ساب‌تایپینگ ایزوله های سالمونلا انتریکا متعلق به سروتایپ‌های مختلف با روش PCR-Ribotyping

نیلوفر ابراهیمی رشتی [۱]، فهیمه باغبانی آرانی [۲*]، سید داور سیادت [۳]

۱. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین- پیشوا ، دانشکده علوم زیستی، گروه میکروبیولوژی، ورامین، ایران
۲. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین- پیشوا ، دانشکده علوم زیستی، گروه ژنتیک و بیوتکنولوژی، ورامین، ایران
۳. انیستیتو پاستور ایران، گروه باکتری شناسی، تهران، ایران

* **مسئول مکاتبات:** دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین- پیشوا، دانشکده علوم زیستی، گروه ژنتیک و بیوتکنولوژی، ورامین، ایران، آدرس الکترونیکی: fbaghbani@iauvaramin.ac.ir

محل انجام تحقیق: دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین- پیشوا

تاریخ دریافت: ۹۵/۵/۶ تاریخ پذیرش: ۹۵/۷/۱۲

فصلنامه علمی پژوهشی دانش زیستی ایران
جلد ۱۰- شماره ۳- پاییز-۱۳۹۴

چکیده

سالمونلا به‌عنوان یک عامل اصلی مسمومیت غذایی در دنیا مطرح است. به علت اهمیت پاتوژنیک این باکتری تایپینگ و شناسایی سریع آن با روش های ملکولی، جهت پیشبرد بررسی های اپیدمیولوژیک، امری ضروری به شمار می‌رود. لذا در مطالعه حاضر امکان تمایزدهی سویه‌های سالمونلا در حد سروتایپ با آنالیز پلی‌مورفیسم ناحیه بین ژنی 16 S-23SrRNA بررسی گردید. بدین منظور هفتاد و یک سویه سالمونلا با سروتایپ/سروگروپ های مختلف جداشده از بیماران دارای علایم بالینی عفونت سالمونلوز وارد مطالعه شدند. پس از تایید سویه ها با روش فنل/کلروفرم استخراج DNA ژنومیک صورت گرفت و نهایتا سویه ها با PCR-Ribotyping مورد آنالیز قرار گرفتند. در این مطالعه تکنیک PCR-Ribotyping توانست ۷۱ سویه سالمونلا را در ۴ کلاستر مختلف از هم تفکیک کند. همچنین نتایج نشان داد که سویه‌های متعلق به سروتایپ انتریتیدیس از هموژنیسیته ژنتیکی بالایی برخوردارند. در مجموع یافته‌های پژوهش حاضر بیان می کند که تکنیک PCR-Ribotyping دارای قدرت تمایز قابل قبولی برای تایپینگ سویه های بالینی سالمونلا می باشد اما قادر نیست سروتیپ‌های مختلف سالمونلا را از یکدیگر جداسازد.

کلمات کلیدی: سالمونلا,PCR-Ribotyping , ساب‌تایپینگ، سروتایپ

مقدمه

باکتری سالمونلا به‌عنوان یکی از عوامل بیماری‌های ناشی از غذا و اسهال در انسان مطرح می‌باشد. همچنین، این باکتری‌ها باعث ایجاد بیماری در حیوانات نیز می گردد (۱). جنس سالمونلا به خانواده انتروباکتریاسه تعلق داشته و باتوجه به مطالعات اخیر در زمینه تاکسونومی این باکتری، این جنس به بیش از ۲۵۰۰ سروتیپ تقسیم‌بندی شده‌است (۲). روش انتقال آن از راه مدفوع-دهان بوده و از این رو عامل بسیاری از اپیدمیولوژی‌ها می باشد (۱). با توجه به شیوع بالای این باکتری ، تشخیص و تمایز سویه‌ها و ساب-تایپینگ دقیق آن‌ها جهت شناسایی منابع بالقوه عفونت اجتناب‌ناپذیر می باشد. بسیاری از روش‌های کلاسیک تایپینگ (سروتایپینگ، آنتی بیوگرام ، فاژتایپینگ و ...) نه-تنها پرهزینه و زمان‌بر هستند، بلکه قدرت تمایزدهی بین سویه‌های نزدیک و مرتبط را ندارند. بنابراین امروزه شاهد افزایش توجه نسبت به بکارگیری روش‌های مولکولی هستیم به طوری‌که روش‌هایی مانند (۵ -۳) REP-PCR، PFGE (۷-۵) و RAPD-PCR (۹-۸) مورد توجه بیشتری قرار گرفته‌اند. از بین روش‌های ذکرشده, روش PCR-Ribotyping روش مناسبی جهت مقایسه کلی ژنوم در کمترین زمان و با قدرت تمایز مناست می‌باشد. این روش تیپ‌بندی بر اساس ژن‌های کدکننده RNA ریبوزومی باکتری می‌باشد و از جمله روش‌های نوین و دقیقی است که در بسیاری از مطالعات اپیدمیولوژیک بکار گرفته شده

است. با توجه به طراحی پرایمرها در این روش نهایتا پس از PCR پروفایلی از قطعات DNA حاصل می شود که مقایسه پروفایل نمونه‌های مختلف تفاوت ژنتیکی بین آن‌ها را مشخص می‌نماید (۱۰-۱۱). بنابراین در مطالعه حاضر تنوع ژنتیکی سویه‌های سالمونلا سروار انتریکا جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت سالمونلایی با روش PCR-Ribotyping مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

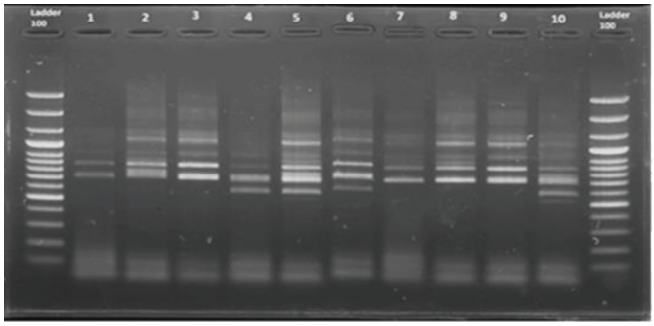
در این مطالعه از ۷۱ سویه سالمونلا انتریکای جداشده از نمونه‌های مدفوع, ادرار, خون, مایع مفصلی, آسیت, مغز-استخوان و آبسه بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان‌های میلاد و مرکز طبی کودکان تهران که در طی مدت ۲ سال جمع‌آوری شده‌بود، استفاده گردید. نمونه‌های اخذشده از بیماران بر روی محیط‌های کشت اختصاصی مانند Xylose Lysine Deoxycholate Agar (XLD) و Salmonella Shigella Agar (SS Agar) کشت داده شدند. سپس کلونی-های مشکوک به سالمونلا به محیط کشت سلنیت F منتقل و توسط تست‌های بیوشیمیایی و محیط‌های کشت افتراقی مانند TSI، MRVP، اوره، لیزین آیرون آگار و سیمون سیترات مورد تائید قرار گرفتند (۲). درنهایت با استفاده از آنتی‌سرم های اختصاصی، سروتایپ سویه‌ها به روش slide-agglutination تعیین گردید. پس از تایید سویه‌ها استخراج DNA ژنومی صورت‌پذیرفت. بدین منظور ابتدا باکتری‌ها در محیط LB-broth کشت داده شده و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه، محیط کشت حاوی باکتری سانتریفوژ شده و رسوب باکتری جدا گردید. رسوب حاصله در بافر لیز کننده حاوی SDS و پروتئیناز k حل گردیده و پس از لیز باکتری‌ها، DNA آن ها با روش فنل-کلروفرم استخراج گردید (۱۲). در این مطالعه برای انجام PCR-Ribotyping از پرایمرهای Rib (۱۳) استفاده گردید به طوری که توالی پرایمر Forward (5'TTGTACACACCGCCCGTCA3') و Reverse (5'GGTACCTTAGATGTTTCAGTTC3') می‌باشند. واکنش PCR برای هر نمونه سه بار تکرار شده و سپس باندهای تکرارپذیر در آنالیز وارد گردید.

مخلوط واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر آماده گردید به‌طوری که هر واکنش PCR حاوی ۱/۵ میلی‌مولار یون منیزیم (MgCl2)، ۰/۲ میلی‌مولار dNTPs، ۴۰ نانوگرم از ژنوم باکتری، ۱ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase و ۱۵ پیکوگرم از هر پرایمر بود. برنامه PCR بر اساس ۹۵ درجه دناتوراسیون اولیه به مدت ۴ دقیقه و ۳۵ سیکل با دناتوراسیون در ۹۴ درجه به مدت ۱ دقیقه, دمای اتصال ۵۳ درجه به مدت ۱ دقیقه, طویل‌سازی در ۷۲ درجه به مدت ۹۰ ثانیه و ۱۰ دقیقه طویل‌سازی نهایی در ۷۲ درجه بهینه گردید. محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱٪ به مدت ۲ ساعت در ولتاژ ۸۰ ولت الکتروفورز شد. درنهایت رنگ-آمیزی با اتیدیوم‌برماید انجام‌شده و عکس‌برداری از ژل با اشعه UV صورت گرفت. در هر ژل برای تعیین اندازه قطعات بدست آمده از استاندارد جرم مولکولی DNA Ladder 100 (bp) استفاده گردید. برای آنالیز نتایج PCR-Ribotyping باندهایی که دارای تکرارپذیری بالایی بودند انتخاب و وارد محاسبات شدند به طوری‌که حضور یک باند با عدد ۱ و عدم‌حضور باند با عدد ۰ کدگذاری شد. سپس آنالیز کلاسترها با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و براساس روش UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) انجام گرفت و در نهایت دندروگرام حاصل با استفاده از نرم‌افزار NTsys (2.0) رسم گردید.

نتایج

هفتاد و یک سویه جدا شده متعلق به سروتایپ‌های تایفی (۲۱ سویه)، پاراتایفی B (۴ سویه)، پاراتایفی C (۳ سویه)، انتریتیدیس (۱۰ سویه) و نیز سروگروپ های A، B ، C و D به ترتیب ۳ ، ۹، ۱۰ و ۵ سویه بود. همچنین ۶ سویه با آنتی‌سرم‌های ذکر شده قابل تایپ نبودند.

نتایج حاصل از PCR-Ribotyping نشان داد تمامی سویه‌های تحت مطالعه قابل تایپ هستند، به طوری‌که در مجموع ۱۱ باند مجزا در محدوده 100-1500 bp ایجاد کرد که از بین آنها ۲ باند در همه سویه‌ها مشترک و ۹ باند پلی‌مورف بودند (شکل ۱).



شکل ۱ - آنالیز PCR-Ribotyping بر روی تعدادی از سویه‌های سالمونلای جدا شده از نمونه‌های بالینی. شماره‌ها بیانگر شماره کدهای سویه‌ها می باشد. تمامی سویه‌ها با ایجادهای متنوع در محدوده 100-1500 bp قابل‌تایپ بودند. چاهک اول و آخر DNA ladder 100 bp می‌باشد.

به طورکلی آنالیز شکل‌ها و دندروگرام حاصل از آنها (اشکال ۱ و ۲) نشان می‌دهد تمامی نمونه‌ها در ۴ کلاستر مجزا قرار می‌گیرند. کلاستر II بیشترین تعداد نمونه (۳۸ عدد) را دربر می‌گیرد. از این ۳۸ سویه دو سویه متعلق به سروگروپ C و سروتایپ پاراتایفی A در یک ساب‌کلاستر و بقیه ۳۶ سویه در ساب‌کلاستر بعدی قرار می گیرند. کلاستر IV کمترین تعداد سویه یعنی تنها ۷ سویه را در برمی‌گیرد و سروتایپ مهم تایفی در این گروه جایگاهی ندارند، در صورتی‌که در سه گروه دیگر توزیع نسبتا یکسانی دارد. کلاستر III شامل ۱۱ سویه است که ۵ سویه از آن متعلق به سروتایپ تایفی است. کلاستر I نیز ۱۵ سویه را در بر می‌گیرد. از ۱۰ سویه انتریتیدیس تنها یک سویه در کلاستر III قرارگرفته درحالی‌که ۹ سویه دیگر همگی در کلاستر II هستند. درمقابل هموژنی سویه‌های انتریتیدیس سویه‌های سالمونلا تیفی هتروژن بوده و در کلاسترهای مختلف I، II و III قرار می‌گیرند. به‌عبارتی سویه‌های انتریتیدیس هموژن‌تر از سروتایپ‌های تایفی است.

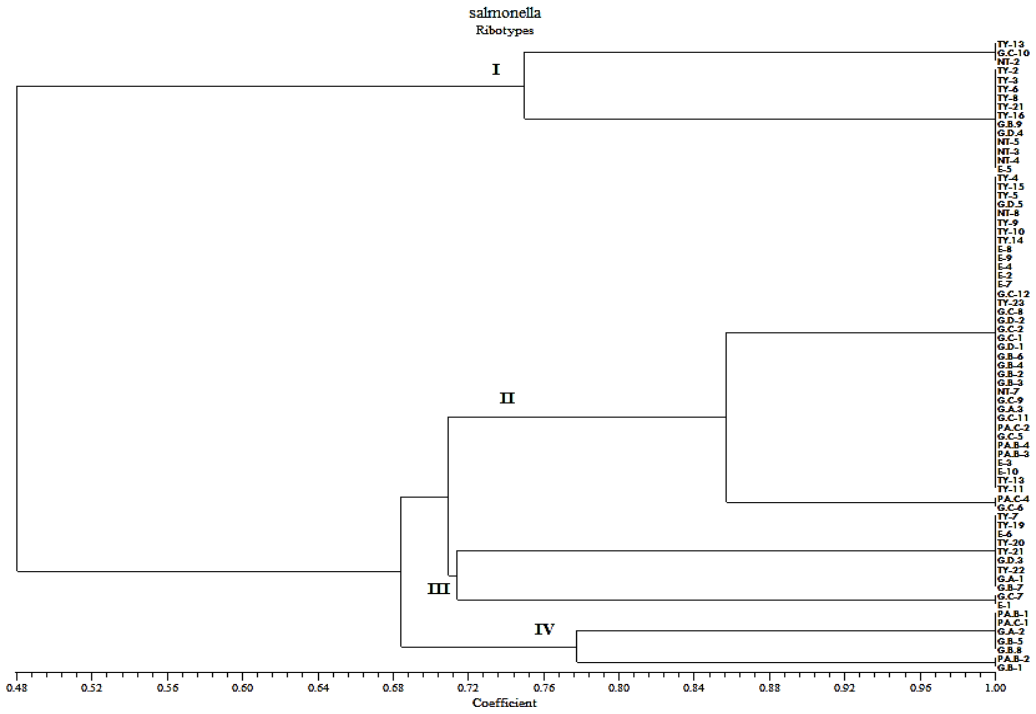
بحث

سالمونلا از جمله میکروارگانیسم‌های منتقل شونده از طریق غذا و یکی از مهمترین مشکلات بهداشتی در سراسر دنیا می‌باشد. نقش برجسته این باکتری در بروز عفونت‌های ایجادشده در انسان و افزایش شیوع این باکتری در طول دهه گذشته (۱) لزوم بررسی روش‌های موثر در جداسازی و تایپینگ این باکتری را گوشزد می‌کند. از طرفی، سالمونلا انتریکا بدلیل داشتن هموژنیتی زیاد در میان سروتایپ‌های آن با استفاده از روش های فنوتایپی همچون بیوتایپینگ، فاژتایپینگ و غیره به سختی تایپ‌بندی می گردد. استفاده از تکنیک PCR-Ribotyping به عنوان روشی کارآمد و قابل‌اطمینان در ارزیابی ارتباط سویه‌های سالمونلا توسط محققان مختلف گزارش شده است (۱۰-۱۱). این تکنیک با نشان‌دادن تنوع در ژن‌های rDNA در ژنوم باکتری جهت تعیین ارتباط بین جنس‌ها، تحقیقات اپیدمیولوژی و بررسی پلی‌مورفیسم ژنتیکی سویه‌ها کاربرد دارد (۱۴).

در مطالعه حاضر ۷۱ سویه سالمونلا متعلق به سروار و سروگروپ‌های مختلف جداشده از نمونه‌های بالینی توسط روش PCR-Ribotyping جهت تعیین تنوع نواحی داخلی بین‌ژنی 16S-23S rRNA تایپ‌بندی گردید.

Lagatolla و همکاران در مطالعه‌ای که بر روی ۲۱۸ سویه سالمونلا حاوی سروتیپ‌های مختلف با استفاده از تکنیک PCR-Ribotyping انجام دادند، نشان دادند که از ۱۰ سروتایپ مورد مطالعه ۷ سروتایپ الگوی مشابه داشتند و تنها ۳ سروتایپ با این تکنیک از یکدیگر تفکیک گردید. نکته قابل توجه این بود که اگرچه ۳ سروتایپ توانستند الگوی مجزایی را نشان دهند، اما در همه سویه‌های مربوط به آن سروتایپ لزوما همان پروفایل تکرار نمی‌گردید، لذا نتایج آنها نتوانست پروفایل اختصاصی سویه را معرفی کند (۱۵). همچنین در مطالعه دیگری که بر روی ۱۱۵ سویه جداشده از بیماران ایرانی صورت پذیرفته است نشان داده شد که اگرچه نمونه‌ها متعلق به ۵ نوع سروتایپ مختلف است اما هر سروتایپ نمی‌تواند الگوی مجزایی را در ریبوتایپینگ ایجاد کند (۱۶). در مطالعه حاضر نیز ارتباط مشخصی بین سروتایپ و ریبوتایپ مشخص نگردید به

طوری‌که اعضای سروتایپ‌های مختلف در کلاسترهای متنوعی توزیع شده اند.



شکل ۲ - دندروگرام حاصل از الگوهای باندی ۷۱ سویه سالمونلا تایپ‌شده با روش PCR-Ribotyping.

همچنین، مطالعه ذکر شده که در ایتالیا صورت پذیرفته، به طور مشخصی اشاره به عدم تنوع در بین سویه-های انتریتیدیس دارد. دو مطالعه دیگر نیز به هموژنتیسیتی در توالی نواحی داخلی بین‌ژنی 16 S-23SrRNA در سروتایپ انتریتیدیس اشاره کرده‌اند (۱۷-۱۸). در ایران نیز رنجبر و همکاران مطالعه‌ای روی سالمونلا انتریتیدیس انجام داده‌است که نتایج آن نشان می‌دهد ۲۷ سویه مورد مطالعه با روش ریبوتایپینگ در سه کلاستر تقسیم می شوند که بیانگر تنوع پایین سویه‌های انتریتیدیس می‌باشد (۱۹). نتایج مطالعه حاضر نیز (شکل ۲) نشان می‌دهد که این عدم تنوع در سویه‌های انتریتیدیس، وجود دارد به طوری‌که از ۱۰ سویه انتریتیدیس ۹ سویه متعلق به یک کلاستر واحد می‌باشد. بنابراین شواهد تاکید می کند که ناحیه بین‌ژنی 16 S-23SrRNA شدیدا در تکامل حفظ شده و پس از جدا-شدن از جد اولیه در کل دنیا تنوع زیادی پیدا نکرده است.

روش Ribotyping به دو صورت قابل انجام است. یکی به صورت PCR-Ribotyping که با پرایمرهای اختصاصی ناحیه ژن‌های rDNA تکثیر و تنوع پروفایل حاصل بررسی می گردد. در روش دوم از پروب‌های اختصاصی ناحیه ژن-های rDNA در یک پروسه ساترن‌بلات و پس از هضم آنزیمی DNA کل ژنوم استفاده می‌گردد. روش اول بسیار ساده و سریع و کم هزینه می‌باشد اما قدرت تمایز کمتری نسبت به روش دوم دارد به طوری‌که مطالعاتی که از این روش استفاده کرده‌اند نشان دادند که سویه‌ها به بیوتایپ-های کمتری تقسیم می شوند (۱۴-۲۱،۲۰) کما این‌که نتایج ما نیز تنها ۴ کلاستر را در بین ۷۱ نمونه (با وجود تنوع سروتایپی نمونه‌ها) نشان می‌دهد. اما در روش دوم قدرت تمایز تکنیک بسیار بالاتر است به طوری که Ernesto Liebana و همکاران نشان دادند با این روش ۲۵۰ سویه سالمونلا به ۵۲ بیوتایپ تقسیم می‌گردد (۲۲) و در مطالعه

دیگری نیز همین گروه تحقیقاتی توانست ۱۱۹ سویه در ۳۴ تایپ گروه‌بندی کند (۲۳). اما مشکل روش دوم طولانی بودن زمان بدست آمدن نتایج، پر هزینه بودن و نیاز به تجهیزات آزمایشگاهی خاص است که استفاده از آن را بویژه در ظغیان های باکتریایی محدود می‌کند. بنابراین همچنان PCR-Ribotyping در بررسی‌های اپیدمیولوژیکی در اولویت می‌باشد.

در مجموع این بررسی که بر روی ۷۱ سویه سالمونلا بالینی حاوی سروتایپ‌ها و سروگروپ‌های مختلف صورت پذیرفت نشان داد که تکنیک PCR-Ribotyping به خوبی توانست همه سویه‌ها را در ۴ گروه کلاستری تایپ‌بندی کند. هرچند نمی تواند الگو انحصاری برای هر سروتایپ ایجاد نماید و بهتر است برای بالا بردن قدرت تمایز در بررسی‌های اپیدمیولوژیکی سویه‌های ایران از حداقل دو روش ملکولی متفاوت به طور همزمان استفاده گردد.

تقدیر و تشکر

از معاونت پژوهشی واحد ورامین – پیشوا قدردانی می شود.

منابع مورد استفاده

1. Crump, J.A., Luby, S.P., Mintz, E.D., 2004.The global burden of typhoid fever. Bull World Health Organ 82: 346–353.
2. Gupte, S., 2006. The short text book of medical microbiology. Jaypee, 9th edition.
3. Rasschaert, G., Houf, K., Imberechts, H., Grijspeerdt, K., De Zutter, L., Heyndrickx, M., 2005. Comparison of five repetitive sequence-based PCR typing methods for molecular discrimination of Salmonella enterica isolates. J Clin Microbiol 43: 3615–3623.
4. Johnson, J.R., Clabots, C., Azar, M., 2001. Molecular analysis of hospital cafeteria-associated salmonellosis outbreak using modified repetitive element PCR fingerprinting. J Microbiol 39 (10): 3452–3460.
5. Weigel, R.M., Qiao, B., Teferedegne, B., Suh, D.K., Barber, D.A., Isaacson, R.E., 2004. 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 100(3–4): 205–217.
6. Thong, K. L., Cheong, Y. M., Puthucheary, S., Koh, C.L., Pang, T., 1994. Epidemiologic analysis of sporadic Salmonella typhi isolates and those from outbreaks by pulsed-field gel electrophoresis. J Clin Microbiol 32: 1135-1141.
7. Thong, K. L., Puthucheary, S., Yassin, R. M., Sudarmono, P., Padmidewi, M., Soewandojo, E., 1995. Analysis of Salmonella typhi isolates from Southeast Asia by pulsed-field gel electrophoresis. J Clin Microbiol 33: 1938-1941.
8. Khoodoo, M.H.R., Issack, M.I., Jaufeerally-Fakim, Y., 2002. Serotyping and RAPD profiles of Salmonella enterica isolates from Mauritius. Lett Appl Microbiol 35: 146–152.
9. Shangkuan, Y.H., Lin, H.C., 1998; Application of random amplified polymorphic DNA analysis to differentiate strains of Salmonella typhi and other Salmonella species. J Appl Microbiol 85(4): 693–702.
10. Altwegg, M., Hickman-Brenner, F. W., Farmer, J., 1989. Ribosomal RNA gene restriction patterns provide increased sensitivity for typing Salmonella typhi strains. J Infect Dis 160: 145-149.
11. Pang, T., Altwegg, M., Martinetti, G., Koh, C. L., Puthucheary, S., 1992. Genetic variation among Malaysian isolates of Salmonella typhi as detected by ribosomal RNA gene restriction patterns. Microbiol Immunol 36: 539-543.
12. Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J., 1982. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold spiring harbor laboratory, cold spiring harbor N.Y. pp.76-85.
13. Kostman, J. R., Edlind, T. D., LiPuma, J. J., Stull, T. L., 1992. Molecular epidemiology of Pseudomonas cepacia determined by polymerase chain reaction ribotyping. J Clin Microbiol 30: 2084–2087.
14. Hynugkun, L., Lebarone, P., Salah, W., 2005. Comparision of four molecular typing methods for the differentiation of Salmonella spp. Int J Food Microbiol 29: 5320-6.
15. Lagatolla, C., Dolzani, L., Tonin, E., Lavenia, A., Di Michele, M., Tommasini, T., 1996. PCR ribotyping for charavtenizing Salmonella isolates of different serotypes. J Clin Microbiol 34: 2440-3.
16. Mehrvar, M., Akhavan Sepehi, K., Zali, M.R., 2007. Discrimination of Salmonella Serotypes Isolated from Children Aged Less than 15yr. with Diarrhea by PCR-Ribotyping. J Razi 14: 181-187.
17. Gruner, E., Martinetti Lucchini, G., Hoop, R. K., Altwegg, M., 1994. Molecular epidemiology of Salmonella enteritidis. Eur J Epidemiol 10: 85–89.

18. Stanley, J., Baquar, N., 1994. Phylogenetics of Salmonella enteritidis. Int J Food Microbiol 21: 79–87.
19. Ranjbar, R., Sarshar, M., Morovvati, M., 2012. A study of ribotype patterns of Salmonella enterica serovar enteritidis strains isolated in Tehran, Iran. J Isfahan Med School 30: 238-247.
20. Fernanda, A., de Oliveira, Ana, P.G., Frazzon, Adriano, B., Eduardo, C., 2007. 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 1(2): 170-176.
21. Anjali Tikoo, A. K., Tripathi, S. C., Verma, N., 2001. Application of PCR fingerprinting techniques for identification and discrimination of Salmonella isolates. Curr Sci 80: 1048-1052.
22. Liebana, E., Clouting, C., Garcia-Migura, L., Clifton-Hadley, F.A., Lindsay, E., 2004. Multiple genetic typing of Salmonella Enteritidis phage-types 4, 6, 7, 8 and 13a isolates from animals and humans in the UK. Vet Microbiol 100: 189–195.
23. Liebana E., Garcia-Migura, L., Clouting, C., Clifton-Hadley, F.A., Lindsay, E., 2002. Multiple genetic typing of Salmonella enterica Serotype Typhimurium Isolates of Different Phage Types (DT104, U302, DT204b, and DT49) from Animals and Humans in England, Wales, and Northern Ireland. J Cin Microb 40: 4450–4456.