

## ارزیابی ارتباط ژنتیکی سالمونلا انتریکا سرووار انتریتیدیس جداشده از نمونه PCR-ERIC های انسانی و دامی به روش

فرزانه پورحسن سنگری<sup>۱</sup>، کیومرث امینی<sup>۲</sup>، غلامعلی مرادلی<sup>۳</sup>

تاریخ دریافت ۱۳۹۵/۰۱/۲۳ تاریخ پذیرش ۱۳۹۵/۰۳/۱۹

### چکیده

**پیش‌زمینه و هدف:** سالمونلوزیس از مهم‌ترین بیماری‌های عفونی مشترک بین انسان و حیوانات است که بیشتر در ارتباط با مصرف گوشت، ماکیان، تخم‌مرغ و شیر است. هدف از مطالعه پیش رو، ارزیابی ارتباط ژنتیکی سالمونلا انتریکا سرووار انتریتیدیس جداشده از نمونه‌های انسانی و دامی به روش PCR-ERIC می‌باشد.

**مواد و روش کار:** در این مطالعه توصیفی-مقطعی، تعداد ۶۰ جدایه سالمونلا انتریکا سرووتا پ انتریتیدیس از نمونه‌های انسانی و دامی به دست آمد. شناسایی سویه‌ها با استفاده از روش‌های استاندارد میکروبیولوژیکی و بیوشیمیایی و سروتا پیننگ بر اساس روش اسلاید آگلوتیناسیون با استفاده از آنتی سرم‌های مونو و پلی والان انجام شد. سپس ERIC-PCR با استفاده از توالی‌های الیگنوکلوتیدی به منظور تعیین ارتباط مولکولی سویه‌ها انجام گردید.

**یافته‌ها:** 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 به دست آمده بین ۱۱-۲ عدد با وزن مولکولی 20-3200 bp بود. بر این اساس به طور کلی ۱۵ کلاستر مختلف (C1-C15) به دست آمد که بیشترین تعداد (۱۳/۳ درصد، ۸ سویه) با داشتن الگوی مشابه در کلاستر ۵ (C5) قرار گرفتند.

**بحث و نتیجه‌گیری:** نتایج نشان داد که سویه‌های سالمونلا انتریکا سرووار انتریتیدیس از نظر ژنتیکی ناهمگون هستند. 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.

**کلیدواژه‌ها:** سالمونلا انتریتیدیس، تایپینگ مولکولی، ERIC-PCR

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و هفتم، شماره پنجم، ص ۴۱۸-۴۱۱، مرداد ۱۳۹۵

آدرس مکاتبه: دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه، گروه میکروبیولوژی، ۰۸۶۴۲۲۴۱۵۱۱

Email: Dr\_kumarss\_amini@yahoo.com

### مقدمه

در ابتدا به سالمونلوزیس می‌باشد. سالمونلوزی ساز مهم‌ترین بیماری‌های عفونی بین انسان و حیوانات است که بیشتر در ارتباط با مصرف گوشت، ماکیان، تخم‌مرغ و شیر رخ می‌دهد (۳). بنابراین این باکتری یک پاتوژن منتقله از طریق غذا محسوب می‌گردد (۴). گاستروانتریت شایع‌ترین فرم بالینی سالمونلوزیس بوده که اغلب با تب، دردهای ماهیچه‌ای شکمی (کرامپ) و اسهال مرتبط است. شروع این علائم ناگهانی از ۱۲ ساعت تا یک هفته متغیر است. طول دوره بیماری ۷-۴ روز به طول می‌انجامد و بسیاری از افراد بدون نیاز به آنتی‌بیوتیک بهبود می‌یابند (۵). از میان سروتیپ‌های شایع دخیل

یکی از اعضای خانواده انتروباکتری آسیه، سالمونلاها هستند که باسیل‌های گرم منفی، متحرک با داشتن تار لرزان (فلاژل) پیرامونی، بی‌هوازی اختیاری و فاقد اسپور می‌باشند (۱). بر طبق آخرین طبقه‌بندی سالمونلا دارای دو گونه مهم سالمونلا انتریکا و سالمونلا بونگوری است که گونه انتریکا خود دارای شش تحت گونه شامل سالمونلا آریزونا، انتریکا، دی‌آریزونا، سالامی، هوتناواپندیکا می‌باشد (۲). سالمونلا انتریکا زیرگونه انتریکا سروتیپ انتریتیدیس که به اختصار به سالمونلا انتریتیدیس نیز معروف است، مهم‌ترین عامل

<sup>۱</sup> کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران

<sup>۲</sup> استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران (نویسنده مسئول)

<sup>۳</sup> استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران

مانند گونه‌های سالمونلا بکار می‌رود (۱۴). بنابراین هدف از مطالعه حاضر؛ تایپینگ مولکولی جدایه‌های سالمونلا انتریکا سرووار انتریتیدیس جدا شده از انسان و دام به روش ERIC-PCR می‌باشد.

## مواد و روش کار

### جداسازی باکتری:

در این مطالعه توصیفی - مقطعی که در طی ۱۰ ماه از ابتدای آذر ۱۳۹۳ لغایت انتهای شهریور ۱۳۹۴ انجام شد در مجموع ۲۳۴ نمونه مختلف بالینی و دامی از جمله: ۱۱۷ نمونه مدفوع بیماران مشکوک به عفونت سالمونلا از بیمارستان حضرت رسول اکرم تهران و ۱۱۷ نمونه کشتارگاهی شامل مدفوع، کبد، طحال، محتویات سکومی و صفرا جمع‌آوری شد. سپس تمامی نمونه‌ها در شرایط استریل به محیط آزمایشگاه منتقل گردید و به منظور غنی‌سازی به محیط کشت سلنیت F (مرک، آلمان) منتقل شدند و به مدت ۱۲-۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری انجام گردید. نمونه‌های مدفوع کشت داده شده در محیط SF در مرحله بعد بر روی محیط XLD<sup>۲</sup> آگار و سالمونلا-شیگلا (SS) آگار (مرک، آلمان) کشت داده و در ۳۷ درجه سلسیوس برای ۲۴ ساعت انکوبه شد. کلنی‌های رشد کرده و مشکوک به با استفاده از تست‌های استاندارد بیوشیمیایی و میکروبیولوژیکی مانند: TSI، اوره، سیمون سترات آگار و MRVP مورد شناسایی قرار گرفت. آزمون سروتایپینگ برای مشخص نمودن آنتی‌ژن‌های سوماتیک (O)، فلاژله (H) و کپسولی (Vi) با استفاده از آنتی سرم‌های پلی والان و مونووالان به روش Slide agglutination انجام گردید. از سویه استاندارد *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Enteritidis* ATCC13076 استفاده گردید.

### تایپینگ مولکولی:

به منظور استخراج DNA سلولی، تمامی ایزوله‌ها به مدت یک شبانه‌روز بر روی محیط لوریا برتانی براث (مرک، آلمان) کشت داده شد. سپس، استخراج DNA ژنوم طبق دستورالعمل شرکت سازنده و با استفاده از کیت AccuPrep Genomic DNA Extraction (Bioneer) Kit (کره) انجام گردید. جهت تأیید درجه خلوص DNA استخراج شده از دستگاه بیوفتومتر (Bio-Rad, USA) استفاده گردید. به منظور انجام تایپینگ مولکولی سویه‌های تحت مطالعه از توالی‌های اختصاصی الیگونوکلوئیدی پرایمرهای موجود در جدول ۱ استفاده شد (جدول ۱) (۱۵).

در گاستروانتریت سالمونلایی، سالمونلا تیفی موریوم و سالمونلا انتریتیدیس فراوان‌ترین می‌باشند (۶). در دهه اخیر سروتایپ سالمونلا انتریتیدیس به‌عنوان رایج‌ترین سرووار از سالمونلا در بسیاری از کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه من جمله ایران شناخته شده است (۷). وجود عفونت ناشی از سالمونلا در طیور و بررسی انتشار آن به زنجیره غذایی انسانی، شناسایی سریع این پاتوژن را در فرآورده‌های حیوان و بررسی تنوع ژنوتیپی و فنوتیپی در میان جدایه‌های تهیه شده را امکان پذیر نموده است (۸). بنابراین در بسیاری از کشورهای دنیا بررسی آلودگی به سالمونلا انتریتیدیس و تشخیص به موقع آن از آزمایشات مهم در صنعت غذا و مراکز کنترل و پیشگیری بیماری‌ها محسوب می‌شود (۹). با وجود قربت ژنتیکی بسیار نزدیک در جنس سالمونلا، تغییرات گسترده‌ای در بروز بیماری، ویروانسوز توزیع جغرافیایی وجود دارد (۱۰). کسب یا از دست دادن برخی از ژن‌ها و تاسیون‌ها، نقش مهمی در تکامل سرو تایپ‌های مختلف سالمونلا ایفا می‌کند. به دلیل وقت گیر بودن، هزینه بالا و تفسیر دشوار تست‌های فنوتیپیک از قبیل سرو تایپینگ، فائز تایپینگ، این روش‌ها، روش مناسبی برای ردیابی منبع عفونت ناشی از سالمونلا در موارد مطالعات اپیدمیولوژیک نمی‌باشند. به همین دلیل روش‌های تایپینگ دیگری برای تمایز سویه‌های متعلق به یک سروتایپ و فائز تایپ نیاز است (۱۱). روش‌های مولکولی مانند پلی مورفیس طولی قطعه محدود (RFLP)، ریبوتایپینگ، Plasmid profiling، ژل الکتروفورز در میدان ضربانی (PFGE)، پلی مورفیس DNA تکثیر شده تصادفی (RAPD)، DNA Probe و روش PCR توالی محافظت شده تکراری داخلی انتروباکتریال (ERIC-PCR)<sup>۱</sup> می‌باشد (۱۲). امروزه PFGE روشی رایج برای ژنوتایپینگ گونه‌های سالمونلا است اما دارای مشکلاتی از قبیل پرهزینه، وقت گیر، نیاز به حجم بالایی از ژنوم می‌باشد. PFGE به‌عنوان استاندارد طلایی در بررسی منطقه ایی مولکولار اپیدمیولوژیک مانند یک بیمارستان مدنظر می‌باشد (۱۳)؛ اما ERIC-PCR روشی سریع، آسان، تفسیر ساده و دارای قدرت تمایز بالا در هر آزمایشگاهی که توانایی انجام PCR را دارند، می‌باشد. توالی‌های تکراری داخلی ERIC در واقع توالی‌های ۱۲۴-۱۲۷bp هستند که دارای یک ناحیه معکوس تکرار شونده مرکزی حفاظت شده بوده که به شکل خارج ژنی در ژنوم باکتری‌های انتریک موجود بوده و پرایمرهای مورد استفاده در ERIC-PCR مکمل این توالی‌ها هستند و برای ژنوتایپینگ باکتری‌های گرم منفی روده‌ای

<sup>2</sup> Xylose Lysine Desoxycholate Agar

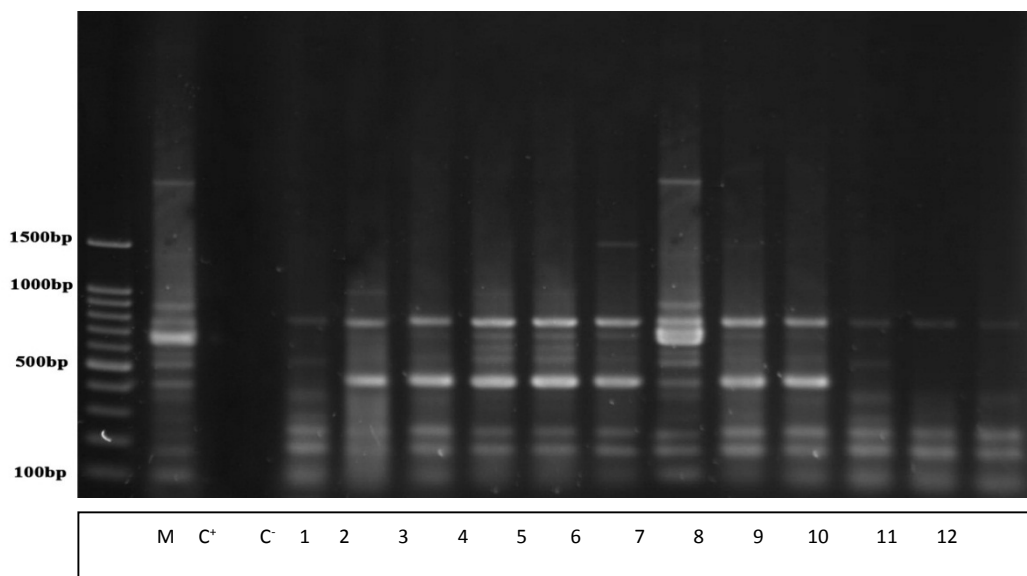
<sup>1</sup> Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus

جدول (۱): پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق به شرح زیر می باشد:

Primer	Oligonucleotide Sequence (5'→3')
ERIC 1	5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3'
ERIC 2	5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'

گرفت؛ مرحله واسرشتگی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۵۵ ثانیه، مرحله اتصال پرایمرها در ۵۵ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه و مرحله طویل سازی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵۵ ثانیه. در پایان، محصولات واکنش PCR در ژل آگارز ۲ درصد حاوی اتیدیوم بروماید (۰.۵  $\mu\text{g/ml}$ ) الکتروفورز گردیده و در عکس برداری با استفاده از Gel document دیجیتالی (CCD) انجام شد (شکل ۱).

در نهایت، واکنش PCR به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۷/۵ میکرولیتر PCR master mix 5X (سیناکلون، ایران) حاوی Taq DNA polymerase (0.05 U/ $\mu\text{l}$ )،  $\text{MgCl}_2$  (3 mM) و dNTPs (0.4mM) ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها به غلظت ۰/۸ میکرومولار، ۱ میکرولیتر از DNA الگو (۱۰ نانوگرم) و ۱۴/۵ میکرولیتر آب دو بار تقطیر و دیونیزه استریل با استفاده از گرادیانت ترموسایکلر (اپندورف، آلمان) برای ۳۰ سیکل به صورت زیر انجام



شکل (۱): نمونه ژل به دست آمده در این تحقیق. M: DNA size marker (100 bp plus). (سیناژن، ایران). ۲- کنترل مثبت (سالمونلا انتریتیدیس ATCC 13076). ۳- کنترل منفی (*Acinetobacterbaumannii* ATCC 19606). ستون های ۱ تا ۱۲ محصولات ERIC PCR سویه های سالمونلا انتریتیکا سرووار انتریتیدیس.

### رسم درخت تکاملی:

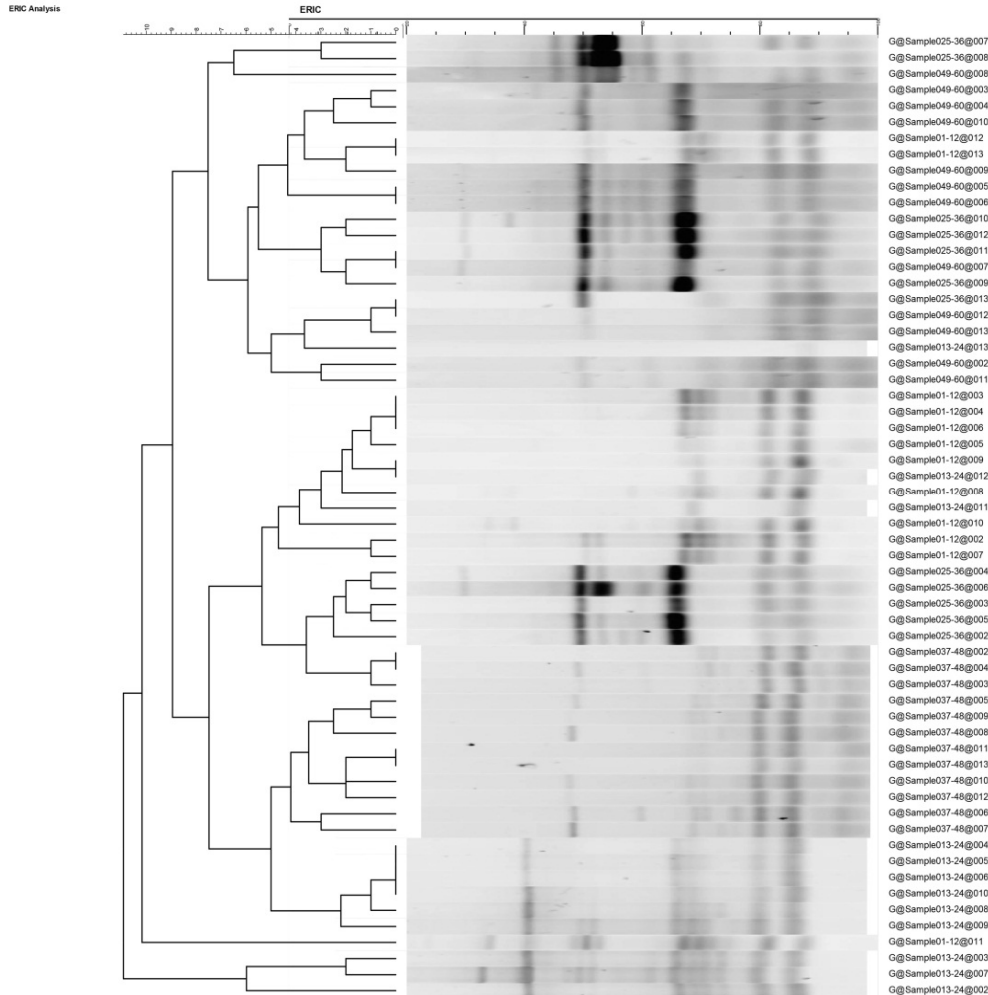
مقایسه الگوهای ERIC-PCR در پایگاه اینترنتی Insilico.ehu.es انجام گرفت، بدین صورت که پس از امتیازدهی به صورت صفر (عدم وجود باند) و یک (وجود باند) برای بررسی دقیق تر الگوهای ژنوتایپینگ مورد استفاده قرار گرفتند (شکل ۱). برای ترسیم دندروگرام ابتدا ماتریس تشابه به روش دایس تشکیل و سپس دندروگرام با استفاده از روش خوشه بندی مبتنی بر فاصله UPGMA و نرم افزار NTSYSpc2.0 انجام شد. قدرت تمایزی ERIC-PCR با استفاده از معادله Simpson's index of diversity محاسبه شد.

### یافته ها

از مجموع ۲۳۴ نمونه مختلف تحت بررسی تعداد ۶۰ سویه سالمونلا انتریتیدیس به دست آمد. نتایج آنالیز نمونه های دامی نشان داد که بیشترین سویه از محتویات سکوم به دست آمد. میانگین سنی افراد تحت مطالعه  $12 \pm 55$  سال که ۳۰ مورد مرد و مابقی زن بودند. ۱۵ کلاستر مختلف به دست آمد به طوری که ۳ ایزوله با داشتن الگوی مشابه در کلاستر اول (C1)، پنج جدایه در کلاستر ۲ (C2)، دوسویه در کلاستر ۳ (C3)، چهار ایزوله در کلاستر ۴ (C4)، هشت ایزوله در کلاستر ۵ (C5)، دو ایزوله در کلاستر ۶ (C6)، چهار جدایه

ایزوله در کلاستر ۱۵ (C15) جای‌گیر شدند. دندروگرام سروتایپ‌های سالمونلا انتریتیدیس و نتایج حاصل از ERIC-PCR در شکل ۲ آمده است.

در کلاستر ۷ (C7)، دو ایزوله در کلاستر ۸ (C8)، چهار ایزوله در کلاستر ۹ (C9)، سه ایزوله در کلاستر ۱۰ (C10)، پنج ایزوله در کلاستر ۱۱ (C11)، سه ایزوله در کلاستر ۱۲ (C12)، سه ایزوله در کلاستر ۱۳ (C13)، سه ایزوله در کلاستر ۱۴ (C14) و در نهایت دو



شکل (۲): گروه‌بندی نمونه‌های سالمونلا انتریتیدیس جدا شده از انسان و دام با روش UPGMA بر اساس توالی ERIC

نمونه‌های مورد مقایسه خویشاوندی کم‌تری با هم داشته و شباهت توالی در آن‌ها کم‌تر است. رنجبر و همکاران (۱۶) تعداد ۵۷ سویه سالمونلا انتریتیدیس را توسط ERIC PCR مورد مطالعه قرار دادند و ۹ الگوی ERIC-PCR به دست آوردند. نتایج این محققین نشان داد که روش ERIC PCR می‌تواند ایزوله‌های سالمونلا انتریکا را به خوبی تمایز دهد زیرا تمامی ایزوله‌ها با این روش قابل تایپ بندی بودند. نتایج آن تا حد زیادی مشابه نتایج مطالعه حاضر می‌باشد. نتایج مطالعه حاضر علاوه بر اینکه پلی مورف بودن سویه‌های مورد مطالعه را نشان می‌دهد به این نکته نیز اشاره دارد که روش ERIC PCR به خوبی می‌تواند سویه‌های سالمونلا به‌ویژه سویه‌های متعلق به یک گروه سروتایپی را از هم تشخیص داده و متمایز کند.

## بحث و نتیجه‌گیری

یافته‌ها نشان داد که ERIC-PCR می‌تواند ایزوله‌های سالمونلا انتریتیدیس را به خوبی تمایز دهد، چراکه تمامی ایزوله‌ها با این روش قابل تایپ بندی بودند. بر اساس دسته‌بندی دیگر ایزوله‌ها به ۷ گروه مجزا به نام ST (Sequence type) کلاستر بندی شد. بر اساس تعریف ST به سویه‌هایی اطلاق می‌شود که الگوی متفاوت داشته و از نظر ژنتیکی منحصربه‌فرد هستند. ۱۵ کلاستر به دست آمده در این مطالعه نشان داد که سویه‌هایی که در سرشاخه‌های نزدیک به هم قرار گرفته‌اند شباهت به نسبت بیشتری به یکدیگر دارند. بیشترین تعداد سویه‌ها (۸ سویه، ۱۳/۳ درصد) متعلق به کلاستر ۵ بودند. هرچه سرشاخه‌ها از هم فاصله بیشتری داشته باشند دو نمونه یا

روش تعداد باندها بین ۱۳-۱۲ بود. در مقایسه این دو مطالعه با مطالعه حاضر می‌توان نتیجه گرفت تعداد باندهای این الگوها شبیه مطالعه حاضر نبود که احتمالاً به دلیل فاصله جغرافیایی و اختلاف بهداشت دو منطقه می‌باشد. Cheielewsk و همکارانش (۲۲) در سال ۲۰۰۲، ۳۱ ایزوله سالمونلا را با روش‌های ERIC PCR و Rep PCR و ریبوتایپینگ مورد مطالعه قرار دادند و نتیجه گرفتند که در بین این سه روش ERIC PCR و Rep PCR دارای قدرت افتراقی بیشتری از ریبوتایپینگ می‌باشند. به طوری که با نتیجه مطالعه حاضر تا حدی نزدیک است که اختلاف اندک بین تعداد الگوهای شناسایی شده در دو بررسی می‌تواند نشانگر قدرت تمایز بیشتر روش ERIC PCR در مقایسه با Rep-PCR و ریبوتایپینگ باشد. نتایج نشان داد که سویه‌های سالمونلا انتریکا سرووار انتریتیدیس از نظر ژنتیکی ناهمگون هستند و این موضوع نشان‌دهنده شیوع پلی کلونال سویه‌ها در نمونه‌های دامی می‌باشد. 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. لذا لازم است که بررسی‌های مستمر، برنامه‌های نظارتی و غربالگری انجام شود و نوع سالمونلای غالب یا ژنوتایپ غالب آن جامعه مشخص گردد. با توجه به محدود بودن تعداد نمونه‌ها و یکسان بودن منبع جداسازی آن‌ها لازم است بررسی روی سویه‌های بیشتری با منابع غذایی و انسانی نیز صورت پذیرد.

### تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله نویسندگان مقاله بر خود واجب می‌دانند تا از مدیریت و پرسنل محترم آزمایشگاه پاسارگاد و همچنین مدیر گروه و پرسنل دپارتمان میکروبیولوژی دانشگاه آزاد واحد ساوه تقدیر و تشکر نمایند.

### References:

1. 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.
2. Lopez FE, Mercedes Pescaretti ML, Morero R, Delgado MA. *Salmonella* typhimurium general virulence factors: A battle of David against Goliath? *Food Res Int* 2011; 8(9): 4-8.

به طوری که هر دو پرایمر ERIC<sub>1</sub> و ERIC<sub>2</sub> در این مطالعه توانستند تمامی نمونه‌ها را مورد آنالیز قرار داده و برای اکثر آن‌ها الگوی مجزایی ایجاد کنند. این نتایج در تأیید مطالعات باغبانی و همکارانش (۱۷) که قدرت بالای ERIC PCR را در تایپینگ سالمونلا نشان دادند هم‌خوانی دارد.

در مطالعه صانعی و همکاران (۱۸) با استفاده از پرایمر ERIC اکثر ایزوله‌های انسانی و غذایی در یک گروه بزرگ قرار گرفتند. این نتیجه نشان می‌دهد که گوناگونی ژنتیکی زیادی بین سویه‌های سالمونلا انتریتیدیس وجود نداشته و منشأ گرفتن این سویه‌ها از یک کلون واحد یا کلون‌های محدود بسیار محتمل می‌باشد، ولی در مطالعه حاضر با توجه به اینکه ایزوله‌های دامی مورد بررسی قرار گرفتند، با استفاده از پرایمرهای ERIC در ۱۵ گروه کلاستر بندی شدند و ۳ نمونه به نام ST با الگوی ژنتیکی منحصربه‌فرد شناسایی شد. در نتیجه این کلاستر بندی نشان داد وجود کلون‌هایی با شیوع کم‌تر می‌تواند هشدار برای پیدایش سویه‌های جدید و چرخش آن‌ها در محیط باشد. بنابراین شناسایی کلون‌های کم شیوع در مطالعات مولکولار اپیدمیولوژی به لحاظ پیش‌بینی‌های روش‌های کنترل بهداشتی به منظور محدود کردن آن‌ها از دیگر رویکردهای مفید این مطالعه است. در مطالعه گوپا و همکاران (۱۹) در هند تعداد ۱۱۳ سویه سالمونلا توسط ERIC PCR روش تایپ بندی شدند. با مقایسه نتایج فوق با نتایج به دست آمده از بررسی حاضر در مورد به‌کارگیری این روش، به نظر می‌رسد که روش ERIC کارایی مناسبی جهت بررسی تنوع ژنتیکی در سویه‌های سالمونلا دارد. لیم و همکارانش (۲۰) 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 این روش برای مطالعات اپیدمیولوژیکی سویه‌ها مفید است. همچنین اولیویرا و همکارانش (۲۱) 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

3. Hendriksen SW, Orsel K, Wagenaar JA, Miko A, van Duijkeren E. Animal-to-human transmission of *Salmonella* typhimurium DT104A variant. *Emerg Infect Dis* 2004; 10(12): 225-7.
4. Bhowmick PB, Srikumar S, Devegowda D, Shekar M, Darshane-Ruwandeeepika HA, et al. Serotyping and molecular characterization for study of genetic diversity among seafood associated non typhoidal *Salmonella* serovars. *Indian J Med Res* 2012; 135: 371-81.

5. Akoachere JFTK, Tanih NF, Ndip LM, Ndip RN. Phenotypic Characterization of Salmonella Typhimurium Isolates from Food-animals and Abattoir Drains in Buea, Cameroon. *J Health Popul Nutr* 2009; 27: 612-8.
6. Bhutta ZA. Current concepts in the diagnosis and treatment of typhoid fever. *BMJ* 2006; 333(7558): 78-82.
7. Boyed. EF and Hartl. DL. Salmonella virulence plasmid: Modular Acquisition of the spv virulence Region by an F-Plasmid in Salmonella enterica subspecies I and Insertion in to the chromosome of subspecies II, IIIa, IV and VII Isolate. *Genetics Society of America* 1998; 149: 1183-90.
8. Cortez. AL. Carvalho. AC. Ikuno. AA. Burger. KP. Idal. Marthins. Identification of Salmonella serovars Isolate from chicken abattoirs by PCR. *Res Veterinary Sci* 2006; 81: 340-4.
9. Cheielewsk R. Wieliczko A. Kuczowski M. Comparison of profiling Rep and ERIC PCR of Salmonella enteritidis. *J Vet Med Sci* 2001; 49: 163-8.
10. Stevens A, Kerouanton A, Marault M, Millemann Y, Brisabois A, et al. Epidemiological analysis of Salmonella enterica from beef sampled in the slaughterhouse and retailers in Dakar (Senegal) using pulsed-field gel electrophoresis and antibiotic susceptibility testing. *Int J Food Microbiol* 2008; 123: 191-7.
11. Tsen HY, Lin JS, Hsieh HY. Pulsed field gel electrophoresis for animal Salmonella enterica serovar Typhimurium isolates in Taiwan. *Vet Microbiol* 2002; 87(1): 73-80.
12. Fendri, Imen, Amal, Ben Hassena, Noel, Grosset, Lamia, Khannous, Genetic Diversity of food-isolated Salmonella Strains through Pulsed field Gel Electrophoresis (PFGE) and Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC PCR). *PLOS ONE* 2013; 12: 8-12.
13. 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.
14. Helali Ra. The Evaluation of Discriminatory power of ERIC PCR for Molecular Typing of Salmonella enteritidis Strains isolated in Tehran-Iran. The 13 Iranian and The 2 International Congress of Microbiology; 2012.P.345.
15. Fendri I, Hassena AB, Grosset N, Barkallah M, Khannous L, Chuat V, Gautier M, Gdoura R. 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): e81315-23.
16. Ranjbar R, Sarshar M, Morovvati S. A Study of Ribotype Patterns of Salmonella enterica Serovar enteritidis Strains Isolated in Tehran, Iran. *J Isfahan Med School* 2012; 30(180): 238-47. (Persian)
17. Baghbani-arani F, Tajbakhsh M, Hashemi SA, Rajai B, Siadat SD, Aghasadeghi MM, Sadat SM. Molecular Typing of Salmonella paratyphi B and Salmonella paratyphi C Isolated from Clinical Samples in Iran. *J Fasa Univ Med Sci* 2012; 2(5): 19-25. (Persian)
18. Fard Saneii F, Seyfi M, Eshraghi S, Mardani N. Genotyping of Salmonella enteritidis isolated from human and foods by ERIC-PCR. *Tropical and infectious disease* 2010; 15(51): 7-13. (Persian)
19. Gopa N, Pushpa P, Anil KG. ERIC PCR and RAPD based fingerprinting of Salmonella paratyphi strains isolated over a period of two decades. *Infect Genet Evol* 2010; 10: 530-6.
20. Lim H, Lee KH, Hong CH, Bahk GJ, Choi WS, Comparison of four molecular typing methods for the differentiation of Salmonella spp. *Int J Food Microbiol* 2005, 105, 411-8.

21. Oliveira SD, Bessa MC, Santos LR, Cardoso MR, Canal CW. Phenotypic and genotypic characterization of *Salmonella enteritidis* isolates. *Brazil J Microbiol* 2007; 38: 720-5.
22. Cheielewsk R, Wieliczko A, Kuczkowski M. Comparison of profiling Rep and ERIC PCR of *Salmonella enteritidis*. *J Vet Med Sci* 2001; 49: 163-8.

## EVALUATION OF GENETIC DIVERSITY OF SALMONELLA ENTERICA SEROVAR ENTERITIDIS ISOLATED FROM HUMAN AND ANIMALS SAMPLES BY ERIC-PCR

Farzaneh Pourhasan Sangari<sup>1</sup>, Kumarss Amini<sup>2\*</sup>, Gholamali Moradli<sup>3</sup>

Received: 12 Apr, 2016; Accepted: 9 June, 2016

### Abstract

**Background & Aims:** Salmonellosis is one of the vital infectious zoonotic diseases in both human and animals that is related with poultry, meat, egg and milk consumption. The aim of this study was evaluation of genetic diversity of Salmonella enterica serovar enteritidis isolated from human and animals samples by ERIC-PCR method.

**Materials & Methods:** In this cross-sectional study, 60 Salmonella enterica serovar enteritidis were obtained from the human and animals. Detection of strains were performed by standard microbiological and biochemical tests and slide agglutination assay were done for serotyping of the strains by mono and polyvalent antisera. Then, ERIC-PCR was achieved for determination of molecular correlation of the strains by specific oligonucleotides primers.

**Results:** The results showed that, all 60 S. enterica using ERIC 1 and ERIC 2 were type II. And 2-11 bands with 20-3200 bp were obtained. Therefore, 15 different clusters (C1-C15) were attained and that highest number (13.3%, 8 strains) with like pattern were in cluster 5 (C5).

**Conclusion:** The results showed that Salmonella enterica serovar enteritidis strains are non-homolog. So, ERIC-PCR method is an appropriate method for molecular typing of Salmonella strains and infection spread source determination used for epidemiologic survey and infection prevention pathway.

**Keywords:** Salmonella enterica, Molecular Typing, ERIC-PCR

**Address:** Department of Microbiology, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran

**Tel:** +9842241511

**Email:** Dr\_kumarss\_amini@yahoo.com

SOURCE: URMIA MED J 2016; 27(5): 418 ISSN: 1027-3727

<sup>1</sup>M.S. in Microbiology, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran

<sup>2</sup> Assistant Professor, Department of Microbiology, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran (Corresponding Author)

<sup>3</sup> Assistant Professor, Department of Microbiology, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran