مجلـه‌ی علمـی، پژوهشـی دانشـگاه علـوم پزشـکی زنجـان
دوره‌ی ۲۰، شماره‌ی ۸۱، مهر و آبان ۱۳۹۱، صفحات ۷۵ تا ۸۴

بررسی تنوع ژنوتیپی سویه‌های بالینی سالمونلا انتریکا سروتایپ اینفنتیس به روش ریبوتایپینگ

دکتر رضا رنجبر[۱]، میثم سرشار[۲]، دکتر نورخدا صادقی فرد[۳]

نویسنده‌ی مسول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا... (عج)، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی ranjbar@bmsu.ac.ir

دریافت: ۹۰/۱۰/۱۹ پذیرش: ۹۱/۳/۸

چکیده

زمینه و هدف: *باکتری سالمونلا یک پاتوژن روده‌ای با توزیعی گسترده در سراسر جهان است که شامل تعداد زیادی سروتیپ و میزبان‌های متعددی می‌باشد و به‌عنوان یکی از شایع‌ترین علل عفونت باکتریایی منتقله از طریق غذا در انسان است. در میان سروتیپ‌های سالمونلا انتریکا، شیوع عفونت‌های ناشی از سروتیپ اینفنتیس به طور معناداری افزایش یافته است. هدف از این مطالعه، بررسی تنوع ژنوتیپ‌های سویه‌های سالمونلا انتریکا سروتیپ اینفنتیس در تهران با استفاده از روش ریبوتایپینگ بود.*

روش بررسی: *این مطالعه به صورت توصیفی- مقطعی از آذر ۱۳۸۶ الی دی ۱۳۸۹ بر روی سویه‌های سالمونلا انتریکا سروتیپ اینفنتیس جدا شده از بیمارانی که به چند بیمارستان شهر تهران مراجعه کرده بودند، انجام گردید. پس از شناسایی سویه‌های سالمونلا با استفاده از روش‌های استاندارد بیوشمیایی و باکتریولوژیکی در نهایت از روش ریبوتایپینگ جهت تایپینگ مولکولی سویه‌های سالمونلا انتریکا سروتیپ اینفنتیس استفاده گردید.*

یافته‌ها: *نتایج به‌دست آمده نشان داد که از میان ۲۶ ایزوله متعلق به سروگروه C سالمونلا، ۱۹ ایزوله (۷۳ درصد) متعلق به سالمونلا انتریکا سروتایپ اینفنتیس بود. ایزوله‌های متعلق به این سروتیپ مورد بررسی بیشتر مولکولی قرار گرفتند. ریبوتایپینگ توانست ایزوله‌های متعلق به این گروه را به ۹ دسته 1c تا 9c مختلف تقسیم نماید. در این سروگروه بیشترین تعداد سویه (۷ مورد) در دسته 1c قرار گرفت.*

نتیجه‌گیری: *نتایج نشان دهنده‌ی وجود ریبوتیپ‌های مختلف در میان بیماران تحت بررسی بود. بنابراین سویه‌های سالمونلا انتریکا سروتیپ اینفنتیس در این مطالعه از چندین کلون مختلف تشکیل شده‌اند. همچنین نتایج نشان داد که روش ریبوتایپینگ قدرت تمایزی مناسبی برای تایپینگ مولکولی سویه‌های سالمونلا انتریکا سروتیپ اینفنتیس دارد.*

واژگان کلیدی: ***عفونت‌های روده‌ای، سالمونلا انتریکا سروتیپ اینفنتیس، ریبوتایپینگ***

مقدمه

باکتری سالمونلا، یک پاتوژن روده‌ای با توزیعی گسترده در سراسر جهان است که یکی از مهمترین عوامل باکتریایی منتقله از طریق غذا محسوب می‌گردد. این میکروارگانیسم یکی از علل اصلی بیماری‌های روده‌ای در انسان و حیوانات (۴-۱) و همچنین عامل اصلی اتیولوژی بیماری‌های شدید سیستمیک، مانند تب حصبه و شبه حصبه می‌باشد (۷-۵ و۳).

۱- دکترای باکتری شناسی پزشکی، دانشیار مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)

۲- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)

۳- دکترای باکتری شناسی پزشکی، دانشیار مرکز تحقیقات میکروب شناسی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام

سالانه ۱۶ میلیون مورد تب تیفوئید، ۱/۳ میلیارد مورد گاستروآنتریت و ۳ میلیون مرگ در سراسر جهان در نتیجه‌ی سالمونلا به وجود می‌آید (۸). سالمونلاهای غیرتیفوئیدی (NTS) یک بیماری مشترک بین انسان و دام می‌باشند و آب و مواد غذایی آلوده به این باکتری، از دلایل اصلی ابتلا به بیماری در انسان است. این میکروارگانیسم‌ها می‌توانند از محیط‌های آبی به طور مستقیم با مدفوع انسان و یا حیوانات در تماس باشند و یا به طور غیرمستقیم از طریق فاضلاب و یا زمین‌های کشاورزی باعث آلودگی گردند. با توجه به اینکه بیماری‌های ایجاد شده توسط سروتیپ‌های غیر تیفوئیدی سالمونلا معمولاً خود به خود محدود شونده می‌باشند، می‌توانند در مواردی خاص مانند بیماران دارای نقص‌ایمنی و در صورت عدم درمان مناسب، باعث بیماری‌های شدید سیستمیک مانند استئومیلیت، پنومونی و منتژیت در انسان شوند (۴-۱).

در کشورهای صنعتی، سالمونلا انتریکا سروار انتریدیتیس و تیفی موریوم از عوامل اصلی عفونت‌های سالمونلاهای غیرتیفوئیدی به‌شمار می‌روند. با این وجود، گزارشات منتشر شده در برخی از کشورها، از جمله مجارستان و استرالیا حاکی از انتشار بالای سروارهای اینفنتیس در سال‌های اخیر، نسبت به گذشته می‌باشد (۱۰ و۹). به‌طور مثال، در سال‌های ۲۰۰۵ و ۲۰۰۶، عفونت‌های سالمونلوز باعث حدود ۸ الی ۹ هزار مورد بیماری در مجارستان گردید. شایع‌ترین سروتیپ‌ها، سالمونلا انتریتیدیس و اینفنتیس بودند که روی هم حدود ۹۰ درصد از موارد گزارش شده را شامل شدند. در این سال‌ها، سروتیپ اینفنتیس به‌عنوان یکی از شایع‌ترین سروارها و مسوول حدود ۵ درصد از بیماری‌های ایجاد شده بود (۱۱). نتایج مطالعات گال مور و همکاران در سال ۲۰۱۰ در فلسطین اشغالی نشان می‌دهد که از سال ۲۰۰۶ شیوع سالمونلاهای غیر تیفوئیدی به‌طور ناگهانی افزایش یافته است. این میزان در سال ۲۰۰۹ به ۴۴ مورد در هر ۱۰۰ هزار نفر رسیده است. مطالعه‌ی این گروه نشان داد که در این کشور شیوع سالمونلا انتریکا سروتیپ اینفنتیس از ۱/۲ مورد در سال ۲۰۰۱ به حدود ۱۴/۷ مورد در هر ۱۰۰ هزار نفر در سال ۲۰۰۹ رسیده که افزایشی دوازده برابری داشته است (۱۲). شیوع این سروتیپ در بیمارستان‌ها، عمدتاً در بین کودکان مشاهده می‌گردد، با این وجود در بزرگسالان گاهی اوقات با علایم سپتی سمی و کشنده نیز ظاهر می‌گردد. پایداری طولانی مدت در شرایط محیطی بیمارستانی، از ویژگی‌های بارز سالمونلا سروتیپ اینفنتیس می‌باشد (۹ و۸). روش‌های ژنوتایپینگ مورد استفاده جهت افتراق کلون‌ها و سویه‌های سالمونلا عمدتاً عبارتند از، بیوتایپینگ، فاژتایپینگ، آزمون‌های حساسیت ضد میکروبی، آنالیز پروفایل پلاسمیدی، آنزیم‌های اندونوکلئاز برش دهنده، ژل الکتروفورز میدان پالسی (PFGE)، ریبوتایپینگ، PCR توالی‌های پالیندرومیک تکراری (REP)، PCR توالی‌های داخل ژنی تکراری(ERIC PCR)، پلی‌مورفیسم طولی قطعات محدود کننده (RFLP) از ژن‌های *16S rDNA* و توالی درج شونده‌ی IS200. در این میان ریبوتایپینگ در اکثر مطالعات انجام شده به‌عنوان یکی از روش‌های مناسب ژنوتایپینگ در افتراق دهی سویه‌های سالمونلا انتریکا می‌باشد (۱۵-۱۳). این روش که مبتنی بر ساترن بلاتینگ می‌باشد، به دلیل توانایی بررسی ارتباط ژنتیکی میان ایزوله‌های باکتریایی بر اساس تفاوت در ژن‌های *rRNA* از اهمیت بالایی برخوردار است. ریبوتایپینگ با قدرت تکرار پذیری بالا از روش‌های کارآمد مولکولی در شناسایی و طبقه بندی باکتری‌ها تا حد گونه و سروتیپ می‌باشد. قدرت تمایز این روش وابسته به تعداد کپی عناصر ژنتیکی هدف در ژنوم باکتری و پراکندگی آن‌ها در میان قطعات محدودکننده است (۱۷- ۱۵). هدف از این مطالعه، بررسی تنوع ژنوتیپ‌های سویه‌های سالمونلا انتریکا سروتیپ اینفنتیس در تهران با استفاده از روش ریبوتایپینگ بود.

روش بررسی

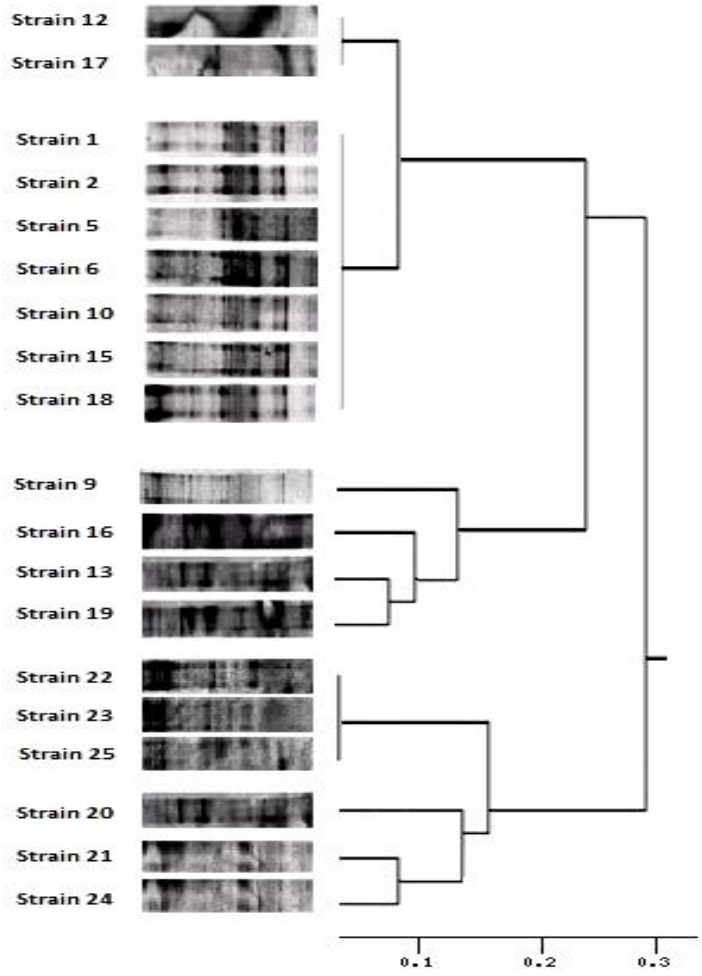
در یک مطالعه‌ی توصیفی، از آذر ۱۳۸۶ لغایت دی‌ماه ۱۳۸۹ طبق روش استاندارد مجموع ۶۵۰ نمونه‌ی بالینی از جمله مدفوع، خون و ادرار، از بیماران مشکوک به عفونت با سالمونلا از بیمارستان‌های مرکز طبی کودکان و بیمارستان بقیه‌الله الاعظم، در تهران جمع‌آوری گردید. معیار ورود به مطالعه جهت بیماران مشکوک به عفونت سالمونلا، شامل وجود علایمی همچون، دل درد، اسهال، استفراغ و تب بودند. نمونه‌های اخذ شده از این بیماران بر روی محیط‌های کشت اختصاصی و افتراقی مانند XLD (Xylose Lysine Deoxycholate Agar) Agar و SS Agar (Salmonella Shigella Agar) کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سلسیوس قرار داده شد. کلونی‌های مشکوک به سالمونلا به محیط کشت سلنیت F انتقال و سپس توسط تست‌ها و محیط‌های افتراقی نظیر TSI، MRVP، اوره، لیزین آیرون آگار و سیمون سیترات، جداسازی و مورد تایید قرار گرفتند. سروتایپینگ با استفاده از آنتی سرم O و H بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده (مرک، آلمان) بر پایه‌ی اسلاید آگلوتیناسیون مورد استفاده قرار گرفت. استخراج DNA از ایزوله‌های سالمونلا به روش فنل- کلروفرم صورت پذیرفت (۱۹و۱۸). ریبوتایپینگ مطابق استانداردهای لازم انجام شد (۲۰). انتهای ′5 پروب‌های سفارش داده شده با مولکول دیگوکسی ژنین نشاندار شدند. در جدول ۱ مشخصات پروب‌های الیگونوکلئوتیدی نشان داده شده است. هضم DNA توسط آنزیم محدود کننده‌ی *PstI* انجام گردید. الکتروفورز ژنوم هضم شده ایزوله‌ها در ژل آگارز ۱ درصد صورت پذیرفت و به محلول حاوی TE منتقل گردید. پس از ۱۸ تا ۲۰ ساعت، ژل برای رنگ‌آمیزی داخل اتیدیوم بروماید قرار داده شد. ژل دو بار، هر بار به مدت ۱۵ دقیقه در آب مقطر شسته شد. پس از شستشو، غشا بر روی دستگاه وکیوم بلاتینگ قرار داده شد. عمل انتقال ژل به غشای نایلونی در محدوده‌ی فشار خلا ۴۰- تا ۲۰- در دستگاه خلا صورت گرفت. سپس تثبیت ژنوم منتقل شده بر روی غشای نایلونی در دمای ۱۲۰ درجه‌ی سلسیوس با استفاده از فور انجام گردید. غشای نایلونی محلول هیبریداسیون درون دستگاه هیبریداسیون در ۶۸ سلسیوس به مدت ۱ ساعت انکوبه شد. از پروب‌های مورد استفاده که انتهای ′5 آن‌ها با مولکول دیگوکسی ژنین نشاندار گردیدند، غلظت‌های مختلف تهیه کرده و به محلول هیبریداسیون انتقال داده شد. پس از ۱۲ ساعت انکوباسیون در دمای ۵۵ درجه‌ی سلسیوس، جهت کاهش واکنش‌های غیراختصاصی و حذف پروب‌های منتقل نشده، غشاها ۴ بار به‌وسیله محلول شستشو حاوی (0.25X- SSC-01% SDS) هر بار به مدت ۵ دقیقه شستشو گردید. غشاهای آماده شده به مدت ۳۰ دقیقه در بافر متوقف کننده (Blocking Solution) قرار داده شد و سپس به آن آنتی‌بادی نشاندار شده و واجد آنزیم آلکالین فسفاتاز اضافه کرده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه‌ی انکوبه گردید. سپس محلول رنگزای NBT-BCIP را به ظرف حاوی غشاها اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در محیطی تاریک قرار داده شد. غشاهای نایلونی دو بار با آب مقطر شتشو و نهایتاً نتایج حاصل از هیبریداسیون مشاهده گردید (۲۱). مواد مورد نیاز جهت انجام ریبوتایپینگ از شرکت (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Germany) تهیه شد.

جدول ۱: مشخصات پروب‌های الیگونوکلئوتیدی

سکانس هدف	نام پروب	اندازه‌ی توالی	جایگاه ژنی
rrs	Ad	20	08-28
rrs	rB	19	1408-1390
rrl	O4c	23	442- 466
rrl	O16	23	1601-1623
rrl	O24c	21	2490-2512

یافته ها

از مجموع کشت اولیه‌ی ۶۵۰ نمونه‌ی مدفوع، خون و ادرار از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان‌های مرکز طبی کودکان و بیمارستان بقیه الله، در نهایت با استفاده از آزمون‌های سروتایپینگ، ۶۸ ایزوله سالمونلا انتریکا (با شیوع ۱۰/۵ درصدی) جداسازی شد. از مجموع بیماران مبتلا به سالمونلا، ۴۰ مورد (۵۹ درصد) مربوط به جنس مذکر و ۲۸ مورد (۴۱ درصد) مربوط به جنس مونث بودند. از مجموع ۶۸ ایزوله جدا شده از میان بیماران، ۲۹ ایزوله متعلق به سروگروه D سالمونلا، ۱۳ ایزوله متعلق به سروگروه B سالمونلا و ۲۶ ایزوله مربوط به سروگروه C سالمونلا بود که در نهایت نمونه های مربوط به سروگروه C سالمونلا وارد مطالعه گردید. در میان ایزوله‌های متعلق به سروگروه C، ۱۹ ایزوله (۷۳ درصد) متعلق به سروتیپ اینفنتیس، ۳ ایزوله (۱۱/۵ درصد) متعلق به سروتایپ Muenchen و مابقی متعلق به سروتایپ‌های Hadar، Newport، Albany و Kentucky بودند. در جداول شماره ۲ نوع نمونه به تفکیک هر ایزوله باکتریایی نشان داده شده است. الگوی باندی حاصل از برش توسط آنزیم *PstI* در تمامی ایزوله‌ها دارای اندازه‌ای مابین ۱/۴ و ۱۶/۸ کیلو باز بود. همانگونه که در شکل ۱ نشان داده شده است، ریبوتایپینگ توانست مجموع ۱۹ ایزوله متعلق به سروتایپ اینفنتیس را به ۹ گروه ریبوتایپی مختلف (1c الی 9c) تقسیم نماید.



شکل ۱: دندروگرام سروتایپ های سالمونلا اینفنتیس و نتایج حاصل از ریبوتایپینگ

این دسته‌ها بر اساس الگوی باندها (تعداد، اندازه و محل قرارگیری آن‌ها) به‌طور دلخواه بنام‌های 1c تا 9c دسته‌بندی شدند. بیشترین تعداد سویه (۷ مورد) در دسته‌ی 1c قرار داشت. نتایج کامل دسته بندی ایزوله‌های متعلق به سروگروه C سالمونلا انتریکا در جدول ۲ نمایش داده شده است.

جدول ۲: مشخصات ریبوتایپ‌های سالمونلا انتریکا سروتیپ اینفنتیس جدا شده از بیماران

کد ایزوله	محل جداسازی	جنسیت	الگوی ریبوتایپ	نوع نمونه
۱	مرکز طبی کودکان	مذکر	1c	مدفوع
۲	مرکز طبی کودکان	مذکر	1c	مدفوع
۳	بقیه الله	مذکر	Hadar	ادرار
۴	بقیه الله	مذکر	Muenchen	ادرار
۵	بقیه الله	مذکر	1c	مدفوع
۶	مرکز طبی کودکان	مونث	1c	خون
۷	مرکز طبی کودکان	مذکر	Muenchen	مدفوع
۸	بقیه الله	مونث	Newport	مدفوع
۹	مرکز طبی کودکان	مذکر	2c	مدفوع
۱۰	مرکز طبی کودکان	مذکر	1c	مدفوع
۱۱	مرکز طبی کودکان	مذکر	Kentucky	خون
۱۲	بقیه الله	مونث	4c	مدفوع
۱۳	مرکز طبی کودکان	مذکر	5c	خون
۱۴	بقیه الله	مذکر	Muenchen	ادرار
۱۵	بقیه الله	مذکر	1c	مدفوع
۱۶	مرکز طبی کودکان	مونث	3c	خون
۱۷	مرکز طبی کودکان	مذکر	4c	مدفوع
۱۸	بقیه الله	مذکر	1c	ادرار
۱۹	بقیه الله	مذکر	5c	مدفوع
۲۰	مرکز طبی کودکان	مونث	7c	خون
۲۱	مرکز طبی کودکان	مذکر	8c	مدفوع
۲۲	مرکز طبی کودکان	مذکر	6c	مدفوع
۲۳	مرکز طبی کودکان	مذکر	6c	مدفوع
۲۴	مرکز طبی کودکان	مونث	9c	خون
۲۵	مرکز طبی کودکان	مذکر	6c	مدفوع
۲۶	مرکز طبی کودکان	مونث	Albany	مدفوع

بحث

در سال‌های اخیر، شیوع بیماری‌های ناشی از مواد غذایی افزایش یافته و این مساله به یک نگرانی بزرگ در کشورهای صنعتی تبدیل گردیده است. در میان پاتوژن‌های باکتریایی، سالمونلا یکی از شایع‌ترین موارد باکتریایی منتقله از طریق غذا می‌باشد. سالمونلوز یکی از مهم‌ترین بیماری‌های ایجاد شده توسط سروتیپ‌های غیر تیفوئیدی سالمونلا می‌باشد که باعث میلیون‌ها مورد بیماری انسانی و حیوانی و همچنین خسارات اقتصادی قابل توجهی در سراسر جهان می‌باشد (۲۴-۲۲ و ۱۱). در مطالعه‌ی حاضر، از مجموع ۶۸ ایزوله سالمونلا انتریکای جدا شده از بیماران، ۲۶ ایزوله مربوط به سروگروه C سالمونلا بود. نتایج نشان داد از این تعداد، ۱۹ ایزوله متعلق به سالمونلا سروتایپ اینفنتیس، که پس از سروتیپ انتریتیدیس بیشترین فراوانی را در میان بیماران تحت بررسی دارا بود. در سال ۲۰۰۳ در آرژانتین، سالمونلا انتریکا سروار اینفنتیس دومین عامل شایع در میان سروتیپ‌های سالمونلا در میان کودکان بستری شده در بیمارستان بود (۱۷). در مصر در سال ۲۰۰۹ از مجموع ۱۰۵ ایزوله سالمونلا جدا شده از نمونه‌های مواد غذایی ۲۵ ایزوله مربوط به سالمونلا سروتیپ اینفنتیس بود که نسبت به سایر سروتیپ‌های سالمونلا بیشترین موارد جدا شده از نمونه‌های مواد غذایی بود (۲۵). همچنین گزارشات منتشر شده در سال ۲۰۰۴ نشان می‌دهد که سروتایپ اینفنتیس به‌عنوان سومین سروتیپ شایع در میان سایر سروتیپ‌های سالمونلا در مجارستان به‌شمار می‌رود، به‌طوری‌که طی سال‌های ۲۰۰۴ الی ۲۰۰۵، ۱۳۲ مورد ایزوله سالمونلا اینفنتیس با منشا انسانی از نمونه‌های مدفوعی در کشور مجارستان جمع‌آوری و تشخیص داده شد (۲۶). دسترسی به اطلاعات دقیق و صحیح مربوط به بررسی شیوع سالمونلا اینفنتیس، بسیار حیاتی می‌باشد. تکنیک‌های مناسب و کارآمدی در تایپینگ سالمونلا انتریکا در نظارت بر منابع و مسیرهای عفونت مورد نیاز است. در بسیاری از مطالعات انجام شده به مزایای استفاده از فاژ تایپینگ و آنالیز الگوی پلاسمیدی که سرعت بالا و کم هزینه بودن آن‌ها است، اشاره شده است، اما این روش‌ها نیاز به تخصص ویژه‌ای برای تفسیر انواع فاژها و کنترل کیفیت دقیق معرف‌های بیولوژیک دارد. لذا به‌عنوان روش‌های مناسب و قابل اطمینانی در تایپینگ باکتری‌ها نمی‌باشند. با این وجود در بسیاری از مطالعات صورت گرفته، ریبوتایپینگ به‌عنوان یک تکنیک کارآمد و با قدرت افتراق دهی بالا پیشنهاد گردیده، مورد استفاده قرار گرفته شده است (۱۷و ۱۵-۱۳). نتایج به‌دست آمده در مطالعه‌ی حاضر نشان داد که ریبوتایپینگ قدرت تفکیک مناسبی جهت بررسی گوناگونی ژنتیکی سویه‌های سالمونلا انتریکا سروتیپ اینفنتیس دارد، زیرا ایزوله‌های متعلق به این گروه را به ۹ دسته مختلف تقسیم نمود. در این سروگروه بیشترین تعداد سویه (۷ مورد) در دسته 1c قرار داشت و ایزوله‌های دیگر این سروتایپ به ترتیب در دستجات 2c الی 9c قرار گرفتند.

در مطالعه‌ی لیندکویست و همکاران در سال ۲۰۰۷ در فنلاند که بر روی ۵۷ ایزوله سالمونلا اینفنتیس صورت گرفت، ۵ الگوی تایپینگ مختلف در ایزوله‌های تحت بررسی به‌دست آمد. نتایج ریبوتایپینگ ایزوله‌های به‌دست آمده نشان داد که از مجموع ۵۷ ایزوله جدا شده، ۵۱ ایزوله دارای یک الگوی ریبوتایپی واحد بودند. از میان ۵۱ ایزوله‌های سالمونلا اینفنتیس جدا شده که دارای یک الگوی ریبوتایپی مشترک بودند، ۲۵ ایزوله مربوط به سال‌های ۱۹۸۵ الی ۱۹۸۷، ۱۹ ایزوله در سال‌های ۱۹۹۲ الی ۱۹۹۵ و ۱۳ ایزوله در سال‌های ۱۹۹۲ الی ۲۰۰۲ از بیماران جدا شده بودند (۲۷). در مطالعه‌ای توسط لاگاتولا و همکاران در سال ۱۹۹۶ با استفاده از PCR-Ribo Typing گوناگونی ناحیه‌ی بین ژنی 16S-23S rRNA، ۲۱۸ ایزوله جدا شده در ایتالیا را طی سال‌های ۱۹۷۷ تا ۱۹۹۴ بررسی نمودند. نتایج به‌دست آمده نشان داد که این ناحیه بین ژنی در سروتیپ‌های انتریتیدیس و اینفنتیس

پلی‌مورفیسم بالایی دارد، به‌طوری‌که ریبوتایپینگ با قدرت تفکیکی بالا توانست به ترتیب ۸ و ۶ الگوی ریبوتایپی مختلف را در سروتیپ‌های انتریتیدیس و اینفیتیس نشان دهد (۲۸). چادفیلد و همکاران نیز در سال ۲۰۰۲ با استفاده از روش‌های پروفایل پلاسمیدی و ریبوتایپینگ به بررسی اپیدمیولوژی مولکولی ایزوله‌های سالمونلا انتریکا پرداختند. آن‌ها در این بررسی با استفاده از ریبوتایپینگ و آنزیم‌های برشی *EcoRI* و *HindIII* توانستند هفت الگوی مختلف ریبوتایپی را در میان سروتیپ‌های سالمونلای تحت بررسی به‌دست آورند که از این میان سروتیپ‌های سالمونلا انتریکا سروتیپ اینفنتیس دارای دو الگوی ریبوتایپی مختلف بودند (۲۹). بررسی ما نشان داد، روش ریبوتایپینگ قادر است الگوهای مختلفی را میان ایزوله‌های سالمونلا انتریکا سروتیپ اینفنتیس ایجاد نماید، به گونه‌ای که برخی از سروتیپ‌ها، واجد یک الگوی خاص ریبوتایپی بودند. با توجه به ۹ الگوی مختلف ریبوتایپی به‌دست آمده، نتایج نشان دهنده‌ی وجود کلون‌های مختلف ریبوتایپی در میان بیماران تحت بررسی می‌باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج حکایت از آن دارد که کلون‌های مختلف ژنتیکی از سالمونلا انتریکا سروتیپ اینفنتیس، عامل ایجاد عفونت سالمونلایی در میان بیماران تحت بررسی بوده است. همچنین مشخص گردید که روش ریبوتایپینگ از قدرت تمایزی مناسبی برای تایپینگ مولکولی سویه‌های سالمونلا انتریکا سروتیپ اینفنتیس برخوردار می‌باشد.

تقدیر و تشکر

این مقاله برگرفته از طرح تحقیقاتی انجام شده در مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) می‌باشد. بدینوسیله از همکاران آزمایشگاه، جناب آقای رضایی و سرکار خانم سفیری تشکر و قدردانی به‌عمل می‌آید.

References

1- 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: 38-42.

2- 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: 417-21.

3- Levantesi C, Bonadonna L, Briancesco R, Grohmann E, Toze S, Tandoi V. Salmonella in surface and drinking water: Occurrence and water-mediated transmission. *Food Res Int*. 2011: 16.

4- Nogrady N, Kardos G, Bistyak A, et al. Prevalence and characterization of *Salmonella infantis* isolates originating from different points of the broiler chicken–human food chain in Hungary. *Int J Food Microbiol*. 2008; 127: 162-7.

5- Irajian G, Ranjbar R, Jazayeri-Moghadas A. Detection of extended spectrum beta lactamase producing Salmonella spp. and multidrug resistance pattern. *Iranian J Pathol*. 2009; 4: 128-32.

6- Tsen HY, Lin JS, Hsih HY. Pulsed field gel electrophoresis for animal *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* isolates in Taiwan. *Vet Microbiol*. 2002; 87: 73-80.

7- Herikstad H, Motarjemi Y, Tauxe RV. Salmonella surveillance: a global survey of public health serotyping. *Epidemiol Infect*. 2002; 129: 1-8.

8- Pui CF, Wong WC, Chai LC, et al. Salmonella: A foodborne pathogen. *Int Food Res J*. 2011; 18: 465-73.

9- Miller T, Prager R, Rabsch W, Fehlhaber K, Voss M. Epidemiological relationship between *Salmonella Infantis* isolates of human and broiler origin. *Lohmann information*. 2010; 45: 27-31.

10- Ross IL, Heuzenroeder MW. A comparison of threemolecular typingmethods for the discrimination of *Salmonella enterica* serovar *Infantis*. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2008; 53: 375-84.

11- Dunowska M, Morley PS, Traub-Dargatz JL, et al. Comparison of *Salmonella enterica* serotype *Infantis* isolates from a veterinary teaching hospital. *J Appl Microbiol*. 2007; 102: 1527-36.

12- Gal-Mor O, Valinsky L, Weinberger M, et al. Multidrug Resistant *Salmonella enterica* Serovar *Infantis*, Israel. *Emerging Infectious Diseases*. 2010; 16: 1754-7.

13- Thong KL, Ngeow YF, Altwegg M, Navaratnam P, Pang T. Molecular analysis of *Salmonella enteritidis* by pulsed-field gel electrophoresis and ribotyping. *J Clin Microbiol*. 1995; 33: 1070-4.

14- Ridley AM, Threlfall EJ, Rowe B. Genotypic characterization of *Salmonella enteritidis* phage types by plasmid analysis, ribotyping, and pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol*. 1998; 36: 2314-21.

15- Grimont F, Grimont PA. Ribosomal ribonucleic acid gene restriction pattern as potential taxonomic tools. *Ann Inst Pasteur Microbiol*. 1986; 137B(2): 165-75.

16- Martins CHG, Santos WR, Castro FA, Fernandes SA, Martinez R. Ribotyping of *Salmonella Enteritidis* strains reveals the spread of a single genotype in the Brazilian city of Ribeirão Preto. *J Bras Patol Med Lab*. 2006; 1: 19-23.

17- Merino LA, Ronconi MC, Navia MM, et al. Analysis of the clonal relationship among clinical isolates of *Salmonella enterica* serovar *Infantis* by different typing methods. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2003; 45: 119-23.

18- Moradi A, Karami A, Hagh Nazari A, Ahmadi Z, Soroori Zanjani R, Javadi SM. Comparison of the PCR and LAMP techniques in the diagnosis of Salmonella infection. *J Zanjan Uni Med Sci*. 2009; 17: 65-77.

19- 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: 1138-40.

20- 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 Research Notes*. 2008; 1: 74.

21- 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: 426-30.

22- Amini K, Salehi T, Nikbakht Gh, Ranjbar R, Amini J, Ashrafganjooei ShB. 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.

23- 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: 547-53.

24- 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: 91-5.

25- Bouchrif B, Paglietti B, Murgia M, et al. Prevalence and antibiotic-resistance of Salmonella isolated from food in Morocco. *J Infect Dev Ctries.* 2009; 3: 35-40.

26- Nogrady N, Toth A, Kostyak A, Paszti J, Nagy B. Emergence of multidrug-resistant clones of *Salmonella Infantis* in broiler chickens and humans in Hungary. *J Antimicrob Chemother*. 2007; 60: 645-8.

27- Lindqvist N, Pelkonen S. Genetic surveillance of endemic bovine *Salmonella Infantis* infection. *Acta Vet Scand*. 2007; 49: 1-9.

28- Lagatolla C, Dolzani L, Tonin E, et al. PCR ribotyping for characterizing Salmonella isolates of different serotypes. *J Clin Microbiol*. 1996; 34: 2440-3.

29- Chadfield MS, Christensen JP, Madsen M, Sonne-Hansen J, Bisgaard M. Application of molecular methods for identification of strains classified as *Salmonella enterica* serovar 6, 7:-:- by conventional serotyping. *Avian Pathol*. 2002; 31: 271-6.

Characterization of Genetic Diversity among Clinical Strains of *Salmonella enterica* Serovar Infantis by Ribotyping Method

Ranjbar R1, Sarshar M1, Sadeghifard N2

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

[2]Clinical Microbiology Research Center, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, IR Iran

Corresponding Author: Ranjbar R, Molecular Biology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, IR Iran.

Email: ranjbar@bmsu.ac.ir

Received: 9 Jan 2012 **Accepted:** 28 May 2012

Background and Objective: *Salmonella* spp. are enteric pathogens with a worldwide distribution comprising a large number of serovars characterized by different hosts and distribution. Among *Salmonella* spp., the number of infections and diseases caused by the serotype *Salmonella enterica* serovar Infantis started to increase significantly in the last decade. The aim of this study was to investigate the genetic diversity of the clinical stains of *Salmonella enterica* serovar Infantis isolated in Tehran, Iran by using the Ribotyping method.

Materials and Methods: In this descriptive study from November 2007 to December 2010, clinical samples, collected from different hospitals in Tehran, were investigated for detection of *Salmonella enterica* serovar Infantis. Bacterial isolation and identification was achieved through biochemical and bacteriological methods. The Ribotyping technique was applied for the molecular typing of the strain of *Salmonella enterica* serovar Infantis.

Results: Out of the 26 *Salmonella* serogroup C samples isolated in this study, 19 strains (73%) belonged to *Salmonella enterica* serotype Infantis. Ribotyping results divided *Salmonella enterica* serovar Infantis stains into 9 clusters (1c to 9c). The majority (7) of the strains belonged to cluster 1c.

Conclusion: The results obtained from the Ribotyping patterns indicate that *Salmonella enterica* serovar Infantis strains, circulating among the patients in Tehran, belong to a diverse number of clones. Moreover, our data show that Ribotyping is an appropriate method for the molecular typing of *Salmonella enterica* serovar Infantis strains.

Keywords: Gastroenteritis, Salmonella enterica serovar infantis, Ribotyping