جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقاله تحقیقاتی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ارتش جمهوری اسلامی ایران
سال چهارم ● شماره ۴ ● صفحات ۱۰۰۵ تا ۱۰۰۹ ● زمستان ۱۳۸۵

بررسی حساسیت روش PCR-Ribotyping در شناسایی سویه‌های سالمونلای جداشده از بیماران مبتلا به اسهال

*نرجس مهرور[۱]، دکتر عباس اخوان سپهی[۲]، معصومه عظیمی‌راد[۳]، کیانا میرسعیدی[۴]، دکتر محمدرضا زالی[۵]

چکیده

سابقه و هدف: سالمونلا از مهمترین پاتوژنهای ایجاد کننده اسهال و بیماریهای ناشی از غذا در انسان می‌باشد که اغلب توسط مواد غذایی مانند گوشت ومرغ آلوده به انسان سرایت می‌کند. به دلیل اهمیت این ارگانیسم به عنوان یکی ازپاتوژنهای بیماریزا، نیاز به شناسایی و تشخیص سریع آن توسط روشهای مولکولی می‌باشد. هدف از این مطالعه بررسی حساسیت تکنیک PCR-Ribotyping در شناسایی سویه‌های سالمونلا می‌باشد.

مواد و روشها: این نوع مطالعه از نوع توصیفی بوده و نمونه‌ها شامل ۴۰ سویه سالمونلای جداشده از بیماران مبتلا به اسهال در طی سالهای ۱۳۸۴-۱۳۸۰ بودند. پس از تعیین نوع سروتیپ آنها، DNA با روش فنل/ کلرفرم استخراج شد و تکنیک PCR-Ribotypingتوسط پرایمرهای P۱ و P۲ مربوط به ژن ۱۶S-۲۳SrRNA انجام گرفت. در نهایت محصول PCR برروی ژل آگارز ٪۱/۸ با ولتاژ ۱۲۰ به مدت ۹۰ دقیقه الکتروفورز شد و بعد از رنگ آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید آنالیز صورت گرفت.

یافته‌ها: ۴۰ نمونه سالمونلا شامل سروتیپ‌های پاراتیفی A، پاراتیفی B، پاراتیفی C، پاراتیفی D و سروتیپ تیفی دارای ۵ باند مشابه درحد فاصل bp ۲۵۰۰-۷۰۰ بودند. سروتیپ‌های مختلف سالمونلا، حاوی باندهای یکسان در مناطق مشابه بودند.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج بدست آمده می‌توان گفت تکنیک PCR-Ribotyping دارای حساسیت بالاجهت شناسایی سویه‌های سالمونلا در حد جنس می‌باشد ولی برای تعیین نوع سروتیپ از حساسیت زیاد برخوردار نمی باشد.

کلمات کلیدی: اسهال، حساسیت، سالمونلا، PCR-Ribotyping

مقدمه

باکتری سالمونلا یکی از اعضاء خانواده انتروباکتریاسه است که به صورت باسیل‌های گرم منفی تاژه دارهستند و اکثر سروتیپ‌های آن توانایی حرکت را دارند به جز دو سروتیپ سالمونلا گالیناروم (S. Gallinarum) و سالمونلا پلوروم (S. Pullorum) (۱). این جنس به صورت هوازی و یا بی هوازی اختیاری است و بهترین شرایط رشد آن دمای ۳۷°C ، ۸-۶ =PH می‌باشد. طبقه‌بندی این جنس براساس روش Kauffman-White صورت می‌گیرد که بیش از ۲۳۰۰ سروتیپ بر اساس ساختار آنتی ژنی لیپوپلی ساکاریدی سطح سلول (آنتی ژن O) و پروتئین‌های تاژه‌ای (آنتی ژن H) بدست می‌آید(۴).

جنس سالمونلا اغلب در مواد غذایی گوشت و مرغ و محصولات لبنی که تحت تیمارحرارتی قرار نگرفته اند، یافت می‌شود همانند سس مایونز، کرم، خامه، بستنی و... (۷) در فصل تابستان به دلیل فاسد شدن گوشت و مرغ احتمال فعالیت جنس سالمونلا در آنها زیاد می‌شود که در نتیجه با مصرف این نوع مواد غذایی سالمونلا از راه دهان وارد روده انسان می‌گردد، به سلولهای اپیتلیوم روده کوچک متصل شده وایجاد مسمومیت غذایی (Food Borne Disease= FBD) می‌کند(۶) . مسمومیت غذایی ایجاد شده توسط سالمونلا اغلب همراه با اسهال، استفراغ، تب و گاهی وجود خون درمدفوع می‌باشد. در سال ۱۹۸۶ در کشور آمریکا سالمونلا به میزان ٪۸۴/۹ ایجاد کننده

۱ـ دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، گروه میکروب شناسی (* نویسنده مسئول)
تلفن : ۰۹۱۲۵۱۶۱۳۷۱، آدرس الکترونیک: Narges_Mehrvar@yahoo.com
۲ـ استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، گروه میکروب شناسی
۳ـ کارشناس علوم آزمایشگاهی، مرکز تحقیقات گوارش و کبد دانشگاه شهیدبهشتی، دایره تحقیقات بیماریهای ناشی از غذا
۴ـ کارشناس آزمایشگاه، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران، بیمارستان حضرت علی اصغر (ع)
۵ـ استاد، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهیدبهشتی، مرکز تحقیقات گوارش و کبد، دایره تحقیقات بیماریهای ناشی از غذا

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مسمومیت غذایی بوده ولی در سال ۱۹۹۱ این میزان به ۹۵٪ رسید(۷). روشهای شناسایی سالمونلا از نمونه‌های اسهالی و مواد غذایی بر دو نوع سنتی و مولکولی می‌باشد که روشهای جداسازی سنتی اغلب بر پایه کشت بر روی محیطهای اختصاصی و تشخیص کلنی‌های مشکوک توسط تست‌های بیوشیمیایی و سرولوژی است. این روشها به طور کلی وقت گیر هستند و بنابراین نیازمند یک روش سریع برای تشخیص جنس و انواع سروتیپ‌های سالمونلا از نمونه‌های کلینیکی و مواد غذایی می‌باشیم(۱). روشهای مولکولی جداسازی این جنس بر اساس خصوصیات ژنوتیپی می‌باشد و به نظر می‌آید که بیشتر این روشها برای مطالعات ژنتیکی و تکاملی مناسب هستند(۴). از تکنیکهای مولکولی انواع PCR را می‌توان نام برد که از این میان ساده ترین تکنیک با سرعت بالا و هزینه کم تکنیک PCR-Ribotyping است که بر اساس تکثیر قسمتی از توالی ژن ۱۶S-۲۳SrRNA خواهد بود. این ژن به میزان ۲-۱۱ کپی در کروموزوم اکثر باکتریهای خانواده انتروباکتریاسه وجود دارد که با توجه به همولوژی در توالی این ژن توسط تکنیک PCR-Ribotyping می‌توان جنس‌های مختلف باکتریها را جداسازی و دسته بندی نمود(۴). تفاوت در نواحی داخلی این ژن باعث می‌شود که هرجنس باکتری باند مخصوص به خود را داشته باشد. هدف از این مطالعه سنجش حساسیت تکنیک PCR-Ribotyping می‌باشد که به منظور جداسازی و شناسایی سویه‌های سالمونلا در نمونه‌های کلینیکی مورد استفاده قرار خواهد گرفت و اینکه آیا این تکنیک حساسیت کافی و بالا را در جهت طبقه بندی این جنس در حد سروتیپ دارد یا نه؟

مواد و روشها

سویه‌های باکتری: مطالعه حاضر از نوع توصیفی می‌باشد. سویه‌های سالمونلای مورد استفاده دراین مطالعه (جدول ۱) در طی سالهای ۱۳۸۰ الی ۱۳۸۲ از بیماران مبتلا به اسهال در منطقه ورامین و کرج جدا شد و تعدادی از این سویه‌ها نیز در طی ۶ ماه در سال ۱۳۸۴ از بیمارستان حضرت علی اصغر (ع) از کودکان مبتلا به اسهال زیر ۱۵ سال جدا گردید. جداسازی سویه‌ها طبق روشهای استاندارد که شامل کشت بر روی محیطهای اختصاصی و شناسایی از طریق خصوصیات بیوشیمیایی و سرولوژی می‌باشد، انجام گردید. تمامی سویه‌ها در محیط TSB(Triptychase Soy Broth) با ۱۵٪ گلیسرول در ۷۰°C- نگهداری شدند.

استخراج DNA: سویه‌های نگهداری شده در TSB ابتدا بر روی محیط کشت اختصاصی کشت داده شدند و سپس تمامی کلنی‌ها در بافر (TE) Tris-HCl-۵mM EDTA (PH=۸) شستشو داده شدند و با پودر لیزوزیم مخلوط گردیدند که در ۳۷°C به مدت ۱ ساعت انکوبه شدند بعد از افزودن سدیم دو دسیل سولفات (SDS) و پروتئیناز K نمونه‌ها دوباره در ۵۵°C انکوبه شدند تا زمانی که محلول شفاف شد. DNA توسط محلول فنل-کلرفرم-ایزوآمیل الکل (۲۵:۲۴:۱) استخراج شد و توسط اتانول ته نشین و جمع گردید در نهایت DNA دوباره توسط محلول TE شستشو داده شد و در ۴°C نگهداری شد تا مورد استفاده واقع شود.

تکثیر DNA: پرایمرهای اولیگونوکلئوتیدی P۱ و P۲ مورد استفاده در این مطالعه بر اساس قطعه‌ای از ژن ۱۶S-۲۳SrRNA بود. توالی پرایمرها توسط Lagatolla و همکاران در سال ۱۹۹۶ طراحی شده بودند(۴).

PCR با مواد ۰/۶ ماکرولیتر dNTP، ۲ ماکرولیتر MgCl۲، ۱۰۰ نانوگرم DNA در حجم نهایی ۱۰۰ ماکرولیتر انجام شد. برنامه PCR بر اساس ۳۵cycle به مدت ۱min در ۹۴°C ، ۱min در ۵۵°C ، ۱min در ۷۲°C انجام گردید. نمونه کنترل منفی در این برنامه شامل تمامی مواد PCR بجز DNA باکتری بود.

محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱/۸ ٪ و با ولتاژ ۱۲۰ به مدت ۹۰ دقیقه الکتروفورز شدند که در نهایت با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شدند و عکس از ژل تهیه گردید. داده‌های بدست آمده با توجه به جدول SPSS نسخه ۱۱/۵ و برنامه آماری Chi-Square Test آنالیز شدند (P=۰/۹۳).

یافته‌ها

در این مطالعه از ۵۶۷ بیمار مبتلا به اسهال مراجعه کننده به مرکز تحقیقات گوارش و کبد دانشگاه شهیدبهشتی دایره تحقیقات بیماریهای ناشی از غذا طی سالهای ۱۳۸۴-۱۳۸۰، موفق به جداسازی ۴۰ سویه سالمونلا با ۵ نوع سروتیپ مختلف شدیم (جدول ۱). لازم به ذکر است که بیمارن شامل کودکان مبتلا به اسهال زیر ۱۵ سال بودند که از مناطق ورامین، کرج و بیمارستان حضرت علی اصغر (ع) به این مرکز ارجاع داده می‌شدند.

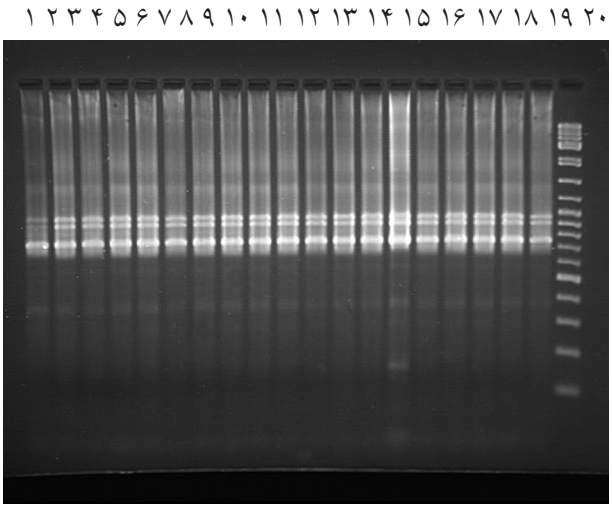
جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

جدول ۱- انواع سروتیپ‌های جداشده از بیماران مبتلا به اسهال

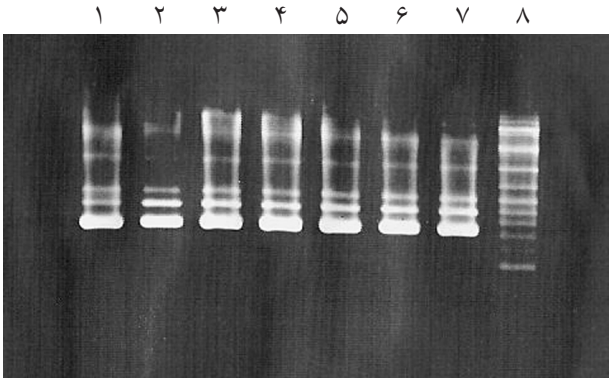
سروتیپ	تعداد (درصد)
سالمونلا پاراتیفی A	۱۸ (٪۴۵)
سالمونلا پاراتیفی B	۷ (٪۱۷/۵)
سالمونلا پاراتیفی C	۹ (٪ ۲۲/۵)
سالمونلا پاراتیفی D	۵ (٪۱۲/۵)
سالمونلا تیفی	۱ (٪۲/۵)

DNA مربوط به ۴۰ سویه سالمونلا پس از استخراج با روش فنل/ کلرفرم در رابطه با پلی مورفیسم موجود در ژن ۱۶S-۲۳SrRNA توسط تکنیک PCR-Ribotyping مورد بررسی قرار گرفتند. آنالیز الکتروفورز محصولات PCR نشان دهنده وجود ۵ باند در محدوده ۷۰۰-۲۵۰۰ bp بود (شکل ۱و۲).

برخی از باندها ضعیف و برخی قوی بودند. باندهای ضعیف به علت ایجاد محصولات ثانویه در هنگام انجام تکنیک PCR-Ribotyping می‌باشند. باندهای ایجاد شده در ۵ نوع سروتیپ همگی مشابه هم بودند و این باندها در مناطق ۷۵۰, ۹۵۰, ۱۰۰۰, ۱۵۰۰ و ۲۵۰۰ bp قرار داشتند. همانگونه که در شکل ۲و ۳ مشخص می‌باشد باندهای ۷۵۰, ۹۵۰, ۱۰۰۰ از باندهای قوی و ۱۵۰۰ و ۲۵۰۰ از نوع باندهای ضعیف می‌باشند. لازم به ذکر است که این باندها در سویه‌های جدا شده از نمونه‌های انسانی دقیقاً یکسان بودند بدین ترتیب که



شکل ۱- باندها شامل مناطق ۷۵۰ bp، ۹۵۰ bp، ۱۰۰۰ bp، ۱۵۰۰ bp و ۲۵۰۰ bp. ۱: سالمونلا پاراتیفی A، ۲: سالمونلا پاراتیفی B، ۳: سالمونلا پاراتیفی C، ۴:سالمونلا تیفی، ۵: سالمونلا پاراتیفی D، ۶: سالمونلا پاراتیفی C، ۷: سالمونلا پاراتیفی B، ۸: سالمونلا پاراتیفی B، ۹-۱۹: سالمونلا پاراتیفی A، ۲۰: مارکر Ladder Mix



شکل ۲- ۱:سالمونلا تیفی، ۲:سالمونلا پاراتیفی D، ۳: سالمونلا پاراتیفی A، ۴: سالمونلا پاراتیفی B، ۵: سالمونلا پاراتیفی D، ۶: سالمونلا پاراتیفی A، ۷: سالمونلا پاراتیفی C، ۸: مارکر Ladder Mix

تمامی سروتیپ‌های مختلف از نمونه‌های انسانی دارای باندهای کاملاً یکسانی بودند. اشکال ۲ و ۳ به خوبی نشان دهنده موقعیت باندها در ۵ نوع سروتیپ مختلف می‌باشند.

با توجه به برنامه آماری SPSS و آنالیز Chi-Squar Test متوجه شدیم که ارتباط معنی دار بین نوع سروتیپ و باندهای ایجاد شده در تکنیک PCR-Ribotyping در رابطه با نمونه‌های انسانی وجود نداشت (P<۰/۰۵). بدین معنی که موقعیت باندها نشان دهنده نوع سروتیپ نمی تواند باشد زیرا تمامی سروتیپ‌ها دارای باندهای یکسان در مناطق کاملاً مشابه بودند.

بحث و نتیجه‌گیری

دو ناحیه در توالی ژن ۱۶S-۲۳SrRNA قابل تشخیص است:

۱ـ ناحیه محافظت شده (۴)؛ ۲ـ توالی نواحی داخلی به نام Intergenic Spacer Regions (ISR) (۴).

ژن ۱۶S-۲۳SrRNA به میزان ۲-۱۱ کپی در کروموزوم اکثر باکتریهای خانواده انتروباکتریاسه به صورت محافظت شده وجود دارد(۴). بر اساس اتصال پرایمر به توالیهای این ژن و تکثیر آن و در نهایت بررسی باندهای ایجاد شده از روی عکس ژل الکتروفورز می‌توان جنس باکتری‌ها را طبقه بندی نمود.

تکنیک PCR-Ribotyping در شناسایی توالیهای ژن ۱۶S-۲۳SrRNA، تعیین ارتباط بین جنس‌ها، تحقیقات اپیدمیولوژی و بررسی پلی مورفیسم یک ژن خاص از سرعت وحساسیت زیادی برخوردار است(۴). همچنین در کارهای انجام شده گذشته به مراتب ذکر شده که این روش از قدرت تمایز بالایی در جهت تعیین سروتیپ

نیز برخوردار می‌باشد(۳، ۵ و ۸).

در سال ۱۹۹۶ در کشور ایتالیا، Lagatolla و همکاران بر روی ۲۱۸ سویه سالمونلا با ۱۰ نوع سروتیپ مختلف تکنیک PCR-Ribotyping را با پرایمرهای P۱ و P۲ انجام دادند که نتایج به صورت ۴-۸ باند در محدوده ۱۱۰۰-۷۰۰bp بود. نکته قابل توجه این بود که هر سروتیپ باند مخصوص به خود را داشت و سروتیپ‌های مختلف باندهای متفاوتی داشتند. آنها اعلام کردند که تکنیک PCR-Ribotyping توانایی شناسایی سویه‌های سالمونلا را در حد سروتیپ کردن نیز خواهد داشت بدلیل اینکه سروتیپ‌های مختلف سالمونلا باندهای متفاوتی داشتند و یک نوع باند بخصوص در تمامی سروتیپ‌ها دیده نشد(۴).

در سال ۲۰۰۰ در کشور فرانسه Baudart و همکاران توسط تکنیک PCR-Ribotyping بر روی ۵۷۴ سویه سالمونلا با سروتیپ‌های متفاوت نشان داد که۲-۱۶ باند در مناطق ۳۷۰-۲۰۰۰ bp دیده می‌شود و سروتیپ‌های مختلف شباهت بسیار کمی در نوع باندها با هم داشتند(۲).

در سال ۲۰۰۵ در کشور کره با انجام تکنیک PCR-Ribotyping بر روی ۵۷ سویه سالمونلا متوجه شدند که تمامی سویه‌ها دارای ۴ باند مشابه در منطقه ۲۰۰۰-۶۰۰ bp بودند و سروتیپ‌های متفاوت باندهای دقیقاً مشابه و یکسانی را داشتند(۳).

با توجه به مطالعات انجام شده و نتایج بدست آمده در این مطالعه می‌توان نتیجه گرفت که باندهای ایجاد شده در ۷۵۰, ۹۵۰, ۱۰۰۰, ۱۵۰۰ و ۲۵۰۰ در تمامی سویه‌های سالمونلای جدا شده از مناطق مختلف و با منشاءهای متفاوت، یکسان می‌باشد و در همه وجود دارد. همچنین می‌توان نتیجه گرفت که تکنیک PCR-Ribotyping روشی با سرعت بالا و کم هزینه می‌باشد که برای شناسایی و جداسازی سویه‌های سالمونلا از حساسیت بالا برخوردار است ولی در جهت افتراق سروتیپ‌ها از هم قدرت تمایز کافی و لازم را ندارد. در صورت نیاز به افتراق سروتیپ‌ها از هم باید از تکنیک دیگر با قدرت تمایز بالاتری استفاده نمود. بدلیل اینکه هیچ نوع اختلافی در بین باندها در سروتیپ‌های مختلف وجود نداشت تا بتوان نتیجه گرفت که هر سروتیپ باند مخصوص به خود را دارد. بدلیل وقت گیر و پر هزینه بودن روشهای کشت و سروتیپ کردن باید به دنبال تکنیکی با حساسیت بالا جهت جایگزین کردن این روشها بود که البته تکنیک PCR-Ribotyping فقط توانایی جایگزین شدن روش کشت را دارد توسط این تکنیک و با پرایمرهای P۱ و P۲ فقط می‌توان جنس سالمونلا را تعیین کرد ولی نوع سروتیپ را نمی توان تعیین نمود.

تشکر و قدردانی

لازم می‌دانیم از زحمات همکاران محترم در مرکز تحقیقات گوارش و کبد دانشگاه شهیدبهشتی، دایره تحقیقات بیماریهای ناشی از غذا و اسهال‌های مزمن کمال تشکر را بجا بیاوریم.

References

1- Alverez J. Development of a Multiplex PCR technique for detection and Epidemiological typing of Salmonella in human clinical samples. J of Clin Microb 2004; 42: 1738-1742.

2- Baudart J. Diversity of Salmonella strains isolated from the aquatic environment as determined by serotyping and amplification of the ribosomal DNA spacer regions. Applied and Environmental Microbiology 2000; 53:1544-1552.

3- Hyungkun L. Comparison of four molecular typing methods for the differentiation of Salmonella spp. Int J F 2005; 24:238-241.

4- Lagatolla C. PCR Ribotyping for characterizing Salmonella isolates of different serotypes. J of Clin Microb 1996; 32: 2440-2443.

5- Liebana E. Investigation of the genetic diversity among isolates of Salmonella enterica serovar Dublin from animals and humans from England. Journal of Applied Microbiology 2002; 93: 732–744.

6- Molla B. Sources and distribution of Salmonella serotypes isolated from food animals, slaughterhouse personnel and retail meat products in Ethiopia. Department of clinical studies 2002; 22: 88-93.

7- Radkowski M. Occurrence of Salmonella spp. In consumption eggs in Poland. Int J F 2000; 64: 189-191.

8- Telo A. Occurrence of Salmonella spp. In imported eggs into Albania. Int J F 1999; 49:169-171.

Consideration sensitivity of PCR-Ribotyping method in identification Salmonella spp isolates from patients with diarrhea

*Mehrvar N; MSC[1], Akhavan Sepahi A; PhD[2], Azimi Rad M; BSc[3], Mirsaidi K; BSc[4], Zali MR; MD[5]

Abstract

Background: *Salmonella* is the most important diarrheagenic pathogens, which can cause food borne disease where the main route of transmission among human is through contaminated meat and poultry foods. Its symptoms can be diarrhea, fever, vomiting and sometimes bloody diarrhea. For it's importance, it is essential to be identified and characterized by more precise methods such as molecular techniques. The aim of this study was to consider sensitivity of PCR-Ribotyping method for identification of *Salmonella* spp.

Materials and methods: In this study our samples were Salmonella strains, which were isolated from patients with diarrhea. Their DNA was extracted by phenol/ Chloroform method. We did PCR-Ribotyping method with P1, P2 primers for 16S-23SrRNA gene. At last PCR-products run on 1.8% agarose gel in 120V for 90 min. the analysis was done after Ethidium bromide staining.

Results: All the 40 strains containing paratyphi A, B, C and D serotypes also, serotype typhi contained 5 bands ranging 700 to 2500 bp.

Conclusions: According to the results we can say that PCR-Ribotyping method has the highest sensitivity for identification of genus *Salmonella* but it is not suitable for Serotyping of *Salmonella* strains.

Keywords: Food- borne disease, PCR-Ribotyping, *Salmonellae* spp

1- (*Corresponding author) MSc, Azad University of Medical Sciences, Department of Microbiology,
Tel: 09125161371, E-mail: Narges_Mehrvar@yahoo.com
2- PhD, Azad university of Medical Sciences, Department of Microbiology.
3- BSc, Shahid Beheshty University of Medical Science, Research Center for Gastroenterology and Liver Disease, Department of Food-Borne Disease.
4- BSc, Iran University of Medical Sciences, Hazrat Ali Asghar Hospital.
5- MD, Shahid Beheshty University of Medical Science, Research Center for Gastroenterology and Liver Disease, Department of Food-Borne Disease.