Original Article

تایپینگ ملکولی سویه‌های *سالمونلا پاراتیفی* B و *سالمونلا پاراتیفی* C جداشده از نمونه‌های بالینی در ایران

فهیمه باغبانی آرانی[1*]، مرسده تـاج بخش[2]، عطیه هاشمی سلطانیه[3]، بهـاره رجـایی[3]، سید داور سیادت[3]، محمد رضا آقا صادقی[3] سید مهدی سادات[3]

۱- گروه ژنتیک، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین- پیشوا، ورامین، ایران.
۲- مرکز تحقیقات گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.
۳- بخش هپاتیت و ایدز، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۱۰/۱۲ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۱/۰۲/۰۲

چکیده

زمینه و هدف: تایپینگ ملکولی ابزاری قوی در کنترل و شناسایی سویه‌های *سالمونلا* می‌باشد. در این مطالعه، به منظور بررسی تنوع ژنتیکی سویه‌های *سالمونلا پاراتیفی* B و *سالمونلا پاراتیفی* C جدا شده از بیماران ایرانی، ساب‌تایپینگ این سویه‌ها با روش RAPD-PCR انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها: ۱۴ ایزوله *سالمونلا* شامل ۶ سویه *سالمونلا پاراتیفی* B و ۸ سویه *پاراتیفی* C با روش RAPD-PCR مورد آنالیز قرار گرفتند. دو پرایمر مربوط به RAPD به نام‌های OPP-16 و P1254 استفاده شده و دندروگرام مربوطه با نرم‌افزار NTsys 2.0 ترسیم گردید.

نتایج: هر دو پرایمر قدرت بالایی را در تمایزدهی بین سویه‌های مرتبط و نزدیک *سالمونلا* نشان دادند. دندروگرام‌های به دست آمده بر اساس پروفایل حاصل از هر دو پرایمر RAPD، ۴ گروه مجزا را در بین ۱۴ سویه مورد مطالعه نشان می‌دهد که به نوعی بیان‌گر ناهمگونی ژنتیکی این سویه‌ها است. هم‌چنین ارتباطی بین سروتایپ و پروفایل حاصل از RAPD-PCR در بین سویه‌های *سالمونلا* مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: در مجموع نتایج حاصل از این مطالعه توانایی RAPD-PCR را در بررسی ملکولی و مقایسه سویه‌های *سالمونلا پاراتیفی* B و C نشان می‌دهد.

کلمات کلیدی: *سالمونلا*، NTsys، RAPD، تنوع ژنتیکی

مقدمه

باکتری *سالمونلا* به عنوان یک عامل بیماری‌زای قابل انتقال از طریق مواد غذایی، مسئول ایجاد بیماری در حیوان و انسان بوده و تاکنون اپیدمی‌های متعددی در دنیا ناشی از این باکتری گزارش شده است. پرندگان و دام‌ها منابع اصلی این باکتری هستند و آلودگی مواد غذایی حاصل از آن‌ها با این باکتری، باعث ایجاد بیماری گوارشی در انسان می‌شود (۱). از مهم‌ترین عوارض گوارشی ناشی از این باکتری تب روده‌ای است که به عنوان یک عامل تهدیدکننده حیات مطرح بوده و سالیانه بالغ بر ۲۰ میلیون نفر را در دنیا مبتلا می‌سازد که از بین آن‌ها حدود ۲۰۰۰۰۰ نفر می‌میرند. بر اساس گزارشات سازمان بهداشت جهانی بیش از ۹۰% تب‌های روده‌ای در کشورهای آفریقایی و آسیایی به ویژه آسیای جنوب شرقی رخ می‌دهد، که علت عمده آن عفونت با سویه‌های *سالمونلا انتریکا* سرواز *تیفی* و *سالمونلا انتریکا* سرواز *پاراتیفی* A، B و C می‌باشد (۲).

برای کنترل و نظارت اپیدمیولوژیک مؤثر، نیاز به تشخیص و تمایز سویه‌ها و ساب‌تایپینگ دقیق آن‌ها به منظور شناسایی منابع بـالقوه عفونت است. بسیاری از روش‌های کلاسیک تایپینگ مانند پلاسمید تایپینگ، سروتایپینگ، آنتی‌بیوگرام و فاژتایپینگ نه تنها پر هزینه و زمان‌بر هستند بلکه قدرت تمایزدهی بین سویه‌های نزدیک و مرتبط را ندارند و بنابراین امروزه ما شاهد افزایش توجه نسبت به توسعه و به‌کارگیری روش‌های ملکولی در این زمینه هستیم. به طوری که روش‌هایی مانند REP-PCR (۱ و ۳-۴)، PFGE (۶-۴)، Ribotyping (۷ و ۸) و RAPD-PCR (۹ و ۱۰) برای بررسی و تفرق سویه‌های سالمونلا به کار رفته است. از بین روش‌های ذکر شده، RAPD-PCR روشی مناسب جهت مقایسه کلی ژنوم در کم‌ترین زمان و با قدرت تمایز مناسب می‌باشد. در این روش از پرایمرهای اولیگونوکلئوتیدی کوتاه و تصادفی استفاده شده و پس از PCR، پروفایلی از قطعات DNA حاصل می‌شود که مقایسه پروفایل نمونه‌های مختلف تفاوت ژنتیکی بین آن‌ها را نشان می‌دهد (۱۱ و ۱۲). تاکنون از این روش برای بررسی تنوع ژنتیکی گیاهان (۱۳) حیوانات (۱۴) انگل‌ها (۱۵) و دیگر میکروارگانیسم‌ها (۱۶ و ۱۷) نیز استفاده شده است.

* **نویسنده مسئول: فهیمه باغبانی آرانی**، گروه ژنتیک، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین ـ پیشوا، ورامین، تهران، ایران، تلفن: ۰۲۹۲-۲۲۲۵۰۱۱
Email: fbaghbani@iauvaramin.ac.ir

با توجه به این که آگاهی از میزان تنوع ژنتیکی سویه‌های باکتریایی مربوط به یک ناحیه در ردیابی منبع آلودگی در اپیدمی‌های ناشی از باکتری مهم می‌باشد و در حال حاضر اطلاعاتی در مورد هتروژنیسیتی ایزوله‌های بالینی *سالمونلا پاراتیفی* B و C جدا شده از بیماران ایرانی وجود نداشته و مطالعه‌ای جهت تایپینگ این سویه‌ها انجام نشده است؛ بنابراین مطالعه حاضر جهت بررسی پلی‌مورفیسم ژنتیکی این سویه‌ها در ایران با استفاده از روش RAPD-PCR صورت پذیرفت. هم‌چنین در این مطالعه تلاش می‌گردد که کارایی این روش ملکولی در تایپینگ سویه‌های مربوطه ارزیابی گردید.

مواد و روش‌ها

در مطالعه حاضر که به صورت توصیفی انجام پذیرفته است در مدت زمان ۱۷ ماه نمونه‌های مدفوع بیماران اسهالی مراجعه کننده به چند بیمارستان در تهران از نظر وجود *سالمونلا پاراتیفی* B و *سالمونلا پاراتیفی* C مورد بررسی قرار گرفت. طبق روش‌های استاندارد نمونه ۲ های به دست آمده از بیمار به محیط کشت کری بلر منتقل شد. سپس در آزمایشگاه بر روی محیط‌های XLD و هکتون انتریک آگار کشت داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. پس از آن کلونی‌های مشکوک به *سالمونلا* جداسازی شده و با کشت روی محیط‌های TSI، لیزین، سیترات، MRVP و اوره از نظر تست‌های بیوشیمیایی استاندارد بررسی گردید. در نهایت با استفاده از آنتی‌سرم‌های اختصاصی، سروتایپ سویه‌ها به روش slide-agglutination تعیین گردید.

به منظور استخراج DNA ژنومی، ابتدا باکتری‌ها روی محیط LB آگار کشت داده شدند. سپس یک کلونی از باکتری به محیط LB-broth منتقل شد و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، محیط کشت حاوی باکتری سانتریفوژ شده و رسوب باکتری جدا گردید. رسوب حاصله با سرم فیزیولوژی شستشو و پس از آن در بافر لیز کننده حاوی SDS و پروتئیناز k حل گردید. پس از لیز باکتری‌ها، DNA آن‌ها با روش فنل- کلروفرم استخراج گردید (۱۸).

در این مطالعه از دو پرایمر OPP-16 (10-mer) با توالی 5′ CCAAGCTGCC 3′ و P1254 (10-mer) با توالی 5′ CCGCAGCCAA 3′ برای انجام RAPD-PCR استفاده شد. PCR در حجم 25µl حاوی 2.5µl از 250mM، 10x PCR buffer از dNTP، 1U از آنزیم Taq DNA polymerase، 25 pmol پرایمر، 2mM کلرید منیزیم و DNA 40ng صورت پذیرفت. برنامه PCR بر اساس ۹۵ درجه دناتوراسیون اولیه به مدت ۵ دقیقه و ۴۰ سیکل با دناتوراسیون در ۹۴ درجه به مدت ۱ دقیقه، دمای اتصال ۳۵ درجه به مدت ۱ دقیقه و طویل سازی ۷۲ درجه به مدت ۲ دقیقه و ۱۰ ثانیه طویل‌سازی نهایی در درجه ۷۲ بهینه گردید.

تکرارپذیری RAPD-PCR برای هر پرایمر با انجام حداقل دو آزمایش برای هر نمونه، مورد تأیید قرار گرفت. در کنترل منفی PCR در یک لوله بدون حضور DNA انجام شد. محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۲% به مدت ۲ ساعت الکتروفورز شدند. در نهایت رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید انجام و عکس‌برداری از ژل تحت اشعه UV صورت پذیرفت. در هر ژل برای تعیین اندازه قطعات به دست آمده از استاندارد جرم ملکولی (1kb DNA ladder) استفاده گردید.

برای آنالیز نتایج، باندهای حاصله که در محدوده ۳۵۰۰-۲۵۰ جفت باز بوده و دارای تکرارپذیری بالایی بودند انتخاب و وارد محاسبات گردید به طوری که حضور یک باند با عدد ۱ و عدم حضور باند با عدد ۰ رمزگذاری شد. سپس ماتریکس تشابه بین سویه‌ها با استفاده از ضرایب تشابه Simple matching و Dice با استفاده از نرم‌افزار NTsys (2.0) (۱۹) محاسبه شد و دندروگرام مربوطه با روش‌های UPGMA و WPGMA رسم گردید. در نهایت ضریب کوفنتیک بین دندروگرام و ماتریکس‌های مربوطه محاسبه و با استفاده از آزمون مانتل ضریب همبستگی تعیین گردید به طوری که همبستگی بالا نشان‌دهنده روش بهینه خواهد بود. پس از انتخاب روش بهینه آنالیز کلاسترها انجام پذیرفت.

نتایج

نتایج حاصل از RAPD-PCR نشان می‌دهد که تمامی سویه‌های تحت مطالعه با هر دو پرایمر مورد استفاده قابل تایپ بودند به طوری که پرایمر P1254 در مجموع ۲۰ باند مجزا در محدوده bp ۳۵۰۰-۳۰۰ ایجاد کرده که از بین آن‌ها ۴ باند در همه سویه‌ها مشترک و ۱۶ باند پلی‌مورف بودند. پرایمر OPP-16 ۱۸ باند مجزا در محدوده bp ۳۰۰۰-۲۰۰ تولید می‌کند که در بین باندهای حاصل از این پرایمر نیز ۴ باند در همه سویه‌ها مشترک و ۱۴ باند پلی‌مورف مشاهده می‌گردد (شکل ۱).

به طور کلی آنالیز شکل‌ها و دندروگرام حاصل از آن‌ها (شکل ۱ و ۲) نشان می‌دهد که در هر دو پرایمر مورد استفاده، تمامی نمونه‌ها در ۴ کلاستر مجزا قرار می‌گیرند (جدول ۱). به طوری که در پرایمر P1254 کلاستر II تنها یک نمونه (PAC3) را در بر می‌گیرد

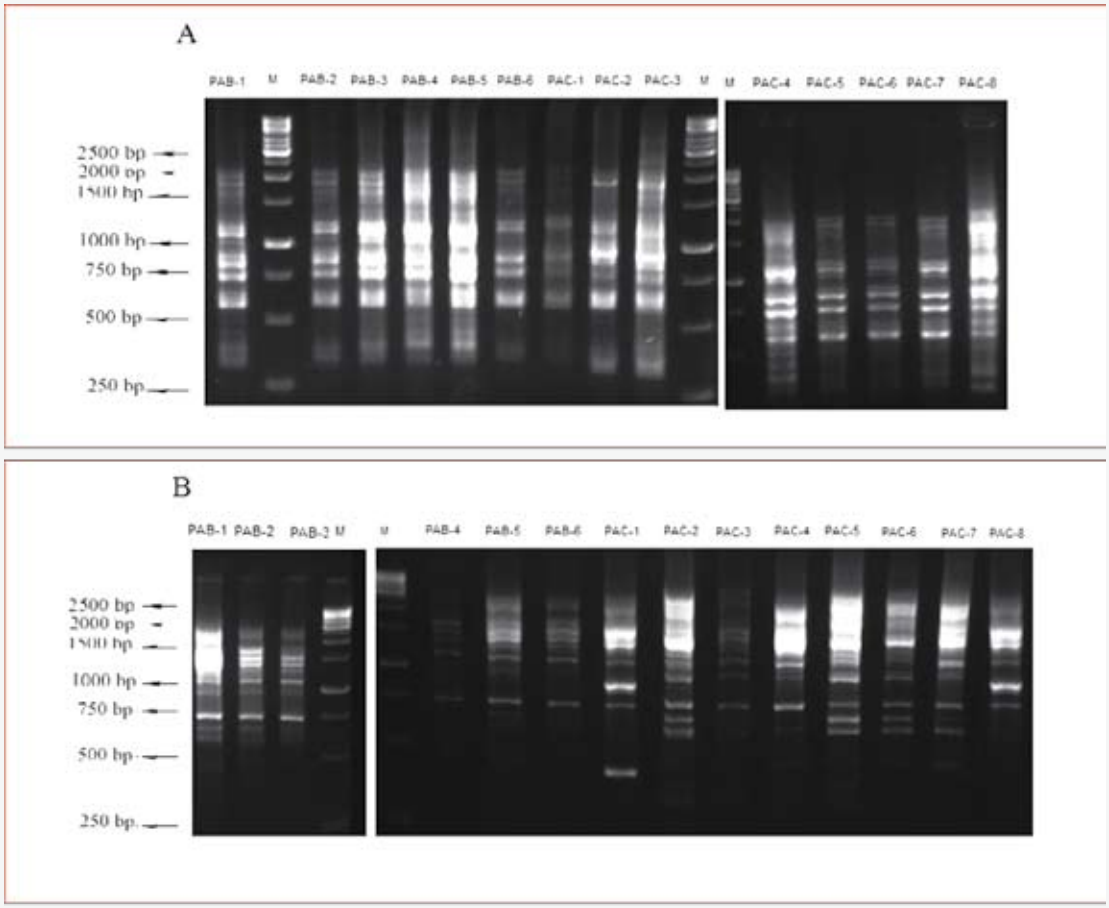
جدول ۱: گروه‌های کلاستری مختلف *سالمونلا* حاصل از آنالیز با دو پرایمر جداگانه RAPD-PCR. سویه‌های *پاراتیفی* B به صورت PAB و سویه‌های *پاراتیفی* C به صورت PAC مشخص شده‌اند.

ردیف	نتایج حاصل از پرایمر P1254		نتایج حاصل از پرایمر OPP-16	
	سویه های مربوطه	گروه های کلاستری	سویه های مربوطه	گروه های کلاستری
۱	PAB1,PAB2,PAB3,PAB4,PAB5	I	PAB1, PAC1	I
۲	PAC3	II	PAB2,PAB3,PAB4	II
۳	PAB6,PAC1,PAC2	III	PAB5, PAB6, PAC2,PAC3, PAC4, PAC5, PAC7,PAC6	III
۴	PAC4,PAC5,PAC6,PAC7,PAC8	IV	PAC8	IV

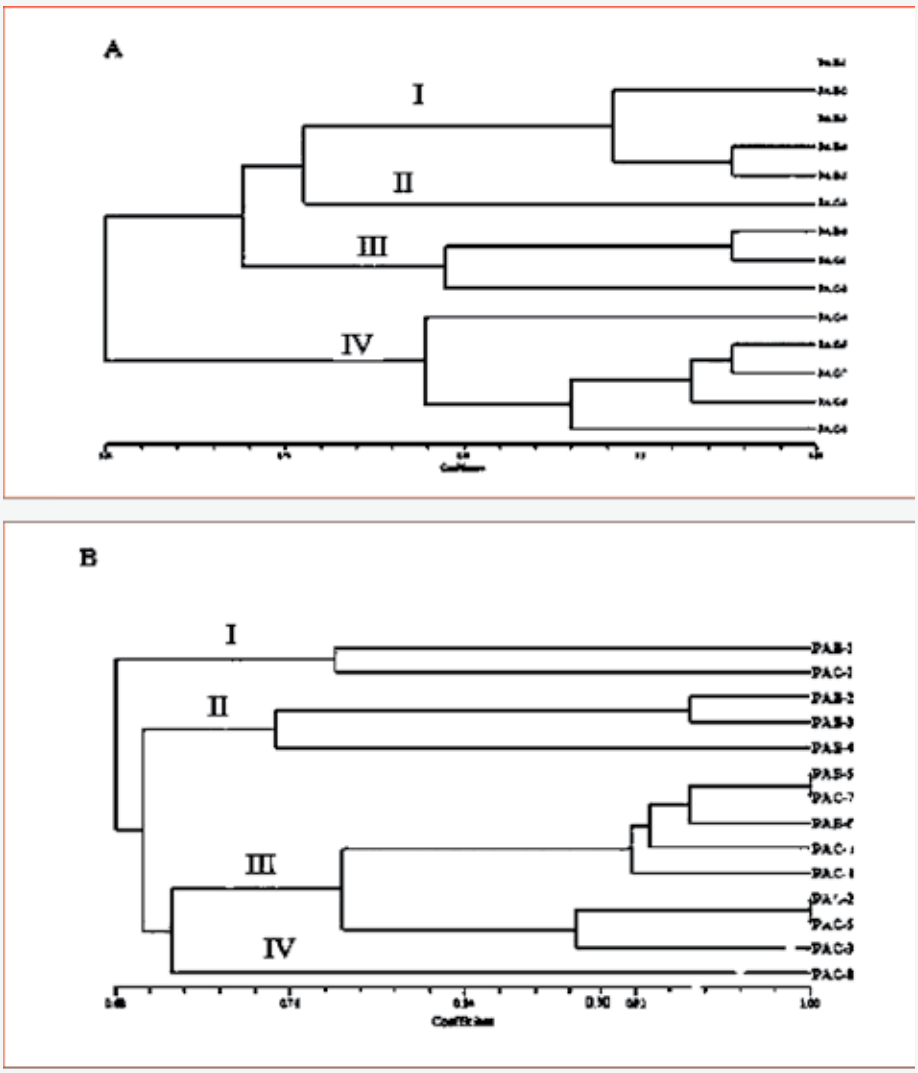
و بقیه گروه‌ها هر کدام حاوی چندین نمونه *سالمونلا* می‌باشند. در کلاسترهای I و IV تمامی نمونه‌ها متعلق به یک سروتیپ هستند و تنها کلاستر III اعضای هر دو سروتیپ را در خود جای می‌دهد. در کلاسترهای حاصل از پرایمر OPP-16 کلاستر III بیشترین تعداد نمونه (۸ نمونه) را شامل شده در حالی که کلاستر IV تک سویه می‌باشد. کلاستر II نیز تنها چند سویه *پاراتیفی* B را در بر می‌گیرد.

بحث

امروزه روش‌های مولکولی برای شناسایی و تمایز بین میکروارگانسیم‌ها، بسیار کارآمدتر و مؤثرتر از روش‌های فنوتیپی و کلاسیک قدیمی می‌باشند. در این بین روش ملکولی RAPD-PCR به دلیل ویژگی‌هایی مانند سریع و کم هزینه بودن، برخورداری از حساسیت زیاد و عدم نیاز به مهارت تکنیکی بالا، مورد توجه می‌باشد. به طوری که در چندین مورد از اپیدمی‌های باکتریایی توانستند با این روش منبع آلودگی را پیدا کنند (۲۰ و ۲۱). از طرفی مطالعات متعدد نشان داده است که با بررسی پرایمرهای مختلف RAPD-PCR و انتخاب پرایمرهای مناسب، این روش به خوبی می‌تواند جهت تمایزگذاری و بررسی تنوع ژنتیکی سویه‌های *سالمونلا* به کـار رود. بنـابراین در این مطالعه از دو پرایمر RAPD-PCR (OPP-16 و P1254) که در مطالعات پیشین بر روی *سالمونلا* و سایر انتروباکتریاسه‌ها نتایج قابل قبولی را نشان داده است، استفاده شد (۲۶-۲۲)، با این روش ملکولی وضعیت تنوع و پلی‌مورفیسم ژنتیکی سویه‌های متعلق به دو سروتایپ متفاوت از *سالمونلا* (*سالمونلا پاراتیفی* C و *سالمونلا پاراتیفی* B) که از بیماران ایرانی جدا شده بود، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این مطالعه ناهمگونی زیادی را در بین سویه‌های مورد مطالعه نشان داد به طوری که با مقایسه الگوی باندی سویه‌ها در مورد هر دو پرایمر به کار گرفته شد، ۱۴ سویه مورد مطالعه در ۴ گروه کلاستری مختلف قرار می‌گیرند. این در حالی است که با پرایمر P1254 تمامی سویه‌ها از هم مجزا شده و الگوی متفاوتی نشان دادند، که هم نشان‌دهنده قدرت تمایز بالای این پرایمر و در عین حال پلی‌مورفیسم سویه‌های مورد مطالعه است. در مطالعه دیگری که در آن از پرایمر P1254 برای تایپینگ *سالمونلا*های ایران استفاده شده بود، ۳۰ سویه *سالمونلا انتریتیدیس* و ۳۰ سویه *سالمونلا تیفی موریوم* به ترتیب در ۷ و ۴ گروه مجزا قرار گرفتند. این سویه‌ها هم از منابع بالینی و هم حیوانی به دست آمده بودند (۲۲). به طور کلی این شواهد نشان می‌دهد که سروتایپ‌های مختلف *سالمونلا*های شایع در ایران نسبتاً ناهمگون بوده و تنوع ژنتیکی بالایی دارند. هرچند به نظر می‌رسد این تنوع در سروتایپ‌های *پاراتیفی* C و *پاراتیفی* B بیشتر باشد.



شکل ۱: نتایج حاصل از RAPD-PCR برای ۱۴ سویه *سالمونلا*. A: الگوی باندی حاصل از پرایمر P1254 . B: الگوی باندی حاصل از پرایمر OPP-16. M: استاندارد جرم ملکولی (1kb DNA ladder).



شکل ۲: دندروگرام حاصل از الگوی باندهای RAPD-PCR ۱۴ سویه‌های *سالمونلا*. A: دندروگرام حاصل از پرایمر P1254. B: دندروگرام حاصل از پرایمر OPP-16

نتایج این مطالعه علاوه بر این که پلی‌مورف بودن سویه‌های مورد مطالعه را نشان می‌دهند، به این نکته نیز اشاره دارد که روش RAPD-PCR به خوبی می‌تواند سویه‌های *سالمونلا* به ویژه سویه‌های متعلق به یک گروه سروتایپی را از هم تشخیص داده و متمایز کند. به طوری که هر دو پرایمر OPP-16 و P1254 در این مطالعه توانستند تمامی سویه‌ها را مورد آنالیز قرار داده و برای اکثر سویه‌ها الگوی انگشت‌نگاری مجزایی ایجاد کنند. این نتایج در تأیید مطالعات قبلی است که قدرت بالای RAPD-PCR در تایپینگ *سالمونلا* را نشان می‌دهد (۲۲ و ۲۶-۹). نتایج ما نشان می‌دهد که از بین دو پرایمر به کار رفته در این مطالعه پرایمر P1254 قوی‌تر عمل می‌کند، زیرا در مورد این پرایمر هیچ دو سویه‌ای الگوی باندی صد در صد مشابهی نداشتند. مطالعات دیگری نیز این پرایمر را به عنوان پرایمری قوی معرفی کردند به طوری که در سال Fernanda 2007 و همکاران، کاربرد RAPD را برای تایپینگ ۸۵ سویه سالمونلا که ۷۹ عدد آن *سالمونلا انتریتیدیس* و بقیه از سروتایپ‌های دیگر بودند و در اپیدمی‌ها جمع‌آوری شده بودند، بررسی کردند که نتایج آن‌ها نشان داد پرایمر P1254 بهترین پرایمر در تایپینگ و تمایزدهی بین سویه‌ها است (۲۵).

مقایسه الگوی باندی سویه‌ها و آنالیز دندروگرام حاصل از آن (شکل ۱و ۲) نشان می‌دهد که هر چند بیشتر سویه‌های مربوط به یک سروتایپ در کلادهای نزدیک به هم قرار دارند اما در سطح تشابه ۱۰۰٪، اکثر سویه‌های متعلق به یک سروتایپ از یکدیگر تفکیک می‌شوند. به عبارتی نمی‌توان ارتباطی بین الگوی باندی حاصل از RAPD-PCR و سروتایپ‌های *پاراتیفی* B و *پاراتیفی* C برقرار کرد، که این موضوع را مطالعات دیگری نیز تأیید می‌کنند (۹).

استاندارد کردن روش RAPD-PCR و تهیه بانک‌های اطلاعاتی از الگوهای ژنومی، مقایسه سریع و دقیق سویه‌های *سالمونلا* را در بین آزمایشگاه‌های مختلف امکان‌پذیر می‌کند و در تشخیص سریع آغاز یک اپیدمی و ردیابی منشأ آلودگی و در پی آن مدیریت کنترل عفونت اهمیت دارد. از این رو مطالعه حاضر از یک طرف با فراهم کردن اطلاعاتی در مورد تنوع ژنتیکی سویه‌های *سالمونلا*، و از طرف دیگر با بهینه‌سازی روش RAPD-PCR و نشان دادن توانایی دو

پرایمر OPP-16 و P1254 در تایپینگ *سالمونلا*، در توسعه این دیدگاه و به‌کارگیری آن در مدیریت بهداشتی کشور حائز اهمیت می‌باشد.

نتیجه‌گیری

این بررسی که برای اولین بار روی سویه‌های *سالمونلا پاراتیفی* B و *سالمونلا پاراتیفی* C جدا شده از بیماران ایرانی انجام شده نشان داد که این سویه‌ها از نظر ژنتیکی بسیار هتروژن می‌باشند. همچنین نتایج بیان‌گر توانایی RAPD-PCR در تمایزدهی این سویه‌ها به ویژه در مورد پرایمر P1254 می‌باشد. البته با توجه به محدود بودن تعداد نمونه‌ها و یکسان بودن منبع جداسازی آن‌ها لازم است بررسی روی سویه‌های بیشتری با منابع غیر بالینی (منبع غذایی و حیوانی) نیز صورت پذیرد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش تحت حمایت مالی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین-پیشوا در قالب طرح پژوهشی صورت پذیرفته که بدین وسیله نویسندگان مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از مسئولان آن واحد دانشگاهی ابراز می‌دارند.

References

1. Rasschaert G, Houf K, Imberechts H, Grijspeerdt K, De Zutter L, Heyndrickx M. Comparison of five repetitive-sequence-based PCR typing methods for molecular discrimination of Salmonella enterica isolates. J 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. Weigel R.M, Qiao B, Teferedegne B, Suh DK, Barber DA, Isaacson RE, et.al. Comparison of pulsed field gel electrophoresis and repetitive sequence polymerase chain reaction as genotyping methods for detection of genetic diversity and inferring trans-mission of Salmonella. Vet Microbiol. 2004;100(3–4):205–217.
5. Thong K L, Cheong Y M, Puthucheary S, Koh CL, Pang T. Epidemiologic analysis of sporadic Salmonella typhi isolates and those from outbreaks by pulsed-field gel electrophoresis. J Clin Microbiol. 1994;32:1135-1141.
6. Thong K L, Puthucheary S, Yassin R M, Sudarmono P, Padmidewi M, Soewandojo E, et.al. Analysis of Salmonella typhi isolates from Southeast Asia by pulsed-field gel electrophoresis. J Clin Microbiol. 1995;33:1938-1941.
7. Altwegg M, Hickman-Brenner F W, Farmer J J. Ribosomal RNA gene restriction patterns provide increased sensitivity for typing Salmonella typhi strains. J Infect Dis. 1989;160:145-149.
8. Pang T, Altwegg M, Martinetti G, Koh C L, Puthucheary S. Genetic variation among Malaysian isolates of Salmonella typhi as detected by ribosomal RNA gene restriction patterns. Microbiol Immunol. 1992;36:539-543.
9. Khoodoo MHR, Issack MI, Jaufeerally-Fakim Y. Serotyping and RAPD profiles of Salmonella enterica isolates from Mauritius. Lett Appl Microbiol. 2002;35:146–152.
10. Shangkuan YH, Lin HC. Application of random amplified polymorphic DNA analysis to differentiate strains of Salmonella typhi and other Salmonella species. J Appl Microbiol. 1998;85(4):693–702.
11. Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res. 1990;18:7213–7219.
12. Williams JGK, Kubellick AR, Livak KJ, Rafalski, JA, Tingey SV. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 1990;18:6531–6535.
13. Shanmugam R Fei S, Christians N.E. Analysis of genetic diversity in rough bluegrass determined by RAPD markers. Plant Genet Resour. 2005;46:162– 167.
14. Spiridonava L, Chelomina G, Starikov V, Korablev V, Zvirka M, Lyapunova E. RAPD-PCR analysis of ground squirrels from the Tobol-Ishim interfluve: Evidence for interspecific hybridization between ground squirrel species Spermophilus major and S. erythrogenys. Russ J Genet. 2005;41(9):991–1001.
15. Morozova EV, Ryskov AP, Semyenova SK. RAPD variation in two Trematode species (Fasciola hepatica & Dicrocoelium dendriticum) from a single cattle population. Russ J Genet. 2002;38(8):977–983.
16. Byun SK, Jung SC, Yoo HS. Random amplific-ation of polymorphic DNA typing of Listeria mono-cytogenes isolated from meat. Int J Food Microbiol. 2001;69:227–235.
17. Ertas HB, Seker E. Isolation of Listeria mono-cytogenes from fish intestines and RAPD analysis. J Vet Anim Sci. 2005;29:1007–1011.
18. Maniatis T, fritsch EF and sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual. cold spiring harbor laboratory, cold spiring harbor N.Y. 1982;76-85.
19. Rohlf FJ. NTSYS-pc, Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Version 2.00. Exeter Software: Setauket, NY. 1998.
20. Nucci C, da Silveira WD, da Silva Correa S, Nakazato G, Bando SY, Ribeiro MA, et al. Microbiological comparative study of isolates of Edwardsiella tarda in different countries from fish and humans. Vet Microbiol. 2002;89:29-39.
21. Pereira MS, Leal NC, Leal TCA, Sobreira M, de Almeida AMP, Siqueira-Junior JP, et.al. Typing of human and bovine Staphylococcus aureus by RAPD-PCR and ribotyping-PCR. Lett Appl Microbiol. 2002;35:32-36.
22. Madadgar O, Zahraei Salehi T, Tadjbakhsh H, Mahzounieh M, Feizabadi M M. Genomic and phenotypic evaluation of

Salmonella typhimurium and Salmonella enteritidis in Iran. Comp Clin Pathol. 2008;17:229–235.
23. Zahraei Salehi T, Madadgar O, Ghafari M M, Ashrafi Tamai, Madani S. Molecular epidemiology of systemic Salmonella enterica serovar Typhimurium outbreak in canaries. Iran J Microbiol. 2009;1(3):7–11.
24. Albufera U, Bhugaloo-Vial P, Issack MI, Jaufeerally-Fakim Y. Molecular characterization of Salmonella isolates by REP-PCR and RAPD analysis. Infect Genet Evol. 2009;9:322–327.
25. Fernanda A, Oliveira D, Frazzon PG, Brandelli A, Tondo C. Use of PCR-ribotyping, RAPD, and antimicrobial resistance for typing of Salmonella enteritidis involved in food-borne outbreaks in Southern Brazil. J Infect Developing Countries. 2007;1(2):170-176.
26. Nath G, Maurya P, Gulati AK. ERIC PCR and RAPD based fingerprinting of Salmonella Typhi strains isolated over a period of two decades. Infect Genet Evol. 2010;10(4):530-536.

Original Article

Molecular Typing of *Salmonella paratyphi* B and *Salmonella paratyphi* C Isolated from Clinical Samples in Iran

Baghbani-arani F[1*], Tajbakhsh M[2], Hashemi SA[3], Rajai B[3], Siadat SD[3], Aghasadeghi MM[3], Sadat SM[3]

1- Department of Genetics, Varamin-Pishva branch, Islamic Azad University, Varamin, Tehran, Iran.
2- The Research Center for Gastroentrology and Liver Diseases, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
3- Department of Hepatitis and AIDs, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.

Abstract

Background & Objective: Molecular typing is an important tool in surveillance and outbreak investigations of human Salmonella infections. In this study, Subtyping of *Salmonella Paratyphi* B and C isolates derived from Iranian patients was carried out by RAPD-PCR to assess the extent of genetic diversity of these isolates.

Materials & Methods: Fourteen *Salmonella* isolates including 6 strains of *Salmonella paratyphi* B and 8 strains of *Salmonella paratyphi* C were characterized using RAPD-PCR. Two arbitrary primers, namely OPP-16 and P1254 were used for RAPD analysis and the dendrograms were constructed with NTsys 2.0 computer software.

Results: Both primers showed high discriminatory power in differentiating of the related strains of *Salmonella*. The dendrograms constructed based on RAPD-PCR profiles (with both primers) involving 14 salmonella strains revealed 4 distinct patterns, indicating that these isolates are genetically heterogeneous. Furthermore, a good correlation was not observed between the serotype and the molecular profiles obtained from RAPD data of the Salmonella isolates.

Conclusion: The findings of the present study verify the usefulness of RAPD-PCR in characterizing and comparing strains of *Salmonella Paratyphi* B and C.

Keywords: *Salmonella*, RAPD-PCR, NTsys, Genetic Diversity

*** Corresponding author: Baghbani-arani Fahimeh,** Department of Genetics, Varamin- Pishva branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran.
Tel: +98 292 2225011
Email: fbaghbani@iauvaramin.ac.ir

Journal of Fasa University of Medical Sciences/ May 2012/ Vol.2/ No.5/ P 19-25