تشخیص سریع سویه های سالمونلا تیفی موریوم جدا شده از موارد بالینی

پریسا الحاقی[۱]، رضا رنجبر[۲]* ، محمد رضا خاتمی نژاد[۳]

۱. دانشجوی کارشناس ارشد،گروه میکروب شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن
۲. دانشیار باکتری شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) تهران
۳. استادیار میکروب شناسی، گروه میکروب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن

* **نشانی برای مکاتبه:** مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) تهران، تلفن: ۸۸۰۳۹۸۸۳ ، ranjbarre@gmail.com
دریافت مقاله: دی ماه نود و دو پذیرش برای چاپ: اسفند نود و دو

چکیده

سابقه و هدف: *شایع ترین نوع مسمومیت غذایی در جهان سالمونلوز است که باعث ایجاد طیف گسترده ای از بیماری های انسانی می شود. ژن های خانه دار اغلب به عنوان ژن های سازنده ای هستند که به طور معمول برای حفظ و بقای عمل کرد سلول های پایه ای مورد استفاده قرار می گیرند و در تمام سلول های یک ارگانیسم در شرایط نرمال وجود دارند. ژن های خانه دار می توانند به عنوان ژنهای تشخیصی در غربالگری عوامل باکتریایی مورد استفاده قرار گیرند. هدف از این مطالعه به کارگیری ژن های خانه دار در جهت غربال گری و تشخیص باکتری سالمونلا تیفی موریوم جدا شده از بیمارستان های سطح تهران می باشد.*

روش کار: *نمونه های جمع آوری شده از بیمارستان های مختلف سطح تهران که شامل ۲۲ ایزوله از سالمونلا انتریکا سروتایپ تیفی موریوم بودند بررسی شدند. این ایزوله ها با استفاده از تست های بیوشیمیایی تایید شده، سپس به روش مولکولی PCR با کمک پرایمرهای طراحی شده برای ژنهای hisD، dna N،hem D ، به منظور تشخیص وغربال گری سالمونلا انتریکا سویه تیفی موریوم استفاده شدند.*

یافته ها: *با بررسی محصولات PCR، ژن های خانه دار باندهایی با طول 633 جفت باز برای ژنhemD، با طول 635 جفت باز برای ژن dnaN و با طول 561 جفت باز برای ژن hisD در تمام نمونه های ایزوله شده سالمونلا تیفی موریوم ایجاد نمودند. در این آزمایش از اشرشیا کلی و شیگلا به عنوان سویه های باکتریایی کنترل استفاده شد که هیچ گونه واکنش مثبتی نشان ندادند.*

نتیجه گیری: *ژن های خانه دار در غربال گری مولکولی و جداسازی سویه های سالمونلا انتریکا سروتایپ تیفی موریوم مناسب می باشند.*

واژگان کلیدی: ***سالمونلا تیفی موریوم، ژن های خانه دار ، hemD ، dnaN ،hisD***

مقدمه

سالمونلاها باکتری های گرم منفی و از خانواده آنتروباکتریاسه می باشند .سالمونلوزیس از مهم ترین بیماری های عفونی بین انسان و حیوانات است که توسط باکتری سالمونلا ایجاد می شود(۵-۱). اولین گزارش مربوط به مسمومیت غذایی در سال ۱۸۸۸ اعلام گردید، اگرچه در ابتدا علت آن را از مشکلات گوارشی تصور میکردند اما کم کم درک بهتری نسبت به عامل این مشکلات که آلودگی باکتریایی در گوشت خوک، گوشت گاو، شیر و سایر مواد غذایی بود، پیدا کردند(۶). سالمونلا تیفی قادر به زنده ماندن در شرایط سخت و مکانیسم های دفاعی دستگاه گوارشی انسان است. این عفونت در حالت کمون خود درون کیسه صفرا (ناقل حصبه) تشکیل بیوفیلم می دهد و با ورود به حالت کمون باعث پنهان ماندن از سیستم دفاعی می شود. حاملین حصبه هیچ علامتی نشان نمی دهند و مدت بقا این ارگانیسم در محیط های سرد مانند یخچال و روی محیط کشت طولانی است اما در مقابل خشکی و گرما و مواد ضد عفونی کننده پایدار نیستند(۹-۷). در میان سروتیپ های غیر تیفوئیدی، سالمونلا تیفی موریوم و سالمونلا انتریتیدیس در مخازن حیوانی طیف گسترده ای پیدا کرده اند. در حال حاضر تب تیفوئید که ناشی از باکتری سالمونلا انتریکا سروتیپ تیفی می باشد سالیانه بیش از ۱۶ میلیون نفر در جهان را عفونی می کند و باعث مرگ حدود ۶۰۰ نفر می شود. سالمونلا به عنوان یک خطر بزرگ بهداشتی در سازمان بهداشت جهانی مطرح شده است(۹). برای شناسایی سالمونلا به طور مستقیم دو روش سنتی و مولکولی وجود دارند که روش های سنتی که بر پایه تست های بیوشیمیایی و سرولوژی می باشند وقت گیر هستند. روش های مولکولی با توجه به سرعت بالا و هزینه کم مناسب تر می باشند به طوری که از تکنیک PCR به منظور شناسایی این گونه عوامل عفونی استفاده می شود(۱۱). با استفاده از ژن های خانه دار که ژن های ضروری در متابولیسم و فعالیت سلول می باشد و به دلیل تولید پروتئین که برای بقا و عمل کرد ضروری است می توان از آنها با استفاده از تکنیک PCR به تشخیص و جداسازی سویه های سالمونلا انتریکا سروتیپ تیفی موریوم پرداخت(۱۲). هدف از این مطالعه بررسی ژن های خانه دار به منظور غربال گری و تشخیص مولکولی سالمونلا سروتایپ تیفی موریوم می باشد.

روش کار

نمونه های بالینی متفاوتی از جمله خون و مدفوع و ادرار از بیماران مشکوک به سالمونلا از چند بیمارستان و تعدادی از آزمایشگاه ها در شهر تهران جمع آوری و به محیط کشت سلنیت f منتقل شدند. نمونه ها به مدت ۶ ساعت در محیط نگه داری شدند. سپس به محیط کشت های انتخابی مانند سالمونلا-شیگلا(SS)آگار، بیسموت سولفیت آگار انتقال و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. با کمک تست های بیوشیمیایی و محیط های افتراقی مانند MRVP،TSI، لیزین آیرون آگار، سیمون سیترات واوره، کلنی مشکوک به سالمونلا تیفی را جدا کرده و پس از انجام آزمون های افتراقی مذکور، آزمون های سروتایپینگ با انتی سرم های اختصاصی O و H انجام پذیرفت. واکنش آگلوتیناسیون به عنوان واکنش مثبت ثبت شد، سپس با استفاده از روش های استاندارد باکتریولوژیک و سرولوژیک، باکتری ها در محیط هایی مانند BHI، LB براث کشت داده شدند. استخراج DNA با روش فنل_کلروفرم انجام گرفت. سالمونلا در محیط کشت LB کشت داده شد و بعد از ۲۴ ساعت از سوسپانسیون باکتریای به رسوب SDS و EDTA و پروتئازK اضافه شد. سوسپانسیون در دمای ۶۰ درجه انکوبه گردید و در مرحله بعد DNA را با محلول فنل-کلروفرم-ایزوآمیل استخراج شد و توسط اتانل ته نشین گردید. در نهایت در TE در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگه داری شد تا استفاده گردد.

پس از استخراج DNA از سویه های مربوطه، جهت شناسایی با واکنش PCRاز پرایمرهای اختصاصی سه ژن hisD، hemD، dna براساس نتایج آنالیز آنها با کمک نرم افزار BLAST در پایگاه ژنی NCBI، استفاده گردید. به منظور اطمینان از اختصاصی بودن آنها از پایگاه مرکزی ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI) استفاده شد که در جدول ۱ خصوصیات ترادف هر یک از پرایمر ها ذکر شده است. در ادامه نیز برای بهینه سازی مواد مورد نیاز واکنش PCR ، طی چند مرحله با تغییر بر روی غلظت مواد اولیه از جمله پرایمر ها، dNTP و Taq پلیمراز مقدار مناسب برای هر یک جهت انجام PCR انتخاب شد. شرایط برقراری واکنش PCR برای ارزیابی ژن های مذکور در حجم استاندارد ۲۵ میکرولیتر صورت پذیرفت. در این حجم Mgcl2 ۱ میلی مول،۱ماکرولیتر dNTP، ۱ ماکرولیتر DNA باکتری، ۲/۵ ماکرولیتر بافر X۱۰ ،۲/۵ واحد آنزیم Taq polymerase ، پرایمر R وF هر یک ۱ پیکومول و آب مقطر تزریقی ۱۷ ماکرولیتر استفاده شد و یک واکنش با همین شرایط و استفاده از آب دیونیزه به جای ژنوم باکتری به عنوان کنترل منفی قرار داده شد. به منظور بهینه سازی دمای اتصال پرایمرها، بر روی سیکل های حرارتی و زمان انجام واکنش تغییراتی صورت پذیرفت و به ترتیب درجه حرارت ۶۲ ، ۵۸ و ۶۲ درجه سانتی گراد منظور شد.

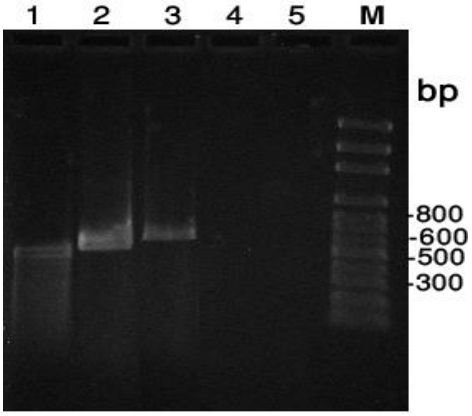
تکثیر با استفاده از دستگاه ترموسایکلر و سیکل های حرارتی تعیین شده و شرایط مناسب واکنش PCR انجام پذیرفت و در انتها به منظور ارزیابی نتایج حاصل از PCR مقدار ۵ میکرولیتر از محصول واکنش را با ۱ میکرولیتر لودینگ بافر مخلوط نموده و ژل الکتروفورز ایزوله ها در ولتاژ ۸۰ ولت به مدت ۴۵ دقیقه در ژل آگارز ۱/۵٪ صورت گرفت و سپس با محلول اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی انجام شد.

جدول ۱ : توالی پرایمرهای ژن های مورد استفاده

نام ژن	توالی پرایمر	دما	طول قطعه
HemD	F: 5'-ATG AGT ATT CTG ATC ACC CG-3' R: 5'-GAA GCG TTA GTG AGC CGT CTG CG-3'	61°C	567-633 bp
DnaN	F: 5'-ATG AAA TTT ACC GTT GAA CGT GA-3' R:5'-AAT TTC TCA TTC GAG AGG ATT GC-3'	55°C	635bp
HisD	F: 5'-GAA ACG TTC CAT TCC GCG CAG AC-3' R: 5'-CTG AAC GGT CAT CCG TTT CTG-3'	62°C	651 bp

یافته ها

باند های مورد انتظار حاصل از ژن های خانه دار شامل hemD با طول ۶۳۳جفت باز dnaN با طول ۶۳۵ جفت باز و ژن hisD با طول ۵۶۱ جفت باز در تمام سویه های سالمونلا سروتیپ تیفی موریوم مشاهده گردید. وقتی آزمایش بر روی باکتری های اشریشیا کولی و شیگلا به عنوان کنترل انجام شد، هیچ گونه واکنش مثبتی مشاهده نگردید. با توجه به باندهای حاصل از باکتری سالمونلا تیفی موریوم در مقایسه با باکتری های کنترل، که هیچ گونه باندی مشاهده نشد، به اختصاصی بودن ژن های خانه دار می توان پی برد(تصویر ۱).



تصویر ۱: نتایج PCR بر روی نمونه های باکتریایی. ردیف های شماره ۱ الی ۳ به ترتیب مربوط به تکثیر ژن های hisD و hemD وdnaN در سویه های سالمونلا تیفی موریوم می باشند و ردیف های شماره ۴ و ۵ به ترتیب مربوط به سویه های کنترل شیگلا و اشریشیا کولی با نتیجه منفی می باشند. ردیف M ماکر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی می باشد.

بحث

بیماری های منتقله از راه مواد غذایی از جدی ترین مشکلات بهداشتی در سراسر جهان به شمار می روند(۱۳). آمارهای سازمان بهداشت جهانی از اپیدمی شدن این بیماری ها در مناطق مختلف جهان گزارش داده است. در ایالات متحده هر سال ۱/۴ میلیون نفر به بیماری های منتقله از مواد غذایی مبتلا میشوند(۱۴). سالمونلا تیفی یک پاتوژن نگران کننده در کشورهای در حال توسعه به ویژه آسیا بوده است(۱۵).

در سال ۲۰۰۲ سالمونلا تیفی شایع ترین سروتیپ در آسیا بوده است. در جنوب مرکزی و جنوب شرقی آسیا سالمونلا تیفی هنوز هم بسیار رایج است. در سال ۲۰۰۸ از ۵۳۳۲ نفر که به علت شیوع بیماری های ناشی از مواد غذایی در اتحادیه اروپا گزارش شده ۱۸۸۸نفر (۳۵٪) مبتلا به سالمونلا بوده اند. از میان سروارهای سالمونلا، شیوع دو سروار انتریتیدیس و تیفی موریوم در سال ۲۰۰۸ به ترتیب۵۸٪ و (۲۲٪بوده است. در حالی که میزان موارد سالمونلا انتریتیدیس در حال کاهش است ، موارد ناشی از سالمونلا تیفی موریوم در حال افزایش است. در سال ۲۰۰۸، ۲۶۹۲۳ مورد از سالمونلاتیفی موریوم گزارش شده است(۱۶).

Rahn و هم کاران در سال ۱۹۹۲ از توالی ژن invA جهت شناسایی سالمونلا تیفی موریوم استفاده کردند. ژن invA نشانه گذاری، شناسایی و منجر به تولید قطعاتی با اندازه ۲۸۴bp شد. به غیر از ۲ سویه سالمونلا S. litchfield و S. senftenberg تمام سویه های سالمونلا شناسایی شدند. این دو سویه هیچ گونه پاسخ مثبتی نشان ندادند. نتایج نشان داده که ژن invA حاوی سکانس های اختصاصی برای سالمونلا است و ژن مناسبی برای هدف قرار داده شدن برای PCR می باشد و توانایی تشخیص آن بسیار دقیق است(۱۷).برای تشخیص سریع تب تیفوئید hashimoto **و** هم کاران روشی مبنی بر nested PCR را با استفاده از توالی ژن کد کننده آنتی ژن ViaB ابداع نمودند. تمام سویه های سالمونلا تیفی به هم راه سالمونلا پاراتیفی برای PCR مثبت بودند. حساسیت این روش حتی در حد یک سلول است و و برای شناسایی تیفی مناسب می باشد(۱۸).در سال ۲۰۰۳ pathama و هم کاران با هدف قراردادن ژن hilA به شناسایی گونه های سالمونلا پرداختند. با روش PCR تمام گونه های سالمونلا قطعاتی با طول ۷۸۴bp تولید کردند که این قطعات در سویه های غیر سالمونلایی موجود نمی باشد. هم چنین با استفاده از روش PCR برای سنجش حساسیت پرایمر hilA در نمونه های مدفوعی با غلظت های مختلف به تشخیص سویه های سالمونلا کلراسوئیس، لاکتیس و سروار تیفی موریوم پرداخته شد، در نهایت pathama به این نتیجه رسید که ژن hilA برای تشخیص گونه های سالمونلا اختصاصی میباشد و این روش PCR برای تشخیص نمونه های مدفوعی مناسب است(۱۹).Kumar و هم کاران در سال ۲۰۰۲ به بررسی ۴۰ نمونه بالینی مشکوک به تب حصبه پرداختند. تنها ۲۰ مورد در کشت خون از نظر سالمونلا تیفی مثبت شدند. نتایج نشان داد که تشخیص مبتنی بر PCR به ویژه برای تمام موارد بالینی ازجمله تب تیفوئید مفید است(۲۰). سعادتی و هم کاران جهت شناسایی سالمونلا تیفی به طراحی یک جفت پرایمر اختصاصی ژن viaB و بعد به انجام واکنش PCR اقدام نمودند. محصول PCR تیفی با اندازه ۵۳۰bp حاصل گردید. نتایج این تحقیق نشان داد که ژن viaB با روش PCR برای تشخیص سالمونلا تیفی می تواند روشی اختصاصی، کم هزینه با حساسیت بالا باشد(۲۱).در گذشته طی مطالعات بسیاری که برای شناسایی و غربال گری باکتری ها انجام می گرفت از توالی خاصی از ژن های DNA با کمک متد مولکولی PCR استفاده می شد، اما آنچه که در این مطالعه مورد اهمیت است استفاده از ژن های خانه دار به عنوان ژن های تشخیصی در شناسایی سالمونلا سروتیپ تیفی موریوم می باشد. ژن های خانه دار در تمام سلول موجود می باشد و در فعالیت سلول دارای ویژگی های خاصی می باشد. در مطالعه حاضر از این ژن های اختصاصی جهت َشناسایی و غربالگری سالمونلا تیفی موریوم استفاده گردید. آزمایش جهت تعیین اختصاصیت روش بر روی باکتریهای اشریشیا کولی و شیگلا صورت پذیرفت و باند مد نظر در باکتری های کنترل، تکثیر نشد.

نتیجه گیری

ترادف انتخاب شده در این مطالعه اهداف مناسبی جهت شناسایی مولکولی سالمونلا انتریکا سروتایپ تیفی موریوم می باشند لذا پیش نهاد می شود از این اهداف ژنی در غربال گری سروتایپ های سالمونلا در آزمایشگاه استفاده شود.

REFERENCES

1. D. Vijaya, K. Janakiram, Sathish J.V, Mohan D.R., Archa Sharma. Salmonella Enteritidis Causing Gastroenteritis: A Case Report. JCDR/2012/4281:0049.

2. R. Ranjbar , A. Mirzaee . Determining of the Variety of Genotypes in Salmonella Typhimurium by ERIC-PCR. Determining of the Variety of Genotypes in Salmonella Typhimurium by ERIC-PCR. Journal of Babol University of Medical Sciences ISSN 1561-4107.

3. Reza Ranjbar , Meysam Sarshar , Saeid Morovvati . A Study of Ribotype Patterns of Salmonella Enterica Serovar Enteritidis Strains Isolated in Tehran, Iran. Jornal Of Isfahan Medical School ISSN 1735-854x

4.Threlfall EJ, Frost JA. The identification, typing and fingerprinting of Salmonella: laboratory aspects and epidemiological applications. J Appl Bacteriol. 1990 Jan;68(1):5- 16.

5. Vollaard AM, Ali S, van Asten HA, Ismid IS, Widjaja S, Visser LG, Surjadi Ch, van Dissel JT. Risk factors for transmission of foodborne illness in restaurants and street vendors in Jakarta, Indonesia. Epidemiol Infect. 2004 Oct;132(5):863-72.

6. Hardy A. Salmonella: a continuing problem. Postgrad Med J. 2004 Sep;80(947):541-5.

7. Sean-Paul Nuccio, Tamding Wangdi, Sebastian E. Winter, Andreas J. Bäumler. Typhoi

8 . Su Yean Ong1, Fui Ling Ng1, Siti Suriawati Badai1, Anton Yuryev2, Maqsudul Alam1.
Analysis and construction of pathogenicity island regulatory pathways in Salmonella enterica serovar Typhi. Journal of Integrative Bioinformatics, 7(1):145, 2010

9. Marwa A. Mansour1, Tarik I. Zaher2, Amany M. Ibrahim3, Amira S. Ahmed3, Islam M. Ibrahim4, Ashraf Goda4, Nehad F. Ahmed5. Role of gallstones in typhoid carriage in Egyptian patients. Journal of Microbiology and Infectious diseases. 2012; 2 (4): 142-149

10. Pui, C. F., 1Wong, W. C., 1Chai, L. C., 1Tunung, R., 1Jeyaletchumi, P., 1Noor Hidayah, M. S., 1Ubong, A., 1Farinazleen, M. G., 2Cheah, Y. K. and 1Son, R. Salmonella: A foodborne pathogen. Salmonella: International Food Research Journal 18: 465-473 (2011)

11. Rambabu Naravaneni and Kaiser Jamil. Rapid detection of food-borne pathogens by using molecular techniques Journal of Medical Microbiology (2005), 54, 51–54.

12. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. BMC Molecular Biology 2006, 7:33. 10.1186/1471-2199-7-33

13. Rene S. Hendriksen,1 Antonio R. Vieira,1 Susanne Karlsmose,1 Danilo M.A. Lo Fo Wong,2 Arne B. Jensen,1 Henrik C. Wegener,1 and Frank M. Aarestrup1. Global Monitoring of Salmonella Serovar Distribution from the World Health Organization Global Foodborne InfectionsNetwork Country Data Bank: Results of Quality Assured Laboratories from 2001 to 2007 FOODBORNE PATHOGENS AND DISEASE. Volume 8, Number 8, 2011 Mary Ann Liebert, Inc. DOI: 10.1089/fpd.2010.0787.10

14. Eleni Galanis , Danilo M.A. Lo Fo Wong, Mary E. Patrick, Norma Binsztein, Anna Cieslik, Thongchai Chalermchaikit, Awa Aidara-Kane, Andrea Ellis, Frederick J. Angulo, Henrik C. Wegener, and for World Health Organization Global Salm-Surv. Web-based Surveillance and Global Salmonella Distribution, 2000–2002. Volume 12, Number 3—March 2006

15. Multi-country outbreak of Salmonella Stanley infections Update1 European Centre for Disease Prevention and Control and European Food Safety Authority2. SCIENTIFIC REPORT OF EFSA AND ECDC EFSA Journal 2012;10(9):2893.

16. G K Adak, S M Long, S J O'Brien. Trends in indigenous foodborne disease and deaths, England and Wales: 1992 to 2000. Gut 2002;51:832-841 doi:10.1136/gut.51.6.832

17. K. Rahn,[1], S.A. De Grandis[2], R.C. Clarke[1], S.A. McEwen[3], J.E. Galán[4], C. Ginocchio[4], R. Curtiss III[5], C.L. Gyles[3]. Amplification of an invA gene sequence of Salmonella typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of Salmonella. Volume 6, Issue 4, August 1992, Pages 271–27.

18. Y Hashimoto, Y Itho, Y Fujinaga,A Q Khan, F Sultana, M Miyake, K Hirose, H Yamamoto, and T Ezaki. Development of nested PCR based on the ViaB sequence to detect Salmonella typhi. Journal of Clinical Microbiologyjcm.asm.org. J. Clin. Microbiol. March 1995 vol. 33 no. 3 775-777

19. S. G. Pathmanathan[1], N. Cardona-Castro[2], M. M. Sánchez-Jiménez[2], M. M. Correa-Ochoa[3], S. D. Puthucheary[4] and K. L. Thong. Simple and rapid detection of Salmonella strains by direct PCR amplification of the hilA gene. J Med Microbiol September 2003 vol. 52 no. 9 773-776

20. Kumar A, Arora V, Bashamboo A, Ali S. Detection of Salmonella typhi by polymerase chain reaction: implications in diagnosis of typhoid fever. Infect Genet Evol. 2002 Dec;2(2):107-10.

21. Saudati M,Ghorbani N,Barati B,Nazarian Sh,et al. Detection of Salmonella typhi by PCR sequencing ViB. Journal of Sabzevar University of Medical Sciences.2009;16(2):221-227.