Research on Medicine *Original Article*

The Quarterly journal of School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences Vol.40; No.2; 2016

Genotyping of Salmonella enterica serovar Enteritidis, isolated from human and animal by REP-PCR

Abbas Ali-Shiroodi[1], Mahmood Jamshidian[1], Taghi Zahraei Salehi*[1], Gholam Reza Nikbakht Boroujeni[2], Kumarss Amin[3]

1. Department of Microbiology, Faculty of Specialized Veterinary Science, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran
2. Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
3. Department of Microbiology, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh,

(Received:2015/11/20 Accept:2016/07/2)

Abstract

Background: *Salmonellosis is a zoonotic disease of human and animals. One of the most important serovars in human, livestock and poultry is Salmonella enteritidis, which is a worldwide common foodborne pathogen. Conventional culture, biochemical and serological methods has been shown to have limited value as molecular analysis tool with low discriminatory power but molecular typing methods such as REP-PCR produced DNA profiles for differentiation and characterization of Salmonella strains. The aim of this study was differentiation of isolates of Salmonella enteritidis by molecular fingerprinting method based on repeated sequences (rep-PCR).*

Materials and Methods: *In a cross-sectional study, 64 isolates of Salmonella Enteritidis from various sources (cows, poultry and humans) were studied by rep-PCR method and REP1R and REP2I primers. The molecular patterns were determined on the basis of the existence or absence of DNA fragments were separated according to their size by agarose gel electrophoresis. By using a computer program NTSYS, dendrogram were drawn.*

Results: *The number of 5-14 bands with the approximate size ranging from 100 to 3,000 base pairs with a common fragment (400 bp) were observed. The number of molecular profiles obtained by REP1R and REP2I primers for 64 isolates of Salmonella Enteritidis was 38 profiles. The similarities between avian and human isolates based on cluster analysis were more than bovine isolates and about 72% to 81%. However, a bovine strain known as B13 was found with 82% similarity to human strains.*

Conclusion: *In this study, rep-PCR demonstrated a high discriminatory power in analyzing Salmonella Enteritidis isolates. High heterogeneity (92.8%) was measured in a population of 64 different isolates of Salmonella enteritidis by Shannon-Wiener index. Meanwhile, according to the results, Salmonella enteritidis strains isolated from poultry and human have more similarities together (almost 72-81%) than bovine strains (48% similarity). Therefore, it suggests that epidemiologically risk of human infections caused by Salmonella enteritidis strains, which originates from poultry and its products is higher.*

Keywords: *Salmonella enteritidis, Genotyping, REP-PCR.*

* *Corresponding author: Taghi Zahraei Salehi*
E-mail: tsalehi@ut.ac.ir

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2024-04-19]

پژوهش در پزشکی
فصلنامه علمی پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
مقاله پژوهشی
دور ۴۰، شماره ۲، ۱۳۹۵، صفحات ۷۹ تا ۸۵

ژنوتایپینگ سویه‌های سالمونلا انتریکا سروروار انتریتیدیس جدا شده از انسان و حیوانات با روش REP-PCR

دکتر عباس علی شیرودی[۱]، دکتر محمود جمشیدیان[۱]، دکتر تقی زهرائی صالحی[۱*]، دکتر غلامرضا نیکبخت بروجنی[۲]، دکتر کیومرث امینی[۳]

۱- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران
۲- گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران
۳- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ساوه، ساوه، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۸/۲۹ تاریخ پذیرش مقاله:۱۳۹۵/۴/۱۲

چکیده:

مقدمه: سالمونلوز بیماری مشترک در انسان و حیوانات است. یکی از سروارهای مهم از لحاظ بیماری‌زایی در انسان، دام و طیور، سالمونلا انتریتیدیس است که عامل رایج بیماری‌های منتقله از طریق غذا نیز هستند. روش‌های مرسوم کشت ، بیوشیمیایی و سرولوژیکی نشان داده است که ارزش محدودی از لحاظ آنالیز مولکولی و قدرت تفریق کمی دارند، ولی روش‌های تایپینگ مولکولی نظیر *REP-PCR* الگوهای *DNA* برای تمایز و شناسایی سویه‌های سالمونلا ایجاد می کنند. هدف از این مطالعه تفریق و تمایز و تعیین قرابت بین جدایه‌های مختلف سروار سالمونلا انتریتیدیس به وسیله روش انگشت‌نگاری مولکولی مبتنی برتوالی‌های تکرارشونده *(rep-PCR)* بود.

روش بررسی: طی یک مطالعه مقطعی تعداد ۶۴ جدایه سالمونلا انتریتیدیس از منابع مختلف (گاو، طیور و انسان) به وسیله روش انگشت‌نگاری مولکولی*rep-PCR* باپرایمرهای *REP1R* و *REP2I* بررسی شد و الگوی مولکولی قطعات *DNA* براساس وجود یا غیاب باندها و اندازه آن‌ها در ژل الکتروفورزیس مشخص شد. با استفاده از برنامه کامپیوتری *NTSYS* نمودار درختی یا دندروگرام ترسیم شد.

یافته‌ها: تعداد ۵ تا ۱۴ باند با اندازه تقریبی ۱۰۰ تا ۳۰۰۰ جفت باز *(b p)* با یک باند مشترک *(400 b p)* مشاهده شد. تعداد پروفایل مولکولی حاصل توسط پرایمرهای *REP1R* و *REP2I* در ۶۴ جدایه سالمونلا انتریتیدیس در این تحقیق برابر با ۳۸ پروفایل مولکولی بود که به سه خوشه (کلاستر) اصلی و پنج تحت خوشه (*R1*، *R2b*، *R2a*، *R3* و *R4*) با ۴۸ تا ۸۱ درصد تشابه تقسیم شدند.شباهت بین جدایه های طیور و انسانی براساس دندروگرام بیشتر و حدود ۷۲ تا ۸۱ درصد بوده است. البته یک سویه گاوی به نام B13 دارای ۸۲ درصد تشابه با سویه‌های انسانی مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه *rep-PCR* قدرت تفریق بالایی در آنالیز سویه‌های سالمونلا انتریتیدیس نشان داده است. با استفاده از ضریب شانون-وینر *(index Shannon Wiener)* هتروژنیسیتی بالا (۰/۹۲۸) درجمعیت شامل ۶۴ جدایه مختلف سالمونلا انتریتیدیس مشاهده شد. همچنین با توجه به نتایج کار مولکولی در این تحقیق سویه‌های سالمونلا انتریتیدیس جدا شده از طیور با سویه‌های جدا شده از انسان دارای تشابه بیشتر (به طور تقریبی ۷۲ تا ۸۱ درصد) نسبت به سویه‌های گاوی (تشابه ۴۸ درصد) هستند که بیانگر این موضوع است که از لحاظ اپیدمیولوژیکی احتمال خطر ابتلای موارد انسانی به سویه‌های سالمونلا انتریتیدیس با منشاء طیور بیشتر است.

واژگان کلیدی: سالمونلا انتریتیدیس، ژنوتایپینگ، *REP-PCR*

مقدمه:

سالمونلوز غیرتیفوئیدی (NTS) به‌عنوان عفونت زونوتیک (مشترک) تاثیر زیان‌آوری بر سلامت عامه و تحمیل هزینه‌های درمانی و تحمیل خسارت اقتصادی بر صنایع دامپروری و طیور دارد(۱). به‌ویژه آنکه از دهه ۱۹۹۰ سویه‌های مقاوم به طیفی از آنتی بیوتیک‌ها به دلیل استفاده از آن‌ها در خوراک دام و طیور نیز ظهور یافته‌اند که به‌عنوان یک مشکل سلامت عامه مطرح هستند(۲، ۳). طبق گزارش سازمان بهداشت جهانی در سال ۲۰۱۳، بیماری‌های ناشی از مصرف آب و غذای آلوده سالانه جان ۲/۲ میلیون انسان را می‌گیرد که بیشتر آن‌ها کودکان

نویسنده مسئول: دکترتقی زهرایی صالحی
پست الکترونیک: *tsalehi@ut.ac.ir*

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2024-04-19]

هستند و شایع‌ترین علامت آن اسهال حاد است(۴). به طور جهانی تخمین زده می شود که سالمونلوز غیرتیفوئیدی سالانه سبب ۱/۳ بیلیون مورد عفونت می شود که بیشتر آنها به شکل ملایم دچار شده و خودبخود بهبود می‌یابند. حدود ۹۳ میلیون عفونت روده‌ای و ۱۵۵هزار مورد مرگ در اثر گاستروانتریت شدید و اسهال در انسان در هر سال در پنج قاره دنیا در اثر بیش از ۲۶۰۰ سروار سالمونلا غیرتیفوئیدی(NTS) رخ می‌دهد. در مقابل تعداد مبتلایان به حصبه (تیفوئید) ۱۶میلیون نفر است(۵). این تخمین شامل شکل تهاجمی و سیستمیک سالمونلوز غیرتیفوئیدی (invasive NTS) نمی‌شود. سالمونلوز غیرتیفوئید تهاجمی که عامل مهم عفونت گردش خون در سراسر جهان است و به‌ویژه افراد دچار ضعف سیستم ایمنی مانند اشخاص دچار عفونت با ویروس HIV، مالاریا و کودکان دچار سوءتغذیه و انگل‌های خونی در افزایش خطر ابتلا به بیماری هستند. تخمین زده می‌شود سالانه۳/۴ میلیون نفر در دنیا دچار شکل تهاجمی (iNTS) سالمونلوز می‌شوند که بیشترین موارد در قاره آفریقا در بین جمعیت نوزادان، کودکان خردسال و نوجوانان دچار مالاریا و سوءتغذیه دیده می‌شود و نسبت و مرگ میر شکل تهاجمی سالمونلوز غیرتیفوئید سالانه ۲۰ درصد یعنی ۶۸/۳۱۶ نفر در هر سال است. بیشترین و متداول‌ترین سروارهای عامل شکل تهاجمی (iNTS) مانند شکل روده‌ای سالمونلا انتریتیدیس و سالمونلا تیفی‌موریوم هستند(۶). از این رو شناخت منبع عفونت و اپیدمیولوژی بیماری و شناسایی و تعیین میزان قرابت ژنتیکی بین جدایه‌های مختلف یک سروار دارای اهمیت ویژه است. توالیREP (Repetitive Extragenic Palindrome) نخستین توالی تکرارشونده پالیندرومی است که توصیف شد و مورد مطالعه قرار گرفت. این توالی‌ها به‌شدت محافظت شده هستند و با اندازه آن ۳۰ تا ۴۰ جفت باز است (معمولا ۳۸ جفت باز) و نخستین بار در اشریشیا کولی و سالمونلا تیفی موریوم و لیستریا منوسیتوژنز شناسایی شد. این توالی‌ها خارج یا بیرون ژنی هستند و در نواحی غیرکد دهنده و در بسیاری از اپرانها در ناحیه دیستال پروموتور قرار دارند و کپی‌های متعدد آن ممکن است تا یک درصد ژنوم E. coli و سالمونلا تیفی موریوم را شامل شود(۱۱). سروتایپینگ و روش‌های فنوتیپی مرسوم زمان‌بر بوده و قادر به بررسی ژنتیکی و آنالیز مولکولی DNA ژنوم باکتری نیستند. بنابراین دارای ارزش محدودی از لحاظ بررسی تفاوت‌های ژنتیکی و تحقیق‌های اپیدمیولوژی هستند(۱۲). این تکنیک (rep-PCR) از لحاظ انجام ساده بوده و دارای قدرت تفریق و قابلیت تفکیک و تمایز سویه‌های بسیار نزدیک باکتری‌هااست. همچنین تکرارپذیری خوب و مناسبی داشته و با موفقیت در طبقه‌بندی و تمایز بسیاری از سویه‌های باکتری‌های مختلف گرم منفی و گرم مثبت و قارچ‌ها به کار برده شده است(۷، ۸). هدف از این مطالعه بررسی کاربرد روش rep-PCR (Repetitive sequence–based PCR) در شناسایی و تفریق و تمایز و تعیین مقدار قرابت و شباهت بین جدایه‌های مختلف سروار سالمونلا انتریتیدیس بوسیله این روش انگشت نگاری مولکولی مبتنی برتوالی‌های تکرارشونده کوتاه پراکنده در سراسر ژنوم و تکثیر آن‌ها با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و مقایسه الگوهای حاصل در ژل الکتروفورز بود. تمامی آزمایش‌های مربوط به این تحقیق در آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران از سال ۱۳۹۲ تا ۱۳۹۳ انجام شد.

مواد و روش‌ها:

مطالعه اخیر از نوع مقطعی است که از سال ۱۳۹۲ تا ۱۳۹۳ در دانشگاه علوم و تحقیقات تهران انجام شده است. به طور کلی بذر همه جدایه‌های سالمونلا انتریتیدیس مورد مطالعه در این تحقیق از مطالعات قبلی و پیشین اخذ شده‌اند(۹). جدایه‌ها شامل ۶۴ جدایه سالمونلا انتریتیدیس که از مناطق جغرافیایی مختلف ایران شامل کشتارگاه‌های استان کرمان، گله‌های مختلف مرغ گوشتی، بیماران ارجاعی به بیمارستان طبی کودکان امام خمینی تهران و گاوداری‌های سطح تهران اخذ و جمع‌آوری شدند و با روش استاندارد کشت جداسازی شده بودند و از لحاظ تست‌های بیوشیمیایی، سرولوژی و توسط آنتی‌سرم پلی والان تاژکی (H) و آنتی‌سرم پلی والان سوماتیک (O) تعیین هویت شده بودند. در آغاز بذرهای منجمد از مخزن فریزر خارج و در دمای اتاق آزمایشگاه قرارداده شدند. بعد از خروج از حالت انجماد، کشت‌های باکتریایی اولیه ابتدا به لوله آزمایش حاوی دو میلی‌لیتر محیط کشت مایع آبگوشت قلب و مغز یا BHI (Brain Heart Infusion broth #110493, Merck, Germany) انتقال و تلقیح شدند و به مدت ۴۸–۲۴ ساعت، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در درون انکوباتور قرارداده شدند و سپس بعد از ۴۸ ساعت، از نظر کدورت (رشد باکتری) بررسی شدند. سپس دوباره در پلیت حاوی محیط کشت جامد، آگار لوریا–برتانی یا LB (Luria Bertani agar # 110283, Merck, Germany) کشت داده شدند و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸–۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند.

DNA نمونه‌ها طبق دستورالعمل کیت فرمنتاس (Fermentas genomic DNA purification Kit #K0512, Thermo Fisher Scientific, USA) استخراج شدند. استوک‌های DNA در فریزر در دمای ۲۰– درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. کمیت و کیفیت و خلوص DNA استخراج شده با استفاده از دو روش اسپکتروفتومتری (طول موج ۲۶۰ نانومتر و ۲۸۰ نانومتر) و الکتروفورز DNA روی ژل آگارز ۱/۵ درصد بررسی شد.غلظت مطلوب DNA مقدار ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر است و اگر نمونه فاقد آن باشد یا غلظت آن کمتر از حد مطلوب باشد، دانسیته اپتیک صفر یا پایین بوده و باند قابل رویت در ژل الکتروفورز، به دلیل عدم جذب پرتو فرابنفش(UV) تشکیل نمی‌شود.

شرایط انجام واکنش پلیمراز زنجیره‌ای (PCR Amplification)

برای انجام واکنش REP-PCR از پرایمر REP1R با توالی 5-IIIGCGCCGICATCAGGC—3 و پرایمر REP2I با توالی 5-ACGTCTTATCAGGCCTAC-3 استفاده شد(۱۰). انجام واکنش Rep-PCR با استفاده از میکروتیوب حاوی پرمیکس (حاوی مستر میکس لیوفیلیزه) (AccuPower PCR PreMix, Bioneer Corporation, Korea) در حجم ۲۵ میکرولیتر و با افزودن آب دیونیزه و نمونه DNA استخراج شده و پرایمرها در دستگاه ترموسیکلر BIORAD انجام شد. برای انجام واکنش Rep-PCR یک سیکل در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج‌دقیقه، ۳۰ سیکل در ۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت۳۰ ثانیه، در ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، در ۵۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه سپس یک سیکل در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت هشت دقیقه به دستگاه ترموسیکلر) برنامه داده شد (۱۰). الکتروفورز محصولات PCR در دستگاه الکتروفورز افقی در ژل آگاروز ۱/۵ درصد در شرایط بافری (بافر TBE 1x) در ولتاژ ۱۲۰ میلی‌ولت به مدت ۴۵ دقیقه تا یک ساعت انجام شد (۱۰ و ۱۱). سپس ژل با ۰/۵ میکروگرم/ میلی‌لیتر اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شد و در پرتو ماورای بنفش در دستگاه ژل داکت بیورد (Gel Doc; Bio-Rad) مشاهده و از آن عکسبرداری شد. از سالمونلا تیفی‌موریم استاندارد ۱۴۰۲۸ ATCC اخذ شده از دانشکده دامپزشکی تهران به‌عنوان شاهد مثبت استفاده شد و در دندروگرام به نام M33 است.

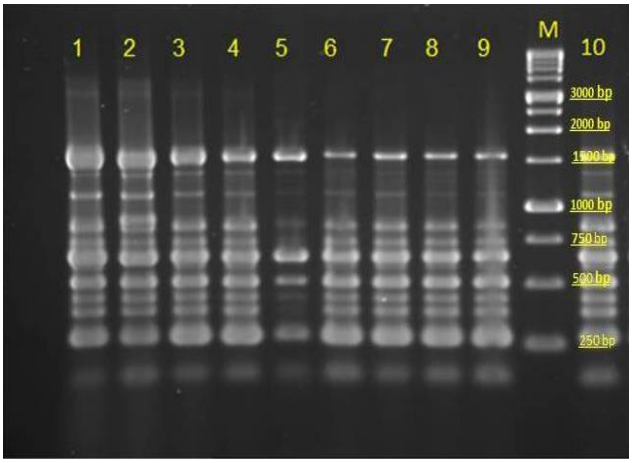
باندها و الگوهای حاصله از انگشت‌نگاری مولکولی واکنش‌های REP-PCR در ابتدا با چشم و به صورت بصری تحلیل شدند و با تهیه جدول (برنامه Notepad) وجود باند با یک سایز مشخص (از۵۰ تا ۳هزار) جفت باز با عدد یک و نبود باند با عدد صفر مشخص شد. این اعداد سپس در جدول‌های برنامه Notepad قرار گرفتند و با برنامه نرم‌افزاری NTSYS ورژن ۲، دندروگرام تهیه شد. در مطالعه حاضر قطعه‌های متعدد DNA به دست آمده در واکنش Rep-PCR متشکل از باندهای قابل رویت، پایدار و دارای قابلیت تولیددوباره بودند و تجزیه و تحلیل شدند. الگوها یا پروفایل مولکولی براساس تفاوت در تعداد و اندازه باندهای حاصل در ژل الکتروفورز تعیین شدند.

یافته‌ها:

در واکنش Rep-PCR در سالمونلا انتریتیدیس، در نمونه‌های گاوی (۱۳ جدایه)، انسانی (۱۹ جدایه) و طیور (۳۲ جدایه) تعداد ۵تا۱۴ باند با اندازه تقریبی ۱۰۰ تا

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2024-04-19]

۳هزار جفت باز با یک باند مشترک (۴۰۰ b p) مشاهده شد (شکل ۱). اندازه تقریبی باندهای مشاهده شده در سویه های مختلف در این مطالعه عبارتند از ۱۰۰، ۲۵۰، ۳۰۰، ۴۰۰، ۵۰۰، ۵۵۰، ۶۰۰، ۷۵۰،۸۰۰، ۸۵۰، ۹۰۰، ۱۰۰۰، ۱۱۰۰، ۱۲۰۰، ۱۳۰۰، ۱۴۰۰، ۱۵۰۰، ۱۶۰۰، ۲۰۰۰، ۲۵۰۰، ۳۰۰۰ جفت باز. در این مطالعه با تجزیه و تحلیل نتایج انگشت نگاری مولکولی به روش REP-PCR در ۶۴ جدایه سالمونلا انتریتیدیس، ۳۸ پروفایل مولکولی مختلف و سه کلاستر اصلی با پنج تحت کلاستر (R1، R2a، R2b، R3و R4) با تشابه بین ۴۸ تا ۸۱ درصد بین کلاسترها مشخص شد (شکل ۲).



شکل۱. انگشت‌نگاری مولکولی DNA ژنومی با روش REP-PCR جدایه‌های سالمونلا انتریتیدیس در نمونه‌های طیور با پرایمرهای REP1R و REP2I. از چپ به راست خطهای یک تا ۹ و ۱۰ جدایه‌های طیور و M شامل مارکر DNA با وزن مولکولی 1-Kb است.

کلاستر R1 شامل ۱۲ پروفایل مولکولی و ۸۸ درصد تشابه و ۱۷ جدایه طیور (M10، M12، M13، M14، M19، M22، M23، M25، M26، M27، M28) و ۹ جدایه انسانی (M1 و M2، M3، M4، M8، M9) است. کلاستر R2a شامل ۱۵ جدایه طیور (M29، M24، M21، M20، M18، M17، M16، M15، M11، M7، M6، M5) و یک جدایه انسانی (H18) است. تعداد هشت پروفایل مولکولی و ۸۶درصد تشابه میان جدایه‌ها مشاهده شد. کلاستر R2b شامل ۹ پروفایل مولکولی و مشتمل بر ۱۷جدایه انسانی H1 تا H17 و یک جدایه گاوی (B13) و ۸۱ درصد تشابه میان جدایه‌ها است. کلاستر R3 دارای پنج پروفایل مولکولی با یک جدایه طیور و ۹ جدایه گاوی B3تاB12 و حدود ۸۳ درصد تشابه میان جدایه‌ها است. کلاستر R4 دارای دو جدایه گاوی (B2 و B1) و دو پروفایل مولکولی است. جدایه گاوی B8 به هیچ کلاستری تعلق ندارد و یک پروفایل مولکولی مستقل است. بنابراین ۳۲ جدایه طیور به دو کلاستر و R1 (R2a با ۷۱ درصد تشابه بین این کلاسترها تقسیم شدند. اما خوشه‌های R2a (مشتمل بر جدایه‌های طیور) و R2b (مشتمل بر جدایه‌های انسان) بیش از ۸۴ درصد تشابه با یکدیگر نشان می‌دهند. کلاستر R1 دارای حدود ۷۱ درصد تشابه با R2a و R2b است و R4 و R3 دارای ۴۸ درصد تشابه با R1، R2a و R2b هستند (شکل۲). بنابراین جدایه‌های طیور و انسان شباهت بیشتری با به کارگیری پرایمرهای REP1R و REP2I نشان دادند و این پرایمرها تنوع ژنتیکی بالایی میان جدایه‌های مختلف سالمونلا انتریتیدیس را آشکار ساختند. قدرت تفریق روش‌های تایپینگ (Discriminatory Powers) براساس فرمول اندیکس تنوع یا شاخص تنوع سیمپسون (Simpson's Index of Diversity) محاسبه شد(جدول ۱). با روش آمار توصیفی نتایج پارامترهایی شامل میانگین (µ) و انحراف معیار(σ) و ضریب تغییرهای CV (Coefficient of Variation) نیز به‌صورت جدول ۲ است. میزان تنوع و هتروژنیسیتی توسط فرمول شانون–وینر (index Shannon Wiener) محاسبه شد و مقدار هتروژنیسیتی ۰/۹۲۸ بوده است.

بحث:

سروتایپینگ و روش‌های فنوتیپی قادر به شناسایی تفاوت‌های ژنتیکی وتغییرات کوچک در ژنوم باکتری نیستند و فاقد پتانسیل تفریق سویه‌های یک سروار هستند. لذا دارای ارزش محدودی از لحاظ بررسی تفاوت‌های ژنتیکی هستند. مطابق با گزارش Versalovic و همکاران (۱۹۹۴) تعداد باند ۸ تا ۱۵ در روش rep-PCR مطلوب است. در این مطالعه در واکنش REP-PCR در جدایه‌های سالمونلا انتریتیدیس تعداد ۵ تا ۱۴ باند با اندازه تقریبی ۱۰۰ تا ۳هزار جفت باز مشاهده شد. همچنین قدرت تفریق روش‌های انگشت‌نگاری مولکولی REP-PCR در۶۰ جدایه سالمونلا انتریتیدیس ۰/۹۶۱۴ یا (۹۶/۱۴درصد) بوده است. در ۱۳ جدایه گاوی ۸ پروفایل مولکولی (فراوانی ۶۱/۵۳ درصد) و در ۱۹ جدایه انسانی، ۱۰ پروفایل مولکولی (فراوانی۴۷ درصد) و در ۳۲ جدایه طیور۲۰ پروفایل مولکولی (فراوانی ۶۲/۵ درصد) مشاهده شد(۱۱). بنابراین با این روش تنوع ژنوتیپی در گروه جدایه‌های طیور بیشترین و در جدایه‌های انسانی کمترین است. قدرت تفریق بالا در روش انگشت‌نگاری مولکولی rep-PCR، در مطالعه‌های بسیاری از محققان (۱۲–۱۵) نیز گزارش شده است. طبق گزارش Hunter و Gaston (۱۹۸۸) شاخص تفریق (Discriminatory Index) یا ارزش D به مقدار بیش از ۰/۹ درصد مطلوب است و نتایج تایپینگ می‌تواند با اطمینان تفسیر شود (۱۶). هتروژنیسیتی از سوی Chmielewski و همکاران (۲۰۰۲) با پرایمر REP و ERIC در جدایه‌های سالمونلا انتریتیدیس نشان داده شد (۱۷). Beyer و همکاران در سال ۱۹۹۸ به مطالعه سودمندی روش

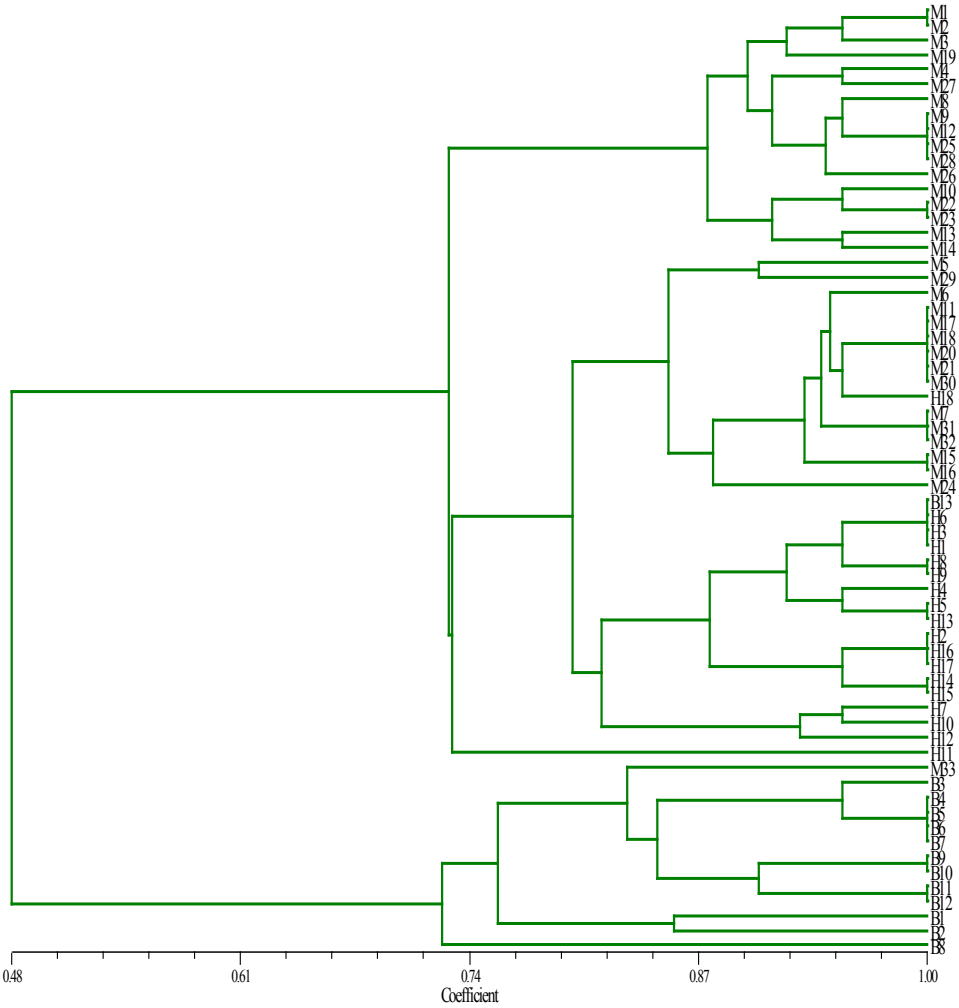
جدول۱. محاسبه ضریب سیمپسون و قدرت تفریق روش rep-PCR با پرایمرهای REP در این مطالعه

شباهت جدایه‌ها (درصد)	خوشه‌ها	قدرت تفریق یا ضریب سیمپسون (SID) %	فراوانی بزرگ‌ترین پروفایل (درصد)	تعداد الگو یا پروفایل مولکولی	روش تایپینگ مولکولی سالمونلا انتریتیدیس
۷۳–۸۸	R1، R2a، R2b، R3 و R4	%۹۶/۱۴	۹/۳۷	۳۸	REP

جدول۲. محاسبه توصیفی میانگین (µ) و انحراف معیار(σ) و ضریب تغییرهای (CV)

داده‌ها (فراوانی یا تعداد یا پروفایل مولکولی)	ضریب تغییرات (CV)	انحراف معیار (SD)	میانگین تعداد جدایه در هر پروفایل معین (Mean)	تعداد پروفایل مولکولی (تعداد آیتم)	روش مولکولی (PCR)	سروار (جدایه)
۱،۱،۱،۱،۱،۱،۱،۱،۴،۱،۲،۲،۴،۳،۱،۲،۲،۱،۲، ۱،۱،۱،۲،۱	۰/۶۹	۱/۱۶	۱/۶۸	۳۸	REP	سالمونلا انتریتیدیس ۶۴ جدایه

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2024-04-19]



شکل۲. دندروگرام میزان شباهت و قرابت سویه‌های سالمونلا انتریتیدیس جداسازی شده از منابع انسانی (H)، گاوی (B) و طیور (M) را نشان می‌دهد که به وسیله روش انگشت‌نگاری مولکولی DNA با روش REP-PCR انجام شده است. M1-M32 جدایه‌های طیور، H1-H19 جدایه‌های انسانی و B1-B13 جدایه‌های گاوی هستند.

REP-RCR مبتنی بر توالی های تکراری و انگشت نگاری مولکولی در مطالعه بر ۵۲ جدایه سالمونلا انتریکا سروار سنت پل (شامل ۵ سویه از چیپس سیب زمینی و ۳۹ سویه جدا شده از موارد انسانی سالمونلوز و هفت سویه دیگر از موارد انسانی، طیور و آزمایشگاه محل کار) هنگام اپیدمی سالمونلوز ناشی از مصرف غذا پرداختند. آن‌ها نتیجه گرفتند هرچند که روش های فنوتیپی برای تعیین خصوصیات جرم بیماری‌زا هنوز مفید است، اما آنالیز مولکولی ژنوم از لحاظ اپیدمیولوژیکی حائز اهمیت است و روش REP- PCR ساده ، سریع، ارزان، حساس و دارای قابلیت تفریق‌پذیری بالا بین سویه‌های یک سروواراست(۱۸). در سال ۲۰۰۰ Benna Sar و همکاران سه روش مولکولی شامل ERIC، REP و RNA ریبوزومی 16S و 23S را انتخاب کردند و به ۱۵ تا ۱۹ باند دست یافتند. آن‌ها دریافتند که الگوهای حاصل از روش ERIC نسبت به روش REP از قدرت تفکیک‌پذیری بالاتری برخوردار نبودند(۱۹). در مطالعه Tien و همکاران (۲۰۱۱) که روی ۵۵ جدایه سالمونلا پاراتیفی A انجام شد، ضمن بررسی اندیکس تفریق دریافتند روش پالس فیلد ژل الکتروفورزیس (PFGE) برای تفریق جدایه‌ها کافی نیست و جدایه‌ها به ۱۴ تیپ با اندیکس تفریق ۰/۷۴۱ تقسیم شدند، اما با روش MLVA (Multiple Locus Variable-number Tandem Repeat Analysis) به ۲۳ تیپ با اندیکس تفریق ۰/۹۳۷ تقسیم شدند(۲۰). در مطالعه Rasschaert و همکاران (۲۰۰۵) از پنج نوع پرایمر در روش مولکولی rep-PC شامل ERIC1R–ERIC2 و REP1R–REP2I و BOXA1R و GTG5 استفاده شد و بیش از ۸۰ سروار و پنج جدایه که قابل شناسایی توسط سرولوژی نبودند، انگشت‌نگاری مولکولی شدند و ضریب تشابه ساده بین پنج سروار با پرایمر ERIC و GTG5 به ترتیب ۷۴درصد و ۸۳درصد بوده است. بر این اساس قدرت تفریق برای پرایمرهای ERIC و GTG5 به ترتیب ۹۵درصد و ۹۴درصد است(۱۲). Weigel و همکاران (۱۹۹۹) با کار روی ۶۸ جدایه سالمونلا از ۱۰ واحد پرورش خوک در ایلینویز، بر قدرت تفریق بزرگ‌تر و تغییرهای بیشتر در پروفایل‌های قطعه‌های حاصل از rep-PCR در مقایسه با PFGE تاکید کردند(۲۱). کاستی‌های موجود در تفکیک‌پذیری سیستم ژل الکتروفورز معمولی توان rep-PCR را به ویژه برای تمییز بین سویه‌های با قرابت ژنتیکی بسیار نزدیک، محدود می‌کند(۲۲). Rajabi و همکاران (۲۰۱۱) با به کارگیری روشی خاص (semi-automated rep-PCR) سیستم نیمه اتوماتیک و برنامه (Diversilab Bio Merieux) اذعان کردند این روش دارای قدرت مساوی با روش PFGE است و به دلیل کنترل داخلی اندازه قطعه‌ها و استفاده از معرف‌های استاندارد شده و سیستم الکتروفورز مویرگی و قابلیت تکرارپذیری بالا از سایر روش‌های rep-PCR مرسوم بهتر است(۲۳). Wise و همکاران (۲۰۰۷) دریافتند که این سیستم نیمه اتوماتیک برای پیشگویی سروار نیز مفید است(۲۴) و Kilic و همکاران (۲۰۱۰) آن را جایگزینی مناسب برای PFGE معرفی کردند(۲۵). Chmielewski و همکاران (۲۰۰۲) اذعان کردند روش rep-PCR با پرایمرهای REP و ERIC دارای قدرت افتراق بالا میان جدایه‌ها در لهستان است، ولی قابلیت تکرارپذیری، تعداد و موقعیت باندها وابسته به نوع دستگاه ترموسیکلر است(۱۷). در مطالعه Mohapatra و همکاران (۲۰۰۷) روی ۲۳۲ جدایه مدفوعی اشریشیا کولی و مربوط به نمونه‌های انسان و پرندگان اهلی و وحشی با پرایمرهای REP، BOX، GTG5) و ERIC براساس پروفایل‌های آشکار شده به ترتیب ۳۴، ۲۸، ۲۲ و ۱۵، و ۱۱ کلاستر مشاهده شد. اندیکس افتراق سیمپسون به ترتیب به مقدار ۰/۹۸۱۸ در 5-PCR-(GTG)، ۰/۹۳۳۲ در BOX-PCR، ۰/۸۸۲۵ در REP-PCR و ۰/۸۲۵۹ در ERIC-PCR بوده است. به طور عمومی کلاسترها دارای ۶۵درصد تشابه در این پنج روش rep-PCR بوده‌اند(۲۶). هرچند سایر روش‌های انگشتی‌نگاری مولکولی DNA برای شناسایی و گروه‌بندی باکتری‌ها مفید هستند (نظیر PFGE)، اما روش rep-PCR تکنیکی سریع و ساده است و دارای قدرت تفریق کافی و مناسب برای شناسایی و تعیین هویت در سطح زیرگونه و سویه است(۱۱). ولی در مقایسه روش هیبریدیزاسیون DNA:DNA و تعیین توالی ژن RNA ریبوزومی

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2024-04-19]

16S (ریبوتایپینگ) روش‌های مفیدتر و دقیق‌تری برای تشخیص باکتری‌ها در سطح جنس و گونه هستند. سایر مطالعه‌ها نشان می‌دهد روش rep و PFGE قدرت تفریقی به طور تقریبی برابر دارند، ولی روش rep-PCR قابل انجام با وسایل استاندارد با زحمت کمتر، مدت زمان کمتر، هزینه کمتر و توان عملیاتی بیشتر است و همچنین قدرت افتراق بالایی در سطح سویه یا جدایه و تکرارپذیری بالایی دارد. از مقایسه multiplex-PCR، rep-PCR، ریبوتایپینگ و AFLP نتیجه گرفته شد که روش rep و PFGE دارای بیشترین توان تفریق کردن در انگشت‌نگاری مولکولی DNA هستند. در مقایسه روش ریبوتایپینگ و هیبریداسیون DNA- DNA، تعیین توالی و سکانسینگ DNA (مانند تعیین توالی ژن RNA ریبوزومی 16S)، در سطح جنس و گونه مفیدترند و دارای قدرت تفریق بسیار بالایی هستند(۲۷).در مطالعه Spigaglia و همکاران (۲۰۰۳) روی ۳۴ جدایه کلستریدیوم دیفیسل از موارد بالینی اسهال در ایتالیا، روش rep-PCR در مقایسه با ریبوتایپینگ و PFGE قدرت تفریق بیشتری نشان داد(۲۸)، با این حال عواملی مانند جهش‌ها و انتقال افقی توالی‌های غیرهمولوگ و پدیده‌های الحاق یا حذف یا هر نوع نوترکیبی ژنتیکی الگوهای انگشت‌نگاری مولکولی را متاثر می‌کند. نتایج مطالعه ما توافق خوبی با سایر مطالعه‌های انجام شده نشان می‌دهد. با استفاده از پرایمرهای مختلف قدرت تفریق بین جدایه‌های باکتریایی نیز افزایش می‌یابد. بنابراین با توجه به این موارد و قدرت تفریق مناسب و بالا، و نتایج به‌دست آمده در این تحقیق روش rep-PCR که با مجموعه‌ای از پرایمرها REP ۱ و2 REP انجام شد، انتخابی مناسب و معقولانه کاربردی برای بررسی آنالیز مولکولی و اپیدمیولوژی جدایه‌های سالمونلا و سایر باکتری‌ها است. با این وجود پیشنهاد می‌شود از سیستم خودکار (Automated Repetitive-Sequence-Based PCR) که در مقایسه با روش دستی (Manual rep-PCR) به دلیل مجهز بودن به برنامه نرم‌افزاری DiversiLab که به طور اتوماتیک به تهیه نتایج شامل دندروگرام، الکتروفوروگرام، تصویر مجازی ژل و الگوهای پراکندگی می‌پردازد (Healy و همکاران ۲۰۰۳) استفاده گردد(۲۹) و همچنین از سایر روش‌های مختلف ژنوتایپینگ مولکولی تا تفکیک و تمایز بیشتر بین جدایه‌ها ایجاد شود.

تشکر و قدردانی:

این مقاله حاصل پایان نامه دانشجویی دکتر عباس علی شیرودی در دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات تهران است. ازجناب آقای دکتر علی مسعودنژاد، استاد محترم و بزرگ منش و ارجمند و عضوهیأت علمی دانشگاه تهران (بخش بیوانفورماتیک) به دلیل کمک شایان و ارزنده‌شان در تحلیل داده‌ها و رسم نمودارها تشکر ویژه می‌شود.

منـابع:

1. Malorny B, Hoorfar J, Bunge C, Helmuth R. Multicenter validation of the analytical accuracy of Salmonella PCR: towards an international standard. J Appl Environ Microbiol 2003;69(1):290-6.

2. Blood D, Radostits O, Henderson J, Arundel J, Gay C. Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, sheep, goats and horses. London: Bailliere Tindall. 1983.

3. Calnek B. Diseases of poultry 10th ed. Iowa State University Press, Ames, IA; 1997.

4. World Health Organization. Salmonella (non-typhoidal) [database on the Internet]. 2013. Available from: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/.

5. Pui C, Wong WC, Chai LC, Tunung R, Ponniah J, Anyi U, et al. Salmonella: a foodborne pathogen. International Food Research Journal 2011;18(2):465-73.

6. Ao TT. Global Burden of Invasive Nontyphoidal Salmonella Disease, 2010. On the Cover 2013;2012:941.

7. Stern MJ, Ames GF-L, Smith NH, Robinson EC, Higgins CF. Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. Cell 1984;37(3):1015-26.

8. Versalovic J, Schneider M, De Bruijn FJ, Lupski JR. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. Methods in molecular and cellular biology 1994;5(1):25-40.

9. Amini K, Salehi TZ, Nikbakht G, Ranjbar R, Amini J, Ashrafganjooei SB. Molecular detection of invA and spv virulence genes in Salmonella enteritidis isolated from human and animals in Iran. Afr J Microbiol Res 2010(4):2202-10.

10. Albufera U, Bhugaloo-Vial P, Issack M, Jaufeerally-Fakim Y. Molecular characterization of Salmonella isolates by REP-PCR and RAPD analysis. Infect. Genet. Evol 2009;9(3):322-7.

11. Versalovic J, Lupski JR. Interspersed repetitive sequences in bacterial genomes. Bacterial Genomes: Springer; 1998. p. 38-48.

12. 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. JCM 2005;43(8):3615-23.

13. Foley SL, White DG, McDermott PF, Walker RD, Rhodes B, Fedorka-Cray PJ, et al. Comparison of subtyping methods for differentiating Salmonella enterica serovar Typhimurium isolates obtained from food animal sources. JCM 2006;44(10):3569-77.

14. Oliveira SDd, Bessa MC, Santos LRd, Cardoso MRdI, Brandelli A, Canal CW. Phenotypic and genotypic characterization of Salmonella Enteritidis isolates. Braz J Microbiol. 2007;38(4):720-8.

15. Bhowmick PP, Srikumar S, Devegowda D, Shekar M, Ruwandeepika HD, Karunasagar I. Serotyping & molecular characterization for study of genetic diversity among seafood associated nontyphoidal Salmonella serovars. Indian J Med Res Pharm Sci 2012;135(3):371.

16. Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. JCM 1988;26(11):2465-6.

17. Chmielewski R, Wieliczko A, Kuczkowski M, Mazurkiewicz M, Ugorski M. Comparison of ITS Profiling, REP-and ERIC-PCR of Salmonella Enteritidis Isolates from Poland. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 2002;49(4):163-8.

18. Beyer W, Mukendi F, Kimmig P, Böhm R. Suitability of repetitive-DNA-sequence-based PCR fingerprinting for characterizing epidemic isolates of Salmonella enterica serovar Saintpaul. JCM 1998;36(6):1549-54.

19. Bennasar A, de Luna G, Cabrer B, Lalucat J. Rapid identification of Salmonella typhimurium, S. enteritidis and S. virchow isolates by polymerase chain reaction based fingerprinting methods. International Microbiology 2010;3(1):31-8.

20. Tien Y-Y, Wang Y-W, Tung SK, Liang S-Y, Chiou C-S. Comparison of multilocus variable-number tandem repeat analysis and pulsed-field gel electrophoresis in molecular subtyping of Salmonella enterica serovars

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2024-04-19]

Paratyphi A. Diagn Microbiol Infect Dis 2011;69(1):1-6.

21. Weigel R, Barber D, Isaacson R, Bahnson P, Jones C. Reservoirs of Salmonella infection on swine farms in Illinois. Proceedings of the 3rd International Symposium on the Epidemiology and Control of Salmonella in Pork 1999; 180-183.

22. Johnson LK, Brown MB, Carruthers EA, Ferguson JA, Dombek PE, Sadowsky MJ. Sample size, library composition, and genotypic diversity among natural populations of Escherichia coli from different animals influence accuracy of determining sources of fecal pollution. J Appl Environ Microbiol 2004;70(8):4478-85.

23. Rajabi M, Jones M, Hubbard M, Rodrick G, Wright AC. Distribution and genetic diversity of Salmonella enterica in the Upper Suwannee River. Int J Microbiol. 2011;13:1-9.

24. Wise MG, Healy M, Reece K, Smith R, Walton D, Dutch W, et al. Species identification and strain differentiation of clinical Candida isolates using the DiversiLab system of automated repetitive sequence-based PCR. J Med Microbiol 2007;56(6):778-87.

25. Kilic A, Bedir O, Kocak N, Levent B, Eyigun CP, Tekbas OF, et al. Analysis of an outbreak of Salmonella enteritidis by repetitive-sequence-based PCR and pulsed-field gel electrophoresis. J Intern Med 2010;49(1):31-6.

26. Mohapatra BR, Broersma K, Mazumder A. Comparison of five rep-PCR genomic fingerprinting methods for differentiation of fecal Escherichia coli from humans, poultry and wild birds. FEMS Microbiol Lett 2007;277(1):98-106.

27. Olive DM, Bean P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. JCM 1999;37(6):1661-9.

28. Spigaglia P, Mastrantonio P. Evaluation of Repetitive Element Sequence-Based PCR as a Molecular Typing Method for Clostridium difficile. . J Clin Microbiol. 2003;41(6):2454-57.

29. Healy M, Huong J, Bittner T, et al. Microbial DNA Typing by Automated Repetitive-Sequence-Based PCR. J Clin Microbiol. 2005;43(1):199-207.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2024-04-19]