مجله دانشکده پزشکی اصفهان **مقاله پژوهشی**
سال سی‌ام/شماره ۱۸۰/هفته دوم اردیبهشت ماه ۱۳۹۱
تاریخ دریافت: ۹۰/۸/۲۵ **تاریخ پذیرش:** ۹۰/۱۱/۱۷

بررسی الگوهای ریبوتایپی سویه‌های سالمونلا انتریکا سروتایپ انتریتیدیس در نمونه‌های جدا شده از بیماران در تهران

دکتر رضا رنجبر[۱]، میثم سرشار[۲]، دکتر سعید مروتی[۱]

چکیده

مقدمه: باکتری سالمونلا انتریکا زیرگونه‌ی انتریکا سروتایپ انتریتیدیس مهم‌ترین عامل در ابتلا به بیماری سالمونلوز در انسان است. همچنان شیوع عفونت‌های سالمونلا انتریتیدیس به خصوص در دهه‌ی اخیر در حال افزایش است. هدف از این مطالعه، بررسی ریبوتایپ‌های سویه‌های سالمونلا انتریکا سروتایپ انتریتیدیس جدا شده از بیماران مشکوک به عفونت با این باکتری بستری شده در بیمارستان‌های تهران با استفاده از روش ریبوتایپینگ بود.

روش‌ها: در یک مطالعه‌ی توصیفی، از فروردین ۱۳۸۷ لغایت مرداد ماه ۱۳۸۹ طبق روش استاندارد ۶۵۰ نمونه‌ی بالینی از جمله مدفوع، خون، ادرار و غیره از بیماران مشکوک به عفونت با سالمونلا از برخی بیمارستان‌های تهران جمع‌آوری شد. از روش‌های استاندارد باکتریولوژیکی و سرولوژیکی جهت جداسازی و تعیین هویت ایزوله‌های باکتریایی استفاده گردید. در نهایت جهت تایپینگ ایزوله‌های جدا شده از روش ریبوتایپینگ استفاده شد.

یافته‌ها: تکنیک ریبوتایپینگ با استفاده از آنزیم برش دهنده‌ی PstI توانست تمام ایزوله‌های جدا شده‌ی سروتایپ انتریتیدیس را تایپ‌بندی نماید. الگوی باندی به دست آمده در تمامی ایزوله‌ها دارای اندازه‌ای بین ۱/۴ و ۱۶/۸ کیلوباز بود. در مجموع ۲۷ ایزوله متعلق به سروتایپ انتریتیدیس، به ۳ دسته‌ی 1d تا 3d دسته‌بندی شدند. بیشترین تعداد سویه (۲۰ مورد) در دسته‌ی 1d قرار داشت.

نتیجه‌گیری: نتایج به دست آمده در این تحقیق حکایت از آن داشت که سویه‌های در گردش سالمونلا انتریتیدیس در تهران، به طور عمده مربوط به یک ریبوتایپ می‌باشند.

واژگان کلیدی: سالمونلا انتریتیدیس، ریبوتایپینگ، سالمونلوز

مقدمه

باکتری‌های سالمونلا گروه بزرگی از ارگانیسم‌های روده‌ای را تشکیل می‌دهند که بیش از ۲۵۰۰ سروتایپ هستند و اکثر آن‌ها پاتوژن‌های بالقوه‌ای برای انسان می‌باشند (۴-۱). باکتری سالمونلا انتریکا زیرگونه‌ی انتریکا سروتایپ انتریتیدیس، مهم‌ترین عامل در ابتلا به بیماری سالمونلوز در انسان می‌باشد؛ به طوری که شیوع عفونت‌های سالمونلا انتریتیدیس به خصوص در دهه‌ی اخیر افزایش یافته است (۸-۵). این سروتایپ در طی چند سال گذشته به عنوان رایج‌ترین سرووار از سالمونلا در بسیاری از کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه از جمله در ایران شناخته می‌شود (۱۳-۹). وجود عفونت به دست آمده از این باکتری در طیور و بررسی انتشار آن به زنجیره‌ی غذایی انسانی، از طریق روش‌های تشخیص سریع این باکتری از فرآورده‌های حیوانی و بررسی تنوع ژنوتیپی و فنوتیپی در میان جدایه‌های تهیه شده از آن امکان‌پذیر است (۱۵-۱۴، ۸). فرد آلوده به باکتری سالمونلا با سروتایپ انتریتیدیس، اغلب مبتلا به تب، دردهای ماهیچه‌ای شکمی و اسهال می‌باشد. شروع این علایم از ۱۲ ساعت تا یک هفته پس از مصرف غذای آلوده ادامه دارد. این بیماری اغلب ۴ تا ۷ روز به طول می‌انجامد و بسیاری از افراد بدون

[۱] دانشیار، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا... (عج)، تهران، ایران
[۲] کارشناسی ارشد، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا... (عج)، تهران، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر رضا رنجبر
Email: ranjbar@bmsu.ac.ir

www.mui.ac.ir

درمان با آنتی‌بیوتیک بهبود می‌یابند. با این حال، اسهال می‌تواند شدید و گاهی اوقات منجر به بستری شدن افراد در بیمارستان گردد (۱۸-۱۶). در سال‌های اخیر الگوی آلودگی به سالمونلا از سالمونلا تیفی‌موریوم به سالمونلا انتریتیدیس تغییر یافته است؛ به طوری که سالمونلا انتریتیدیس به عنوان شایع‌ترین سروتایپ سالمونلا در میان عفونت‌های انسانی در کشورهای انگلستان و ولز گزارش شده است (۱۹).

در حال حاضر در بسیاری از کشورهای دنیا بررسی آلودگی به باکتری سالمونلا انتریتیدیس و تشخیص به موقع آن از آزمایشات مهم صنایع غذایی و مراکز کنترل بیماری‌ها محسوب می‌گردد. همچنین، در بسیاری از کشورهای در حال توسعه مانند برزیل، شیوع بیماری‌های ناشی از مواد غذایی و عفونت‌های بیمارستانی ناشی از سالمونلا انتریکا سروتایپ انتریتیدیس کماکان به عنوان یک مشکل مهم بهداشتی مطرح می‌باشد (۶).

روش تایپینگ باکتریایی که بر اساس بررسی‌های فنوتیپی و ژنوتیپی از یک سویه‌ی خاص، با هدف شناخت ویژگی‌های آن سویه صورت می‌گیرد، می‌تواند جهت اهداف مختلفی مانند بررسی اپیدمیولوژیک، تعیین عفونت مکرر، بررسی ارتباط میان سندرم‌های بالینی خاص و ویژگی‌های مکانیسم‌های بیماری‌زایی استفاده گردد.

نتایج مطالعات صورت گرفته نشان می‌دهد که باکتری سالمونلا انتریکا به دلیل داشتن هموژنیتی زیاد در میان سروتایپ‌ها، با استفاده از روش‌های فنوتایپی همچون بیوتایپینگ، فاژتایپینگ و غیره به سختی تایپ‌بندی می‌گردد (۲۰، ۱۵). همچنین روش‌های سنتی سروتایپینگ مانند خصوصیات بیوشیمیایی و سرولوژی میکروارگانیسم‌ها اغلب زمان‌بر، خسته‌کننده و پرهزینه می‌باشند و از لحاظ اپیدمیولوژیک دارای ارزش محدودی می‌باشند (۲۱، ۵). به علاوه قدرت افتراق‌دهی بین سویه‌هایی که ارتباط بسیار نزدیکی با هم دارند را ندارد، بنابراین مطالعات ژنوتیپی با قدرت تمایز بالا از اهمیت بیشتری برای تفریق سویه‌ای برخوردار می‌باشند (۲۲-۲۱). روش‌های ژنوتایپینگ مورد استفاده در تایپ‌بندی سالمونلا انتریتیدیس، شامل الگوی آنالیز پلاسمیدی، ریبوتایپینگ، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، پالسفیلد ژل الکتروفورز، توالی درج شونده و تکثیر قطعات تصادفی پلیمرفیک DNA می‌باشد که در این میان ریبوتایپینگ یک تکنیک قدرتمند و قابل اطمینان در افتراق سروتایپ‌های سالمونلا است (۲۳-۲۲، ۹).

ریبوتایپینگ که یک روش تایپ‌بندی بر اساس ژن‌های کدکننده‌ی RNA ریبوزومی باکتری می‌باشد از جمله روش‌های مولکولی نوین و دقیقی است که در بسیاری از مطالعات اپیدمیولوژیک به کار گرفته شده است (۲۴-۲۲). ریبوتایپینگ روش مناسبی است که می‌تواند به شناسایی و طبقه‌بندی باکتری‌ها بر اساس تفاوت در مولکول‌های rRNA بپردازد. این روش با تکرارپذیری و دقت بالایی که دارد قادر به طبقه‌بندی باکتری‌ها از سطح جنس و فراتر از آن تا حد گونه و سروتایپ می‌باشد (۶). بررسی خصوصیات اپیدمیولوژیکی سالمونلا به دلیل کمک به شناسایی ارتباط میان موارد بالینی و منابع احتمالی عفونت بسیار حایز اهمیت است.

محققان نشان داده‌اند که ریبوتایپینگ می‌تواند سروتایپ‌های مختلف سالمونلا را با توجه به منبع عفونت، صرف‌نظر از میزبان یا محل جغرافیایی افتراق دهد (۲۱، ۱۴، ۶). هدف از این مطالعه، بررسی

www.mui.ac.ir

اپیدمیولوژی مولکولی سویه‌های سالمونلا انتریکا سروتایپ انتریتیدیس جدا شده از بیماران مشکوک به عفونت با این باکتری بستری شده در بیمارستان‌های تهران با استفاده از روش ریبوتایپینگ بود.

روش‌ها

در یک مطالعه‌ی توصیفی، طی مدت ۲۸ ماه (از فروردین ۱۳۸۶ لغایت مرداد ماه ۱۳۸۸) طبق روش استاندارد مجموع ۶۵۰ نمونه‌ی بالینی از جمله مدفوع، خون و ادرار از بیماران مشکوک به عفونت با سالمونلا و دارای علایم گوارشی همچون مسمومیت و اختلالات معدی- روده‌ای، در برخی بیمارستان‌های تهران از جمله بیمارستان مرکز طبی کودکان، بیمارستان بقیه‌ا... الاعظم (عج) و برخی آزمایشگاه‌های مختلف در تهران جمع‌آوری گردید. از این تعداد ۲۷ ایزوله متعلق به سروگروه D سالمونلا بود که وارد مطالعه گردید.

در مورد هر نمونه اطلاعاتی مثل سن، جنس، تاریخ نمونه‌گیری، درجه‌ی حرارت و سابقه‌ی احتمالی ابتلا یا درمان، تعداد فرزندان، نوع تغذیه و محل سکونت بیماران مورد مطالعه، اخذ و ثبت گردید. نمونه‌های بیماران بلافاصله بعد از نمونه‌گیری در شرایط استریل به محیط آزمایشگاه منتقل گرید و در محیط‌های کشت غنی کننده مثل سلنیت F انتقال داده و به مدت ۱۲-۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد. نمونه‌های مدفوع کشت داده شده در محیط کشت سلنیت F بر روی محیط‌های اختصاصی و افتراقی مانند XLD agar (Xylose lysine deoxycholate agar) و SS agar (Salmonella and shigella agar) کشت گردید و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس، کلنی‌های مشکوک به سالمونلا با تست‌های بیوشیمیایی و محیط‌های افتراقی نظیر TSI، MRVP اوره، لیزین آیرون آگار، سیمون سیترات جداسازی و مورد تأیید قرار گرفت. آزمون سروتایپینگ جهت مشخص نمودن آنتی‌ژن O، H و Vi با آنتی‌سرم مربوط انجام گردید (تمامی محیط‌های فوق ساخت شرکت مرک آلمان بودند) (۲۵).

استخراج DNA: پس از جداسازی و تعیین هویت ایزوله‌های باکتریایی با استفاده از روش‌های استاندارد باکتریولوژیک و سرولوژیک، باکتری‌ها در محیط‌هایی نظیر BHI و LB براث کشت داده شدند. در نهایت با استفاده از روش فنل-کلروفرم، DNA ژنومیک از ایزوله‌ها طبق استاندارد استخراج شد. به طور خلاصه، سلول‌های باکتریایی در معرض EDTA و SDS ۵ درصد و آنزیم پروتئیناز K قرار داده شدند و سپس عمل استخراج توسط فنل-کلروفورم و ایزوآمیل الکل صورت گرفت (کلروفورم و ایزوآمیل الکل به نسبت ۲۵: ۲۴: ۱ مخلوط شدند) و DNA به وسیله‌ی سدیم استات و اتانل مطلق رسوب داده شد. پس از این مرحله، DNA با اتانول ۷۰ درصد شستشو و در دمای اتاق خشک گردید. در نهایت DNA به دست آمده در بافر TE حل شد (۲۶).

ریبوتایپینگ: عمل هضم آنزیمی ژنوم ایزوله‌های به دست آمده با استفاده از آنزیم Pst1 (Roche، آلمان) انجام گردید (۲۷). از باکتری CIP 105177 (Citrobacter koseri) به عنوان سویه‌ی استاندارد و مارکر مولکولی در ریبوتایپینگ استفاده گردید (۲۸). الکتروفورز ژنوم هضم شده‌ی ایزوله‌ها در ژل آگارز ۱ درصد صورت پذیرفت و به محلول حاوی TE منتقل گردید. غشای نایلونی با شارژ مثبت متناسب با اندازه‌ی ژل‌ها به عنوان بستر اتصال به ژل آماده گردید.

www.mui.ac.ir

عمل انتقال ژل به غشای نایلونی در محدوده‌ی فشار خلأ ۴۰- تا ۲۰- در دستگاه خلأ صورت گرفت. سپس تثبیت ژنوم منتقل شده بر روی غشای نایلونی در دمای ۱۲۰ درجه‌ی سانتی گراد با استفاده از فور انجام گردید. این غشاها به مدت ۱۰ دقیقه در آب مقطر قرار داده شد و سپس به وسیله‌ی کاغذ واتمن خشک گردید. از پروب‌های مورد استفاده که انتهای ′۵ آن‌ها با مولکول دیگوکسیژنین نشان‌دار گردیده بود، غلظت‌های مختلف تهیه و به محلول هیبریداسیون انتقال داده شد و به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۵۵ درجه‌ی سانتی‌گراد در دستگاه هیبریداسیون انکوبه گردید. در جدول ۱ توالی پروب های الیگونوکلئوتیدی نشان داده شده است.

در مرحله‌ی بعد جهت کاهش واکنش‌های غیر اختصاصی و حذف پروب‌های منتقل نشده، غشاها ۴ بار به وسیله‌ی محلول شستشوی حاوی SDS ۱ درصد، SSC و 0.25X هر بار به مدت ۵ دقیقه شستشو گردید. غشاهای آماده شده در مراحل قبل، ابتدا به مدت ۳۰ دقیقه در بافر متوقف کننده (Blocking solution) قرار داده شد. سپس به آن‌ها آنتی‌بادی نشان‌دار شده با دیگوکسیژنین و واجد آنزیم آلکالین فسفاتاز اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس محلول رنگ‌زای NBT-BCIP به ظرف حاوی غشاها اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در محیطی تاریک قرار گرفت. واکنش مذکور با اضافه کردن آب متوقف و نتایج حاصل از هیبریداسیون مشاهده گردید (۲۹-۲۸).

یافته‌ها

در طی این مطالعه، در مجموع به دنبال کشت اولیه‌ی ۶۵۰ نمونه‌ی مدفوع از بیماران اسهالی مراجعه کننده به چند بیمارستان در تهران، موفق به جداسازی ۶۸ سویه‌ی سالمونلا شدیم. از مجموع ۶۸ نمونه سالمونلای تأیید شده، ۳۰ مورد (۴۴ درصد) مربوط به مردان و ۲۴ مورد (۳۵ درصد) مربوط به زنان بود. از نظر توزیع نمونه‌ها قابل ذکر است که درصد بالایی (۸۷ درصد) از نمونه‌ها مدفوعی و مابقی آن‌ها نمونه‌های خون و ادرار بود.

از مجموع ۶۸ سویه جدا شده از میان بیماران، ۲۷ مورد مربوط به سروتایپ انتریتیدیس بود. نتایج کامل دسته‌بندی ایزوله‌های متعلق به سروتایپ انتریتیدیس و نوع نمونه‌ها به تفکیک هر ایزوله‌ی باکتریایی در جدول ۲ نشان داده شده است.

در میان نمونه‌های اخذ شده از بیماران بیمارستان‌های مرکز طبی کودکان و بقیه‌ا... (عج) با توجه به الگوی باندی به دست آمده، نتایج نشان دهنده‌ی ارتباط میان هر یک از سویه‌ها در هر یک از بیمارستان‌ها بود؛ به طوری که تمامی بیماران مراجعه کننده به بیمارستان بقیه‌ا... (عج) همگی دارای الگوی ریبوتایپ 1d بودند، اما در میان بیماران مراجعه کننده

جدول ۱. مشخصات پروب‌های مورد استفاده در ریبوتایپینگ

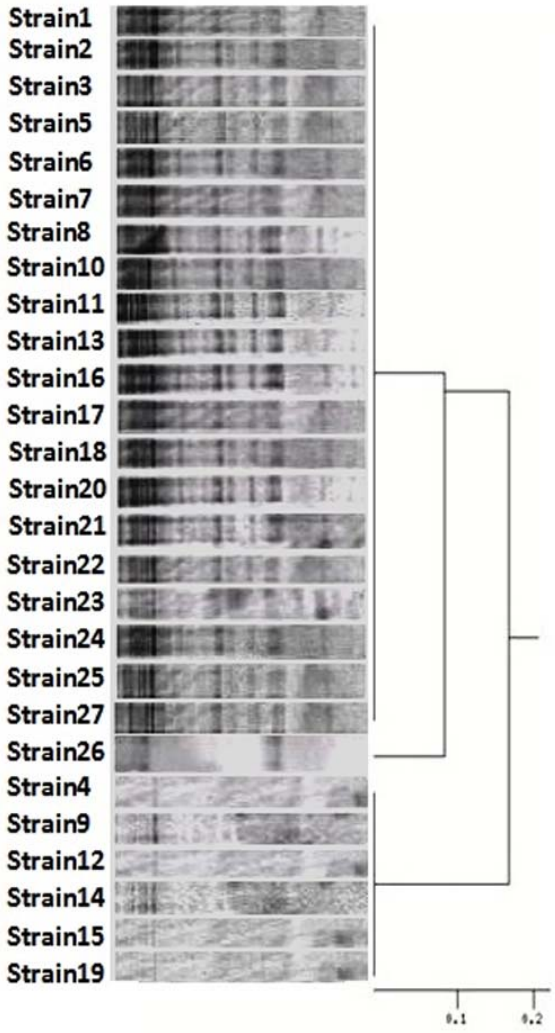
سکانس هدف	نام پروب	توالی پروب‌ها (′۵→′۳)
rrs	Ad	5′ DIG-AGA GTT TGA TC(A,C) TGG CTC AG
rrs	rB	5′ DIG -TGA CGG GCG GTG TGT ACA A
rrl	O4c	5′ DIG -ACC GAT AGI GAA CCA GTA CCG TG
rrl	O16	5′ DIG -GTA CCI CAA ACC GAC ACA GGT IG
rrl	O24c	5′ DIG -TTT GGC ACC TCG ATG TCG GCT

www.mui.ac.ir

جدول ۲. مشخصات ریبوتایپ‌های سالمونلا انتریتیدیس جدا شده از بیماران

کد ایزوله	محل جداسازی	جنسیت	الگوی ریبوتایپ	نوع نمونه
۱	مرکز طبی کودکان	زن	۱d	مدفوع
۲	مرکز طبی کودکان	مرد	۱d	خون
۳	مرکز طبی کودکان	مرد	۱d	مدفوع
۴	مرکز طبی کودکان	مرد	۲d	ادرار
۵	مرکز طبی کودکان	مرد	۱d	مدفوع
۶	مرکز طبی کودکان	زن	۱d	مدفوع
۷	مرکز طبی کودکان	مرد	۱d	مدفوع
۸	بیمارستان بقیا... (عج)	زن	۱d	مدفوع
۹	مرکز طبی کودکان	مرد	۲d	خون
۱۰	مرکز طبی کودکان	مرد	۱d	مدفوع
۱۱	مرکز طبی کودکان	مرد	۱d	مدفوع
۱۲	مرکز طبی کودکان	مرد	۲d	مدفوع
۱۳	مرکز طبی کودکان	مرد	۱d	خون
۱۴	مرکز طبی کودکان	زن	۲d	مدفوع
۱۵	مرکز طبی کودکان	زن	۲d	ادرار
۱۶	بیمارستان بقیا... (عج)	مرد	۱d	مدفوع
۱۷	بیمارستان بقیا... (عج)	مرد	۱d	مدفوع
۱۸	مرکز طبی کودکان	زن	۱d	ادرار
۱۹	مرکز طبی کودکان	زن	۲d	خون
۲۰	بیمارستان بقیا... (عج)	مرد	۱d	مدفوع
۲۱	بیمارستان بقیا... (عج)	مرد	۱d	مدفوع
۲۲	بیمارستان بقیا... (عج)	مرد	۱d	مدفوع
۲۳	بیمارستان بقیا... (عج)	زن	۱d	خون
۲۴	بیمارستان بقیا... (عج)	مرد	۱d	مدفوع
۲۵	مرکز طبی کودکان	مرد	۱d	مدفوع
۲۶	مرکز طبی کودکان	مرد	۳d	ادرار
۲۷	مرکز طبی کودکان	زن	۱d	مدفوع

به مرکز طبی کودکان انواع الگوهای ۱d، ۲d و ۳d مشاهده گردید که در این میان بیشترین بیماران دارای الگوی ریبوتایپ ۲d، جنس مذکر بودند. ریبوتایپینگ توانست با استفاده از آنزیم برش دهنده‌ی PstI مجموع ۲۷ ایزوله‌ی مربوط به سروتایپ انتریتیدیس را به ۳ دسته تقسیم نماید. این الگوها به طور دلخواه به نام‌های ۱d تا ۳d دسته‌بندی شد. از میان ۲۷ سروتایپ مربوط به سالمونلا انتریتیدیس، ۲۰ سروتایپ (۷۴/۱ درصد) دارای الگوی ریبوتایپ ۱d، ۶ سروتایپ (۲۲/۲ درصد) دارای الگوی ریبوتایپ ۲d و یک مورد دارای الگوی ۳d بود. الگوی باندی حاصل از برش توسط آنزیم PstI در تمامی ایزوله‌ها دارای اندازه‌ای مابین ۱/۴ و ۱۶/۸ کیلوباز بود. دندروگرام سروتایپ‌های سالمونلا انتریتیدیس و نتایج حاصل از ریبوتایپینگ در شکل ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱. دندروگرام سروتایپ‌های سالمونلا انتریتیدیس و نتایج حاصل از ریبوتایپینگ

www.mui.ac.ir

بحث

در طول دهه‌ی گذشته، سویه‌های بیماری‌زای باکتریایی وجود داشتند که در طی همه‌گیری‌ها، تشخیص داده نمی‌شدند. این سویه‌ها به صورت گسترده از یک منطقه به منطقه‌ی دیگر منتقل می‌شدند. یکی از گسترده‌ترین پاندمی‌های اخیر در سراسر جهان توسط سویه‌های سالمونلا انتریتیدیس رخ داده است. آمارهای سازمان بهداشت جهانی نشان می‌دهد که یک افزایش چشمگیر در تعداد موارد عفونت سالمونلا انتریتیدیس در مناطق مختلف اروپا، آمریکای شمالی و کشورهای آمریکای جنوبی وجود دارد (۳۰).

سالمونلا از جمله میکروارگانیسم‌های منتقل شده از طریق غذا و یکی از مهم‌ترین مشکلات بهداشتی در سراسر دنیا می‌باشد (۳۲-۳۱). نقش برجسته‌ی این باکتری در بروز عفونت‌های ایجاد شده در انسان است. شیوع این باکتری در طول دهه‌ی گذشته افزایش فراوانی یافته است. در انگلستان و ولز، موارد عفونت انسانی از ۴۰۰۰ تا ۶۰۰۰ مورد در هر سال در دهه‌ی ۱۹۶۰، به ۲۳۰۰۰ مورد در سال ۱۹۸۸ رسیده است. در ایالات متحده‌ی آمریکا از موارد اطلاع از سالمونلوز از ۱۱ در هر ۱۰۰ هزار در سال ۱۹۷۱ به بیش از ۲۷ مورد در هر ۱۰۰ هزار در سال ۱۹۸۵ افزایش یافته است (۳۳).

همچنین نتایج تحقیقی که در کشور اسپانیا انجام شد، حاکی از آن بود که سالمونلا انتریتیدیس، بعد از سالمونلا تیفی‌موریوم شایع‌ترین عامل سالمونلوز می‌باشد (۵). سالمونلا انتریتیدیس یکی از شایع‌ترین سروتایپ‌های سالمونلا است که به دلیل داشتن هموژنیتی زیاد در میان سروتایپ‌های آن، با استفاده از روش‌های فنوتایپی همچون بیوتایپینگ، فاژتایپینگ و غیره به سختی تایپ‌بندی می‌گردد (۲۰، ۱۵). استفاده از ریبوتایپینگ به عنوان یک روش کارامد و قابل اطمینان در ارزیابی ارتباط سویه‌های سالمونلا توسط محققان مختلف گزارش شده است (۳۴، ۲۹، ۲۴-۲۳).

Landeras و همکاران با استفاده از ریبوتایپینگ، طی بررسی که بر روی ۶۵ ایزوله‌ی سالمونلای جدا شده از بیماران انجام دادند، توانستند ۲۲ الگوی ریبوتایپ مختلف را شناسایی کنند. این گروه با استفاده از آنزیم‌های برش‌دهنده‌ی PstI و SphI توانستند در میان تمام ایزوله‌های سالمونلا ۱۸ ریبوتایپ مختلف سالمونلا انتریتیدیس را تشخیص دهند (۱۴).

همچنین در یک بررسی در برزیل که با استفاده از ریبوتایپینگ روی ۸۳ ایزوله‌ی سالمونلای جدا شده از بیماران انجام شد، سالمونلا انتریتیدیس فراوان‌ترین سروتایپ در میان ایزوله‌های سالمونلا بود. این گروه توانستند با استفاده از آنزیم برش دهنده‌ی SphI، ۲ الگوی ریبوتایپ مختلف این سروتایپ را در میان تمامی ۳۸ ایزوله‌ی سالمونلا انتریکا شناسایی نمایند (۶). در بسیاری از مطالعات انجام شده، نتایج به دست آمده حاکی از قدرت بیشتر افتراق‌دهی و تشخیصی ریبوتایپینگ نسبت به روش‌هایی مانند فاژ تایپینگ و آنالیز پلاسمید می‌باشد (۱۴). برای مثال، نتایج به دست آمده از دو شیوع مختلف سالمونلا، که با استفاده از روش‌های تایپینگ پروفایل پلاسمیدی و فاژ تایپینگ انجام گردید، به ترتیب ۵ و ۴ نوع الگوی مختلف به دست آمد. اما نتایج به دست آمده در همین بررسی با استفاده از ریبوتایپینگ توانست ۱۰ الگوی مختلف تایپینگ را نشان دهد (۳۵).

در مطالعه‌ی حاضر، ریبوتایپینگ توانست با استفاده

www.mui.ac.ir

از آنزیم برش دهنده‌ی PstI، ۲۷ ایزوله‌ی متعلق به سروتایپ انتریتیدیس را به ۳ دسته تقسیم نماید. نتایج به دست آمده در این تحقیق نمایانگر شیوع بالای سالمونلا انتریتیدیس در میان سایر سروتایپ‌های این باکتری در میان بیماران تحت بررسی می‌باشد.

با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه سویه‌های در گردش سالمونلا انتریتیدیس در تهران به طور عمده مربوط به یک کلون بودند؛ به طوری که از میان ۲۷ سروتایپ سالمونلا انتریتیدیس، ۲۰ سروتایپ (۷۴/۱ درصد) دارای الگوی ریبوتایپ 1d بودند.

Usera و همکاران در برزیل با استفاده از الگوهای برش دهنده‌ی ژن‌های RNA ریبوزومی، به بررسی ارتباط میان سویه‌های جدا شده‌ی سالمونلا انتریتیدیس پرداختند و نشان دادند که ریبوتایپینگ یک روش تایپینگ قابل اطمینان، تکرارپذیر و مناسب جهت افتراق و شناسایی سالمونلا انتریتیدیس می‌باشد. آن‌ها دریافتند که استفاده از آنزیم‌های برش دهنده و ریبوتایپینگ بهترین روش در افتراق و شناسایی سروتایپ‌های سالمونلا می‌باشد (۱۰). برای به دست آوردن نتایج دقیق و قابل اطمینان در مطالعات اپیدمیولوژی موارد زیادی باید مورد توجه قرار گیرد. تمایز بین استرین‌های مختلف سروتایپ‌های انتریتیدیس با استفاده از الگوهای ریبوتایپینگ اختصاصی، توانایی افتراق‌دهی سروتایپ‌ها در یک شیوع، شناسایی منبع عفونت با مقایسه‌ی الگوهای ریبوتایپینگ از باکتری‌های ایزوله شده و مقایسه‌ی آن با نمونه‌های غذایی یا انسانی آلوده و تعیین گستردگی عفونت در سریع‌ترین زمان ممکن، برخی از مواردی هستند که باید مد نظر قرار بگیرند. نتایج به دست آمده در اکثر مطالعات نشان دهنده‌ی ارتباط بالای میان نتایج به دست آمده از ریبوتایپینگ و سروتایپینگ سروتایپ‌های انتریتیدیس نسبت به سایر روش‌های تایپینگ می‌باشد (۳۶).

نتیجه‌گیری

نتایج به دست آمده در این مطالعه، حکایت از آن داشت که سویه‌های در گردش سالمونلا انتریکا سروتایپ انتریتیدیس در تهران اغلب متعلق به یک ریبوتایپ می‌باشد. استفاده از سایر روش‌های تایپینگ مولکولی جهت قضاوت دقیق‌تر در مورد وجود کلون‌های محدود یا گسترده از این سروتایپ پیشنهاد می‌گردد.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از یکی از طرح‌های تحقیقاتی انجام شده در مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا... (عج) بود. نویسندگان این مقاله از همکاران محترم آزمایشگاه بیولوژی مولکولی جناب آقای دکتر هاشمی مدنی، سرکار خانم سفیری و خانم پورعلی کمال تشکر و قدردانی را دارند.

References

1. Baumler AJ, Tsolis RM, Ficht TA, Adams LG. Evolution of host adaptation in Salmonella enterica. Infect Immun 1998; 66(10): 4579-87.
2. Gonzalez Hevia MA, Mendoza MC. Polymorphism of rRNA genes and plasmid analysis in the typing of Salmonella enterica serovar enteritidis from a Spanish health area. New Microbiol 1995; 18(4): 377-84.
3. Nastasi A, Mammina C. Epidemiology of Salmonella enterica serotype Enteritidis infections in southern Italy during the years 1980-1994. Res Microbiol 1996; 147(5): 393-403.
4. Bhutta ZA. Current concepts in the diagnosis and treatment of typhoid fever. BMJ 2006; 333(7558): 78-82.
5. Alvarez J, Sota M, Vivanco AB, Perales I, Cisterna R, Rementeria A, et al. Development of a multiplex PCR technique for detection and epidemiological

www.mui.ac.ir

typing of salmonella in human clinical samples. J Clin Microbiol 2004; 42(4): 1734-8.
6. Martins CHG, Santos VR, 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; 42(1): 19-23.
7. Glosnicka R, Dera-Tomaszewska B. Comparison of two Salmonella enteritidis phage typing schemes. Eur J Epidemiol 1999; 15(4): 395-401.
8. Muresu E, Piana A, Azara A, Maida I, Nastasi A, Sajid SD, et al. Clonal relations among Salmonella enteritidis phage type 3 outbreak isolates traced by DNA fingerprinting. New Microbiol 2001; 24(4): 371-7.
9. 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(5): 1070-4.
10. Usera MA, Popovic T, Bopp CA, Strockbine NA. Molecular subtyping of Salmonella enteritidis phage type 8 strains from the United States. J Clin Microbiol 1994; 32(1): 194-8.
11. Cao SY, Wang MS, Cheng AC, Qi XF, Yang XY, Deng SX, et al. Comparative analysis of intestinal microbial community diversity between healthy and orally infected ducklings with Salmonella enteritidis by ERIC-PCR. World J Gastroenterol 2008; 14(7): 1120-5.
12. Amini K, Zahraei Salehi T, Nikbakht Gh, Ranjbar R, Amini J. Molecular detection of *invA* and *spv* virulence genes in Salmonella enteritidis isolated from human and animals in Iran. Afr J Microbiol Res 2010; 4(21): 2202-10.
13. Ranjbar R, Giammanco GM, Farshad S, Owlia P, Aleo A, Mammina C. Serotypes, antibiotic resistance, and class 1 integrons in Salmonella isolates from pediatric cases of enteritis in Tehran, Iran. Foodborne Pathog Dis 2011; 8(4): 547-53.
14. Landeras E, Gonzalez-Hevia MA, Alzugaray R, Mendoza MC. Epidemiological differentiation of pathogenic strains of Salmonella enteritidis by ribotyping. J Clin Microbiol 1996; 34(9): 2294-6.
15. Landers E, Gonzalez-Hevia MA, Mendoza MC. Molecular epidemiology of Salmonella serotype Enteritidis. Relationships between food, water and pathogenic strains. Int J Food Microbiol 1998; 43(1-2): 81-90.
16. Kendall P. Bacterial food-borne illness. Food and Nurtitionseries 2009; 9(300) [Online]. Available from: URL: http://www.ext.colostate.edu/pubs/foodnut/09300.html.
17. Ciftci E, Guriz H, Derya AA, Ince E, Erdem B, Dogru U. Salmonella bacteraemia in Turkish children: 37 cases seen in a university hospital between 1993 and 2002. Ann Trop Paediatr 2004; 24(1): 75-80.
18. Parry CM, Hien TT, Dougan G, White NJ, Farrar JJ. Typhoid fever. N Engl J Med 2002; 347(22): 1770-82.
19. Weinberger M, Keller N. Recent trends in the epidemiology of non-typhoid Salmonella and antimicrobial resistance: the Israeli experience and worldwide review. Curr Opin Infect Dis 2005; 18(6): 513-21.
20. De Oliveira FA, Geimba MP, Pasqualotto AP, Brandelli A, Pasquali G, da Silva WP, et al. Clonal relationship among Salmonella enterica serovar enteritidis involved in foodborne outbreaks in Southern Brazil. Food Control 2009; 20(6): 606-10.
21. De Cesare A, Manfreda G. Use of the automated ribotyping for epidemiological investigations. Ann Microbiol 2002; 52: 181-90.
22. 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(8): 2314-21.
23. Grimont F, Grimont PA. Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. Ann Inst Pasteur Microbiol 1986; 137B(2): 165-75.
24. Stull TL, LiPuma JJ, Edlind TD. A broad-spectrum probe for molecular epidemiology of bacteria: ribosomal RNA. J Infect Dis 1988; 157(2): 280-6.
25. 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(3): 128-32.
26. Karami A, Ranjbar R, Ahmadi Z, Safiri Z. Rapid detection of different serovares of Salmonella entrica by multiplex PCR. Iranian J Publ Health 2007; 36(2): 38-42.
27. Clark CG, Kruk TM, Bryden L, Hirvi Y, Ahmed R, Rodgers FG. Subtyping of Salmonella enterica serotype enteritidis strains by manual and automated PstI-SphI ribotyping. J Clin Microbiol 2003; 41(1): 27-33.
28. Ranjbar R, Soltan Dallal MM, Talebi M, Pourshafie MR. Increased isolation and characterization of Shigella sonnei obtained from hospitalized children in Tehran, Iran. J Health Popul Nutr 2008; 26(4): 426-30.
29. Ranjbar R, Mammina C, Pourshafie MR, Soltan-Dallal MM. Characterization of endemic Shigella boydii strains isolated in Iran by serotyping, antimicrobial resistance, plasmid profile, ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis. BMC Res Notes 2008; 1: 74.
30. Control of Salmonella infections in animals and prevention of human foodborne Salmonella infections. WHO Consultation. Bull World Health Organ 1994; 72(6): 831-3.
31. Ranjbar R, Giammanco GM, Aleo A, Plano MR,

www.mui.ac.ir

Naghoni A, Owlia P, et al. Characterization of the first extended-spectrum beta-lactamase-producing nontyphoidal Salmonella strains isolated in Tehran, Iran. Foodborne Pathog Dis 2010; 7(1): 91-5.

32. Naghoni A, Ranjbar R, Tabaraie B, Farshad S, Owlia P, Safiri Z, et al. High prevalence of integron-mediated resistance in clinical isolates of Salmonella enterica. Jpn J Infect Dis 2010; 63(6): 417-21.

33. Sockett PN, Roberts JA. The social and economic impact of salmonellosis. A report of a national survey in England and Wales of laboratory-confirmed Salmonella infections. Epidemiol Infect 1991; 107(2): 335-47.

34. Pirnay JP, De VD, Cochez C, Bilocq F, Pirson J, Struelens M, et al. Molecular epidemiology of Pseudomonas aeruginosa colonization in a burn unit: persistence of a multidrug-resistant clone and a silver sulfadiazine-resistant clone. J Clin Microbiol 2003; 41(3): 1192-202.

35. Gruner E, Martinetti LG, Hoop RK, Altwegg M. Molecular epidemiology of Salmonella enteritidis. Eur J Epidemiol 1994; 10(1): 85-9.

36. Lippelt M, de Isele TS, Kist M. Fingerprinting of Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis by ribotyping. Clin Microbiol Infect 1997; 3(2): 229-35.

Journal of Isfahan Medical School Original Article

Vol 30, No 180, 2nd week, May 2012 Received: 16.11.2011 Accepted: 6.2.2012

A Study of Ribotype Patterns of Salmonella Enterica Serovar Enteritidis Strains Isolated in Tehran, Iran

Reza Ranjbar PhD[1], Meysam Sarshar MSc[2], Saeid Morovvati PhD[1]

Abstract

Background: Salmonella enterica serovar enteritidis is currently the most frequent serovar causing salmonellosis in humans. The incidence of gastrointestinal infections caused by S. enteritidis increased during the last decade. The aim of this study was to evaluate the genetic diversity of S. enteritidis isolates from Tehran (Iran) hospitals using ribotyping methods.

Methods: In a descriptive study from April 2008 to December 2011, clinical samples such as fecal and blood specimens of the cases having symptoms of salmonellae infection were collected from different hospitals in Tehran. Salmonella isolation was carried out by bacteriological and serological methods. The relationship between the strains was determined using ribotyping.

Findings: Of 68 Salmonella spp. strains, 29 isolates were S. enteritidis. Ribotyping was able to differentiate all isolates. The size of the bands ranged from 1.4 to 16.8 kb in all ribotypes. S. enteritidis isolates were divided into three clusters (1d to 3d). Most strains (20) belonged to the 1d cluster.

Conclusion: Our results indicated that S. enteritidis strains circulating in Tehran mainly belong to a limited ribotype.

Keywords: Salmonella enteritidis, Salmonellosis, Ribotyping

[1] Associate Professor, Molecular Biology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[2] Molecular Biology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
Corresponding Author: Reza Ranjbar PhD, Email: ranjbar@bmsu.ac.ir.