوتاه ترین زمان ممکن و در شرایط استریل به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد منتقل گردید. به منظور غنی سازی به محیط کشت پپتون واتر، منتقل شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرم خانه گذاری انجام گردید. نمونه های مواد غذایی کشت داده شده در مرحله بعد بر روی محیط سلنیت سیستئین کشت داده و به مدت ۲۴ ساعت گرم خانه گذاری شد و در نهایت در محیط سالمونلا-شیگلا آگار کشت داده شد و ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه گرم-خانه گذاری گردید. کلنی های رشد کرده و مشکوک با استفاده از تست های استاندارد بیوشیمیایی و میکروبیولوژیکی مانند: TSI، اوره، اندول، MRVP، سیترات مورد شناسایی قرار گرفت (۴،۵).

تایپینگ مولکولی

به منظور استخراج DNA سلولی، از کشت ۲۴ ساعته باکتری در محیط پپتون واتر (محصول شرکت مرک، آلمان) به عنوان منبع استفاده شد. در نهایت، استخراج DNA به روش جوشاندن انجام گرفت، جهت ارزیابی کیفیت DNA استخراج شده از نمونه های مورد مطالعه از روش الکتروفورز روی ژل آگارز استفاده شد. به منظور تشخیص قطعی از زوج پرایمرهای طراحی شده مربوط به ژن 16srRNA سالمونلا

⁴ *Salmonella bongori*

⁵ *Salmonella enteritidis*

¹ *Salmonella*

² *Enterobacteriaceae*

³ *Salmonella Enterica*

انترتیدیس/استفاده شد که در جدول (۱) نشان داده شده است.

جدول ۱- توالی پرایمرهای مربوط به ردیابی ژن *16srRNA* در ایزوله‌های *سالمونلا* انترتیدیس

اندازه محصول (bp)	توالی پرایمر (۵'–۳')	ژن
۲۵۰	S1 GCCGTACACGACCTTATAGA S4 ACCGTACACGACCTTATAGA	<i>16srRNA</i>

واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر متشکل از DNA استخراج شده، 10x PCR buffer، Mix، dNTP (10mM)، *Mgcl2* (50mM)، پرایمرهای F و R (1μM)، آنزیم *Smar Taq DNA Polymerase* و آب مقطر صورت گرفت. مواد مطابق با جدول (۲) مخلوط شده و واکنش PCR انجام شد. محصول PCR مربوط به هر مرحله از انجام آزمایش روی ژل آگارز الکتروفورز شده و عکس برداری با استفاده از Gel document انجام شد.

جدول ۲- ترکیب اجزای PCR جهت ردیابی ژن *16srRNA* *سالمونلا* انترتیدیس

حجم نهایی	غلظت نهایی	مواد
۲/۵ میکرولیتر	X۱	X۱۰ Buffer
۰/۵ میکرولیتر	۰/۲ میلی مول	dNTPs (10mM)
۰/۷۵ میکرولیتر	۱/۵ میلی مول	<i>Mgcl2</i> (50mM)
۱ میکرولیتر	۱ میکرومول	PrimerF (25μM)
۱ میکرولیتر	۱ میکرومول	PrimerR (25μM)
۰/۲ میکرولیتر	1U	<i>Taq DNA Polymerase</i> (5u/μl)
۱ میکرولیتر	۵۰ نانوگرم	DNA
۱۸/۰۵ میکرولیتر	-	ddH2O
۲۵ میکرولیتر	-	حجم نهایی واکنش

دسته‌بندی ژنتیکی ایزوله‌ها

به‌منظور دسته بندی ژنتیکی ایزوله‌های *سالمونلا* انترتیدیس به‌روش RAPD-PCR مطابق روش پیشنهادی توسط *Albufera* و همکاران استفاده شد (۶). در این روش آزمایش، PCR در واکنشی به حجم ۵۰ میکرولیتر شامل ۵ میکرولیتر 10x PCR buffer، ۴ میکرولیتر *MgCl2* ۱/۷۵، dNTP Mix ۰/۶، میکرولیتر آنزیم *Taq DNA Polymerase* ۳ و پرایمر P1254 با توالی CCGCAGCCAA انجام گرفت. برنامه حرارتی مورد استفاده در تکنیک RAPD-PCR جهت دسته‌بندی ژنتیکی ایزوله‌های مورد بررسی به شرح زیر تنظیم گردید:

واسرشته‌سازی اولیه به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد انجام شد. سپس، چرخه‌ی PCR شامل ۳۰ سیکل به‌ترتیب شامل: واسرشته‌سازی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در ۵۳ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۵ ثانیه، و بسط در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه بود. در پایان، یک مرحله گسترش نهایی به‌مدت ۶ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد.

محصول PCR مربوط به مرحله فوق روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شد و از ژل حاصله در حضور نور UV تصویربرداری و ثبت شد. آزمایش RAPD-PCR روی هرکدام از ایزوله‌های مورد مطالعه ۳ نوبت انجام گرفت تا از تعداد باندهای ایجادشده توسط هر ایزوله اطمینان

UPGMA بر مبنای ضریب تشابهی که بالاترین ضریب همبستگی کوفنتیک را دارا بود، استفاده گردید.

نتایج

پس از استخراج DNA و بررسی کیفیت DNA های استخراج شده روی ژل آگارز به منظور تشخیص قطعی باکتری *سالمونلا* / *انتریتیدیس* در حضور توالی ژن *16srRNA*، باکتری های جدا شده مورد بررسی قرار گرفتند. در بررسی مولکولی تعداد ۳۰ ایزوله با داشتن باند ۲۵۰ جفت بازی *سالمونلا* / *انتریتیدیس* تشخیص داده شدند. نتایج میزان آلودگی به *سالمونلا* / *انتریتیدیس* در جدول (۲) نشان داده شده است. براساس آزمون دقیق فیشر بین آلودگی به *سالمونلا* و نوع ماده غذایی ارتباط آماری معنی داری وجود دارد ($p\text{-value} < 0/05$).

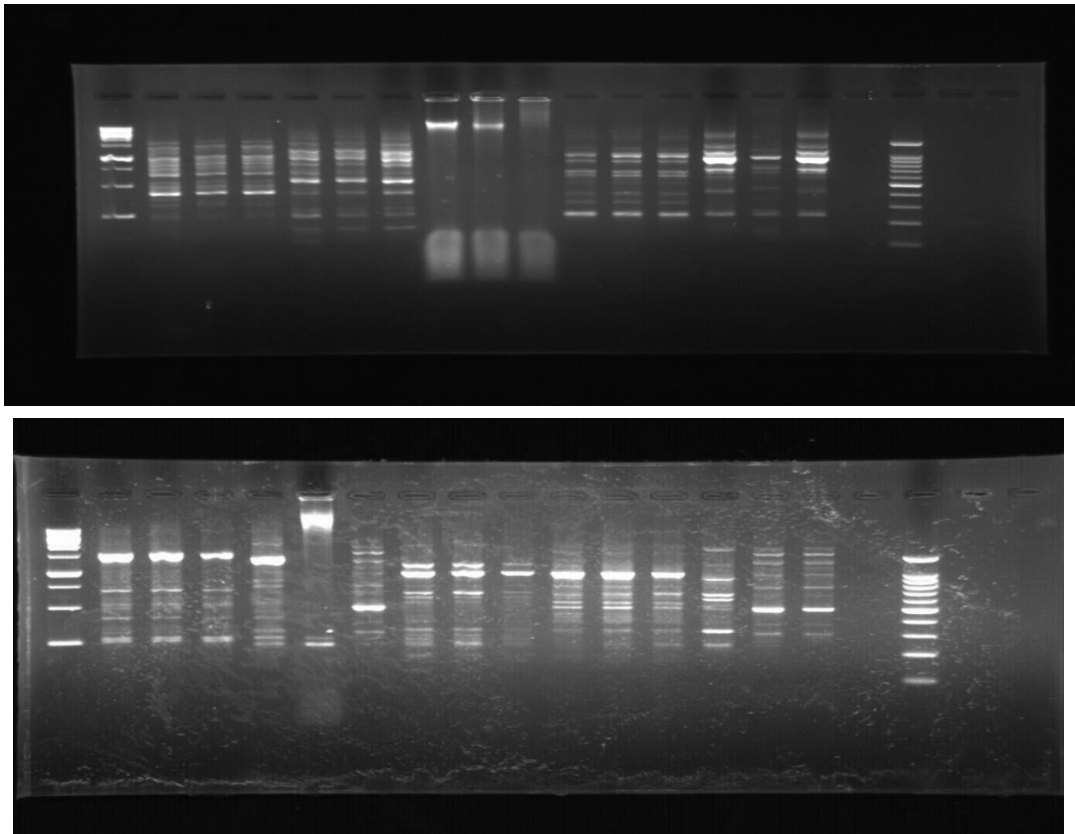
حاصل گردید. جهت ترسیم درخت فیلوژنتیکی و آنالیز تصاویر حاصل از الکتروفورز نمونه های مورد مطالعه، از نرم افزار NTSYS version 2.02e استفاده گردید. برای این منظور ابتدا باندهای حاصل از الکتروفورز محصول نشانگر، به صورت داده های کمی صفر و یک (وجود باند یا عدم وجود باند)، امتیازدهی شدند. پس از امتیازدهی ژل ها، شباهت ژنتیکی بر اساس داده های صفر و یک با استفاده از ضریب جاکارد و دایس و تطابق ساده محاسبه شد. به منظور تعیین کارایی روش RAPD-PCR تجزیه خوشه ای بر مبنای ضرایب تشابه، از ضریب همبستگی کوفنتیک استفاده گردید. سپس برای گروه بندی سویه ها، تجزیه خوشه ای به روش (Unweighted Pair Group Method using arithmetic Averages)

جدول ۳ - میزان شیوع *سالمونلا* / *انتریتیدیس* در نمونه های مواد غذایی

نمونه	تعداد نمونه	تعداد جدایه <i>سالمونلا</i> / <i>انتریتیدیس</i>	درصد آلودگی
گوشت قرمز	۱۰۰	۱۰	۱۰٪
گوشت مرغ	۱۰۰	۱۱	۱۱٪
سبزی خوردن	۱۰۰	۵	۵٪
سالاد ماکارانی	۲۵	۲	۸٪
سالاد اولویه	۲۵	۲	۸٪
مجموع	۳۵۰	۳۰	۴۲٪

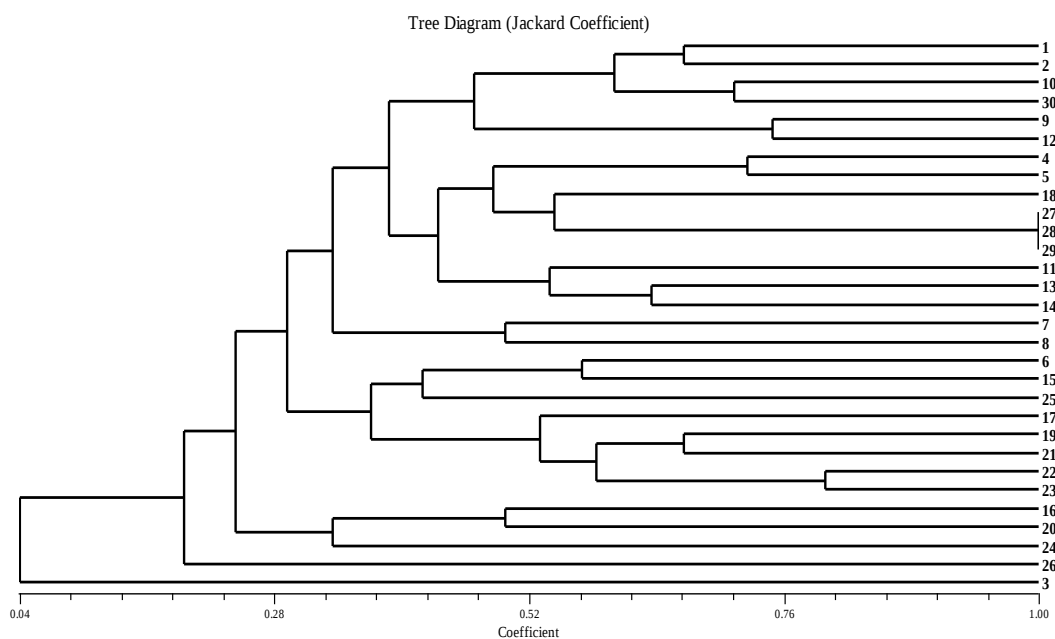
نتایج مربوط به آزمون RAPD-PCR

ایزوله های مورد مطالعه سه نوبت با روش RAPD-PCR آزمایش و پس از اطمینان از حضور قطعات تکثیر یافته در PCR آنالیز شدند. شکل های زیر ژل حاصل از الکتروفورز محصول نشانگر RAPD-PCR روی ایزوله های *سالمونلا* / *انتریتیدیس* جدا شده از مواد غذایی را نشان می دهد.



همان گونه در تصویر فوق مشهود است، ایزوله‌های مورد مطالعه دارای الگوی بانندی از محدوده ۱۵۰ تا ۱۷۰۰ جفت بازی DNA بودند که قطعات تکثیر یافته در ایزوله‌ها در قالب اعداد ۱ (وجود باند) و ۰ (عدم وجود باند) امتیازدهی و به وسیله بازخوانی مقادیر کامپیوتری ژل‌ها در برنامه NTSYS آنالیز شدند. پس از امتیازدهی ژل‌ها، شباهت ژنتیکی بر اساس داده‌های ۰ و ۱ با استفاده از ضرایب

جاکارد، دایس و تطابق ساده محاسبه شد که ضریب کوفنتیک محاسبه‌شده برای الگوریتم UPGMA و هر کدام از سه ضریب فوق در جدول (۳) آورده شده است. ضریب کوفنتیک محاسبه شده برای الگوریتم UPGMA و ضرایب تشابه جاکارد، دایس و تطابق ساده روی ایزوله‌های *سالمونلا انتریتیدیس* با نشانگر RAPD-PCR.



جهت محاسبه درصد تشابه ژنتیکی ایزوله‌ها و ترسیم درخت فیلوژنی از ضریب تطابق ساده استفاده شد. در نشانگر RAPD-PCR در ایزوله‌های ۲۷،۲۸ و ۲۹ قرابت ۱۰۰ درصد (ضریب شباهت) مشاهده شد. مجموع ۳۰ ایزوله مورد مطالعه در سطح تشابه ۷۶ درصد ۲۷ پروفایل قرار گرفتند.

بحث و نتیجه گیری

در گذشته از ویژگی‌های فنوتیپی مانند بیوتیپ، سروتیپ، باکتریوفاژ یا باکتریوسین تیپ و پروفایل حساسیت به آنتی‌بیوتیک جهت تایپینگ میکروب‌ها استفاده می‌شد، ولی امروزه با پیشرفت روش‌های مولکولی در دو دهه اخیر، آن‌ها را بسیار کارآمد در تایپینگ مولکولی کرده است. تکنیک‌های مولکولی که برای تایپینگ میکروب‌ها به کار می‌روند عبارتند از پالس فیلد ژل الکتروفورز، روش‌های متکی بر برش آنزیمی، آنالیز پلاسمیدها و روش‌های تیپ‌بندی براساس PCR. به کارگیری روش‌های مولکولی برای تیپ‌بندی پاتوژن‌ها در ارتباط دهی دقیق بین سویه‌ها و گونه‌ها بسیار اساسی می‌باشد. اثبات ارتباطات کلون‌های یک پاتوژن به ما این امکان را می‌دهد که منبع آلودگی (انسان یا محیط) را پیدا کرده، سویه‌های عفونی از سویه‌های غیر عفونی را متمایز نموده و در نهایت عود را از عفونت مجدد تفکیک نماییم. امروزه تکنیک‌های ژنتیک مولکولی مانند PCR، انگشت نگاری اسید نوکلئیک، آنالیز سکانس DNA کرموزوم باکتری یک ابزار مهم در شناسایی باکتری‌ها می‌باشند. با تایپینگ مولکولی می‌توان شیوع عفونت‌های بیمارستانی، شناسایی مخازن آلودگی ناشی از غذا یا انتشار سویه‌های پاتوژنیک گیاهی در محیط، جداسازی ژنوتیپ خاص در کونزوگاسیون با یک باکتری خاص را مشخص کرد و هم‌چنین این روش‌ها به ما آگاهی بیشتر اصول اپیدمیولوژی و تکامل و انتشار بسیاری از بیماری‌های باکتریایی را می‌دهند. تغییرات در روش‌های تایپینگ مولکولی که روی شناسایی ژنوتیپ‌های خاص در میان سویه‌های باکتری‌ها متمرکز شده

است یک انقلابی در مطالعه تنوع سویه‌ها و پایش کردن شیوع عفونت‌ها ایجاد کرده است. این روش‌ها نسبت به روش‌های کلاسیک تیپ بندی دارای چندین فایده از جمله موارد زیر می‌باشند: نیاز نداشتن به تهیه کشت تک از یک سلول باکتری، افزایش پایداری و حساسیت سنجش و انجام واکنش در زمان کمتر. در نهایت یک تیپ مولکولی که از انگشت نگاری DNA یا سکانس نوکلئوتید حاصل می‌شود دارای اطلاعات زیادی درباره سویه می‌باشد. RAPD-PCR بر اساس تکثیر تصادفی قطعات DNA ژنومی با پرایمرهای اختیاری می‌باشد. این تکنیک از روش PCR برای تکثیر قطعات DNA استفاده می‌کند. به جای جفت پرایمرهای معمولی که برای یک منطقه هدف طراحی می‌شوند، یک پرایمر منفرد انتخاب شده برای اتصال به چندین سایت در طول ژنوم با دماهای اتصال پایین طراحی می‌شود و سپس محصولات تکثیری بین محل‌های اتصال پرایمر به مکان‌های نزدیک به رشته مخالف تولید می‌شوند. با استفاده از پرایمرهای تقریباً ۱۰ جفت بازی، مکان‌های تکثیری درون کل ژنوم هدف‌گیری شده و تکثیر می‌شوند و سپس محصولات تکثیری روی ژل جدا شده و با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شده و آشکارسازی می‌شوند. تاکنون تحقیقی در مورد ژنوتایپینگ ایزوله‌های سالمونلا انتریتیدیس جدا شده از مواد غذایی صورت نگرفته است. در این تحقیق مشخص گردید که ترتیب ۲۸ ایزوله مورد مطالعه در ۲۴ پروفایل قرار می‌گیرند. به‌طور معمول مطالعات تشخیصی و اپیدمیولوژیک سویه‌های سالمونلا توسط تست‌های سرولوژیک انجام می‌شوند ولی چون نتایج حاصل از این تست‌ها اطلاعات محدودی در مورد سویه‌های باکتریایی می‌دهد بنابراین به تکنیک‌های مولکولی در مطالعات اپیدمیولوژیکی نیاز است.

سنگری و همکاران در مقاله خود این گونه نوشتند که سالمونلوزیس از مهمترین بیماری‌های عفونی مشترک بین انسان و حیوانات است که بیشتر در ارتباط با مصرف گوشت،

ماکیان، تخم مرغ و شیر است. هدف از این مطالعه، ارزیابی ارتباط ژنتیکی سالمونلا انتریکا سرووار انتریتیدیس جداشده از نمونه‌های انسانی و دامی به روش ERIC-PCR می‌باشد. در این مطالعه توصیفی-مقطعی، تعداد ۶۰ جدایه سالمونلا/انتریکا سروتایپ انتریتیدیس از نمونه‌های انسانی و دامی به-دست آمد. شناسایی سویه‌ها با استفاده از روش‌های استاندارد میکروبیولوژیکی و بیوشیمیایی و سروتایپینگ بر اساس روش اسلاید آگلوتیناسیون با استفاده از آنتی سرم‌های مونو و پلی والان انجام شد. سپس ERIC-PCR با استفاده از توالی‌های الیگونوکلوئیدی به منظور تعیین ارتباط مولکولی سویه‌ها انجام گردید. نتایج به دست آمده حاکی از آن بود که تمامی ۶۰ سویه سالمونلا انتریکا تحت مطالعه با استفاده از جفت پرایمرهای ERIC I و ERIC II قابل تایپ بندی بودند. تعداد باندهای به‌دست آمده بین ۲-۱۱ عدد با وزن مولکولی ۲۰-۳۲۰۰ جفت باز بود. بر این اساس به‌طور کلی ۱۵ کلاستر مختلف به‌دست آمد که بیشترین تعداد (۱۳/۳ درصد، ۸ سویه) با داشتن الگوی مشابه در کلاستر ۵ قرار گرفتند. نتایج نشان داد که سویه‌های سالمونلا/انتریکا سرووار/انتریتیدیس از نظر ژنتیکی ناهمگون هستند. هم‌چنین روش ERIC-PCR جهت تایپینگ مولکولی سویه‌های سالمونلا و تعیین کانون-های شیوع عفونت می‌باشد که می‌توان از آن جهت مطالعات اپیدمیولوژیک و تعیین راهبردهای کنترل عفونت استفاده نمود (۷).

اگونرمی^۶ و همکاران در سال ۲۰۱۴ با بررسی روش‌های مختلف ژنوتایپینگ سالمونلا/انتریتیدیس مانند پالس فیلد ژل الکتروفورز و فاژ تایپینگ نشان دادند که این روش‌ها برای سالمونلا/انتریتیدیس نا کارآمد بوده و توانایی تفکیک دقیق ژنوتایپ‌های مختلف این باسیل را ندارند. از سوی دیگر این محققان با استفاده از SNP-PCR موفق به ارائه‌ی روشی دقیق برای تعیین ژنوتایپ‌های مختلف سالمونلا/انتریتیدیس

شدند. در این تحقیقات مطالعه بر روی ۵۵ نمونه‌ی ایزوله‌ی سالمونلا/انتریتیدیس نشان داد که این نمونه‌ها می‌توانند با استفاده از روش SNP-PCR در ۱۲ گروه ژنوتایپی مختلف طبقه بندی گردند. نتایج حاصل از این پژوهش قدرت تفکیک بالای روش SNP-PCR را نسبت به روش‌های PFGE و فاژ تایپینگ نشان می‌دهد (۸).

در تحقیق رنجبر و همکاران در ۵۷ سویه سالمونلا/انتریتیدیس توسط روش ERIC-PCR مورد مطالعه قرار گرفتند. نتایج نشان داد که روش ERIC-PCR می‌تواند ایزوله‌های سالمونلا/انتریکا را را به‌خوبی تمایز دهد، چرا که تمام ایزوله‌ها با این روش قابل تایپ بندی بودند به‌طوری‌که این روش سویه‌ها را به ۹ الگوی متفاوت تقسیم بندی نمود. در این مطالعه مشاهده شد که برخی سویه‌هایی با الگوهای یکسان ERIC در بیمارستان‌های مختلف یافت شدند که نشان دهنده انتقال گسترده باکتری در بین بیمارستان‌ها است. انتقال باکتری می‌تواند از طریق وسایل و پرسنل بیمارستانی و اشخاص دیگری که با بیماران در تماس بوده‌اند صورت پذیرد (۱).

مطالعات مزال^۷ و همکاران در سال ۲۰۱۳ بر روی ژنوتایپینگ ایزوله‌های سالمونلا/انتریتیدیس با استفاده از روش‌های PFGE و MVLA انجام شد و پروفایل پلاسمیدی برای باسیل مورد نظر به دست آمد در این تحقیق بررسی تایپینگ ۶۰ ایزوله‌ی سالمونلا انتریتیدیس با استفاده از روش PFGE و به وسیله‌ی آنزیم محدود کننده‌ی XbaI انجام شد که نتایج به صورت ۱۰ تا ۱۲ باند با شباهت ۹۵ تا ۸۱ درصد مشاهده گردید و نمونه‌ها به ۶ خوشه‌ی ژنی مختلف طبقه‌بندی شدند. به‌علاوه در بررسی ژنوتایپینگ با روش MLVA تعداد ۱۸ آلل مختلف برای نمونه‌های ایزوله به-دست آمد (۹).

^۷Mezal

^۶Ogunremi

Saxena و همکارانش در هند، ۲۴ ایزوله از سروارهای سالمونلا را با روش ERIC-PCR مورد تمایز قرار دادند و ۲۱ تیپ ژنتیکی به دست آمد و نتایج نشان داد که این روش قادر است واریانتهای ژنتیکی مختلفی را در سالمونلا تایفی موریوم را از هم تمایز دهد. در مطالعه دیگر Malalena و همکارانش در سال ۲۰۰۶ در پرتغال ۶۹ سویه از سالمونلا را مورد مطالعه تایپینگ مولکولی ERIC-PCR را با روش قرار دادند و نشان دادند که این روش کاربردی می باشد (۱۱). مطالعات گنگ^۸ و همکاران در سال ۲۰۱۴ بر روی ژنوتایپینگ ۳۲۳ ایزوله از سالمونلا/انتریکا جمع آوری شده از نمونه های حیوانی در چین نشان داد که این نمونه ها در مجموع متعلق به ۲۰ سروار مختلف از سالمونلا/انتریکا می باشند و بیشترین حضور سالمونلا/انتریتیدیس در نمونه های جمع آوری شده از اردک مشاهده شد. در ادامه بررسی ژنوتایپی نمونه های ایزوله با استفاده از تکنیک PCR نشان داد که این نمونه های در ۴۱ گروه ژنوتیپی مختلف طبقه بندی می گردند که عمده تفاوت آنها مربوط به حضور ژن های فیمبريال^۹ بود. نتایج این تحقیق نشان داد که حضور و تنوع ژن های فیمبريال می تواند نقش مهمی در تنوع ژنوتایپینگ ایزوله های سالمونلا/انتریکا داشته باشد (۱۲).

مطالعه ی چانگ^{۱۰} و همکاران در سال ۲۰۱۶ بر روی ژنوتایپینگ سالمونلا/انتریکا استخراج شده از دستگاه گوارش نمونه های انسانی و حیوانی در قطر با استفاده از روش توالی یابی چند جایگاهی^{۱۱} MLST انجام شد. نتایج بررسی ژنوتایپ این باسیل گرم منفی نشان داد که بیش از ۲۷ ژنوتایپ مختلف از سالمونلا/انتریکا در نمونه های اخذ شده وجود دارد. به علاوه در این مطالعه ۷ ژنوتایپ ST1695, ST1696, ST1697, ST1698, ST1699, ST1702 و

ST1703 برای اولین بار گزارش شد. در نهایت مطالعات جمعیتی و بررسی الگوی توزیع ژنوتایپ های مختلف سالمونلا/انتریکا نشان داد که ST11 و ST19 به ترتیب با حضور در بیش از ۲۹/۵ و ۱۱/۵ درصد از جمعیت نمونه های آلوده دارای بیشترین فراوانی ژنوتیپی می باشند (۱۳).

مطالعات کانگ^{۱۲} و همکاران در سال ۲۰۱۷ بر روی ژنوتایپینگ نمونه های ایزوله سالمونلا/انتریتیدیس استخراج شده از نمونه های انسانی و ماکیان در کره جنوبی با استفاده از روش های PGFE و MLVA نشان داد که ژنوتایپ های مختلف این باسیل دارای ۲۸ الگو و ۱۶ پروفایل آلی هستند. به علاوه بررسی پلاسمید در ژنوتایپ های مختلف سالمونلا/انتریتیدیس نشان داد که دامنه تغییرات پروفایل پلاسمیدی در انواع مختلف سالمونلا/انتریتیدیس بسیار گسترده می باشد. در نهایت نتایج ژنوتایپینگ نشان داد که بیش تر ژنوتایپ های سالمونلا/انتریتیدیس در انسان و ماکیان مشترک هستند و بنابراین ماکیان می توانند نقش مهمی در ابتلا انسان به عفونت های سالمونلوزیس داشته باشند (۱۴).

مقدم و همکاران در مقاله خود این گونه آوردند که سالمونلاها از باکتری های مهم خانواده انتروباکتریاسه بوده که از نظر بیوشیمیایی و سرولوژیک بسیار متنوع می باشند و عمدتاً از راه مواد غذایی منتقل می شوند. گسترش سالمونلاهای غیر تیفوئیدی یکی از مهم ترین موضوعات قابل بررسی در تحقیقات امروزی می باشد. بنابراین تشخیص و تایپینگ سریع این بیماری زاها اطلاعات مناسبی در ردیابی و کنترل عفونت در اختیار می دهد. هدف از این مطالعه تایپینگ سویه های بالینی سالمونلا/اینفنتیس می بود. در این پژوهش از مراکز درمانی مختلف سویه های سالمونلا/اینفنتیس جداسازی شد. تمامی سویه ها با استفاده از روش های استاندارد

^۱Multi-locus sequence typing

^۲Kang

^۳Gong

^۴Fimbrial

^۵Chang

میکروبیولوژی، بیوشیمیایی و مولکولی مورد شناسایی قرار گرفتند. رابطه ژنتیکی سویه‌ها با استفاده از روش ERIC-PCR مورد بررسی قرار گرفت. یافته‌های آن‌ها به این صورت بود که از مجموع ۸۴۲ نمونه مدفوع و خون بیماران مبتلا به اسهال، ۴۸ سویه مربوط به *سالمونلا*/اینفنتیس جداسازی شد. جدایه‌ها با استفاده از روش ERIC-PCR از نظر ژنوتایپینگ به ۱۴ گروه مختلف دسته‌بندی شدند که بیشترین تعداد سویه در گروه ۵ (۲۰ درصد، ۱۰ سویه) جای گرفتند. نتایج این مطالعه نشان داد که سویه‌های *سالمونلا*/اینفنتیس مورد مطالعه از نظر ژنتیکی متنوع بودند که می‌تواند به علت شیوع پلی کلونال سویه‌ها در نمونه‌های انسانی باشد. همچنین نشان داده شد که روش ERIC-PCR قدرت تمایزی بالایی را جهت تایپینگ مولکولی دارد (۱۵).

گزارشیه و همکاران به بررسی مقایسه پلی‌مورفیسم ژنومی و ارتباط ژنتیکی سویه‌های بالینی *سالمونلا*/انتریکا سرووار تیفی موریوم در استان کرمان به روش ERIC-PCR و Box-PCR پرداختند. *سالمونلا*/انتریکا سرووار تیفی موریوم علاوه بر انسان، میزبان‌های زیادی داشته و امکان شیوع آن در جامعه بالاست. 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) ERIC-PCR و ۲۱ کلاستر مختلف در BOX-PCR شناسایی شد. 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 (۱۶).

الیورا^{۱۲} و همکارانش در سال ۲۰۰۷، تعداد ۱۰۲ سویه از *سالمونلا*/انتریتیدیس را با روش ERIC-PCR مورد مطالعه قرار دادند و نتایج این مطالعه نشان داد که با استفاده از روش ERIC-PCR سویه‌ها دارای ۳ الگوی ژنتیکی هستند و اندازه باندهای ERIC-PCR بین ۱۹۰ تا ۱۴۳۰ بود و تعداد باندها بین ۱۲ تا ۱۳ تا بود (Oliveira et al, 2007). مادانلا^{۱۳} و همکاران در پرتغال ۶۹ سویه از *سالمونلا* را با روش ERIC-PCR مورد بررسی و مطالعه تایپینگ مولکولی قرار دادند و نشان دادند که این روش کاربردی می‌باشد (۱۱). ناس^{۱۴} و همکاران در هند تعداد ۱۱۳ سویه *سالمونلا* را توسط ERIC-PCR تایپ بندی کردند. با استفاده از این روش دو الگوی ژنتیکی و دو کلون متفاوت در میان سویه‌ها شناسایی شد (۱۸).

نتیجه گیری

انتخاب یک تکنیک ژنوتایپینگ به سطح مهارت کاربران و امکانات آزمایشگاه و نیز به هدف بررسی وابسته است. در بررسی حاضر از تکنیک RAPD-PCR جهت دسته بندی ژنتیکی ایزوله‌های *سالمونلا*/انتریتیدیس به عنوان یکی از مهم‌ترین و شایع‌ترین سویه‌های میکروارگانیسم‌های پاتوژن استفاده شد و قرار گرفتن ایزوله‌های مورد مطالعه در چندین زیرگروه نشانگر قدرت تمایزدهی قابل قبول این تکنیک در ژنوتایپینگ باکتری می‌باشد (۱۹).

^{۱۲}Nath

^{۱۳}Oliviera

^{۱۴}Madalena

مراجع

1. Rasschaert G, Houf K, Imberechts H, Grijspeerdt K, DeZutter L, Heyndrickx M. Comparison of five repetitive sequence-based PCR typing methods for molecular discrimination of *Salmonella enterica* isolates. J Clin Microbiol. 2005; 43:3615–3623.
2. Crump JA, Luby SP, Mintz ED. The global burden of typhoid fever. Bull World Health Organ. 2004; 82: 346–353.
3. Johnson JR, Clabots C, Azar M. Molecular analysis of hospital cafeteria-associated salmonellosis outbreak using modified repetitive element PCR fingerprinting. J Microbiol. 2001; 39 (10):3452–3460.
4. Karns JS, Van Kessel JS, McCluskey BJ and Perdue M.L. Prevalence of *Salmonella enterica* in Bulk Tank Milk from US Dairies as Determined by Polymerase Chain Reaction. J Dairy Sci. 2005; 88: 3475–3479.
5. Lampel KA, Keasler SP, Hanes DE. Specific detection of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis using the polymerase chain reaction. Epidemiol Infect. 1996; 116: 137-145.
6. Albufera U, Bhugaloo-Vial P, Issack M, Jauferally-Fakim Y. Molecular characterization of *Salmonella* isolates by REP-PCR and RAPD analysis. Infect. Genet Evol. 2009; 9 (3):322-327.
7. Sangari P, Amini K, Moradli GH. Evaluation of genetic diversity of *Salmonella enterica* serovar enteritidis isolated from human and animals samples by eric-pcr. J Urmia Univ Med Sci. 2016; 27 (5): PP. 411- 418.
8. Ogunremi D, Kelly H, Dupras AA, Belanger S, Devenish J. Development of a new molecular subtyping tool for *Salmonella enterica* serovar Enteritidis based on single nucleotide polymorphism genotyping using PCR. J Clin Microbiol. 2014; 52(12):4275-4285.
9. رنجبر ر، ناغونی ع. مقاومت پادزیستی مرتبط با اینتگرون کلاس ۱ در ایزوله های بالینی *سالمونلا* / *انتريکا*. مجله میکروب شناسی پزشکی ایران. ۱۳۹۲: ۷ (۴): ۲۳-۱۶.
10. Saxena MK, Singh VP, Lakhcharua BD, Sharma B. Strain differentiation of Indian isolates of *Salmonella* by ERIC-PCR. J Res Vet Sci. 2002; 73:313- 314.
11. Madalena VP, Mario G, Rogerio T, Concelicao M. Evaluation of PCR-based fingerprinting comparatively to the RFLP-PFGE for discrimination of *Salmonella* sp. Isolated from slaughtered pork polymerase chain reaction identification of *Salmonella* serotypes. J Food Drug Analys. 2008; 16: 88-95.
12. Gong J, Zhang J, Xu M, Zhu C, Yu Y, Liu X. Prevalence and fimbrial genotype distribution of poultry *Salmonella* isolates in China (2006 to 2012). Appl Environment Microbiol. 2014; 80(2):687-693.
13. Chang YC, Scaria J, Ibrahim M, Doiphode S, Chang YF, Sultan A. Distribution and factors associated with *Salmonella enterica* genotypes in a diverse population of humans and animals in Qatar using multi-locus sequence typing (MLST). J Infect Public Health. 2016; 9(3):315-323.
14. Kang MS, Lee D.Y, Jeong OM, Choi BK. Public health significance of major genotypes of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis present in both human and chicken isolates in Korea. Res Vet Sci. 2017; 112:125-112131.
15. Moghadam A, Nazarian S. Molecular Typing Isolates of *Salmonella Enterica* Serovar Infantis Using Eric-PCR Method. Iran South Med J. 2017; 20 (5):426-436.

16. 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. SSU-Journals. 2017; 25(7): 564-571.
17. Oliveira SD, Bessa MC, Santos LR, Cardoso MR, Brandelli AC, Canal CW. Phenotypic and genotypic characterization of *Salmonella enteritidis* isolates. Braz J Microbiol. 2007; 38:720-728.
18. 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): 530-536.
19. Mezal EH, Sabol A, Khan MA, Ali N, Stefanova R, Khan AA. Isolation and molecular characterization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis from poultry house and clinical samples during 2010. Food Microbiol. 2014; 3867-3874.

Genotyping of isolated *Salmonella enteritidis* separated from foodstuffs by RAPD-PCR

Fatemeh Parsa¹, Manouchehr Momeni Shahraki^{2*}, Fatemeh Khodaverdipour²

1.Department of Biology, ShK.C., Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

2.Research Center of Nutrition and Organic Products (R.C.N.O.P), ShK.C., Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

***Corresponding author:** *m.momeni@iau.ir*

Abstract

Salmonellosis is a common disease in humans and animals. One of the most important pathogens in humans, livestock and poultry is *Salmonella enteritidis*, a common cause of foodborne diseases. Conventional culture, biochemical and serological methods have shown little value for molecular analysis and subtraction, but molecular typing techniques such as RAPD-PCR provide different patterns for differentiating *Salmonella* species. The purpose of this study was to differentiate and distinguish between isolates of *Salmonella enteritidis* by RAPD-PCR. In 2018, 350 samples of red meat and chicken, vegetable, salad dressing and salad dressing were collected from Shahrekord's food and grocery centers. In the shortest possible time and in sterile conditions, the microbiology laboratory of Shahrekord Islamic Azad University It was transmitted. PCR isolation and confirmation were used to genotype isolates of *Salmonella enteritidis* using RDPD-PCR primer P1254 CCGCAGCCAA primer. 28 isolates of *Salmonella enteritidis* were isolated. At the level of similarity, 52% of the isolates studied had 17 subtypes with a similarity level of 76%. The number of subgroups was 24 subgroups, and the number of subgroups increased 95% to 15 subgroups, indicating a high genetic diversity among the isolates studied. In this way, 30 isolates are studied in 24 profiles

Key words: *Salmonella enteritidis*, Genotyping, RAPD-PCR.