ارزیابی روش تشخیص سالمونلا آبورتوس اویس بر اساس کپی IS200 ویژه سروار

دکتر غلامرضا نیکبخت بروجنی[1]* دکتر حسن تاج بخش[1] دکتر اشکان جبلی[2]

دریافت مقاله: ۲ تیرماه ۱۳۸۳
پذیرش نهایی: ۴ آذرماه ۱۳۸۳

هدف: ارزیابی پرایمرهای طراحی شده ویژه سرووار در تشخیص سویه‌های سالمونلا آبورتوس اویس جداشده در ایران.

طرح: مطالعه مشاهده‌ای.

نمونه‌ها: تعداد ۹۷ سویه سالمونلا آبورتوس اویس.

روش: آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای مربوط به کپی IS200 اختصاصی سرووار بر روی تمامی سویه‌ها صورت گرفت و پروفایل‌های متفاوت از لحاظ نتایج PCR با استفاده از روش انگشت نگاری IS200 مورد بررسی بیشتر قرار گرفتند.

نتایج: سویه‌های مورد آزمایش را می‌توان با توجه به نتایج PCR به دوگروه با افزوده‌های ۲ کیلوباز و ۹۰۰ جفت باز تقسیم نمود. تمامی سویه‌های واجد افزوده‌های ۲ کیلوباز در PCR، دارای باند ۱۱ کیلوباز در انگشت نگاری IS200 بودند و تمامی سویه‌های واجد افزوده‌های ۹۰۰ جفت باز در PCR، واجد باند ۹ کیلوباز در نتایج انگشت نگاری IS200 بودند.

نتیجه‌گیری: با استفاده از پرایمرهای ویژه سرووار می‌توان سویه‌های سالمونلا آبورتوس اویس جداشده در ایران را به دو ژنوتیپ عمده تفکیک نمود. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، ۱۳۸۴، دوره ۶۰، شماره ۳، ۲۸۶-۲۸۳.

واژه‌های کلیدی: سالمونلا، آبورتوس اویس، PCR، IS200.

سالمونلا آبوتوس اویس به گوسفند عادت یافته و عامل عمده سقط جنین گوسفند در اروپا و غرب آسیا است. (۱۶،۱۵،۹،۴،۳،۲) علامت مشخص عفونت ایجاد سقط و مرگ و میر بره‌های نوزاد است. سقط در گله هر زمانی در طی دو ماه آخر آبستنی ممکن است رخ دهد و جنین شاید زنده بدنیا بیاید یا روزها قبل از دفع در رحم بمیرد. جفت ماندگی نیز ممکن است رخ دهد اما معمولاً با جنین دفع می‌شود(۸). مرگ و میر میش‌ها عموماً کم است. در شرایط تجربی همه میش‌های سقط کرده بهبودی بی مخاطره‌ای داشته و طی ۲۴ ساعت شروع به غذاخوردن کرده‌اند. مرگ میش‌ها به نظر می‌رسد که بیشتر به دلیل عفونت‌های ثانویه رحم باشد(۸).

بدلیل آنکه عوامل باکتریایی و ویروسی متنوعی باعث بروز سقط در گوسفندان می‌شوند، تشخیص سقط ناشی از سالمونلا آبورتوس اویس اساساً با یافته‌های آزمایشگاهی امکانپذیر است. آزمون‌های تشخیص سرمی گوسفندان ممکن است در سطح گله رهنمون باشند ولی تشخیص قطعی با جدا سازی مستقیم جرم میسر می‌شود(۸،۱۰). معمولا تشخیص باکتری با استفاده از روشهای بیوشیمیایی و سروتیپینگ صورت می‌گیرد. سیستم‌های

۱) گروه میکروب شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.
۲) دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.
*) نویسنده مسؤول: nikbakht@ut.ac.ir

Evaluation of Salmonella abortusovis detection by primers related to serovar specific IS200

Nikbakht Brujeni, GH.,[1] Tadjbakhsh, H.,[1] Jebelli, A.[2]

[1]Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran. [2]Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran.

Objective: Evaluation of primers designed due to the serovar specific IS200 copy for detecting Salmonella abortusovis strains isolated in Iran.

Design: Observational study.

Samples: Ninety seven Salmonella abortusovis strains.

Procedure: PCR amplification was carried out by serovar specific primers and different strains according to PCR results were studied by IS200 fingerprinting analysis.

Results: All strains could be classified in 2 distinct genotypes by 2 kb and 900 bp amplicons in PCR amplification. These two genotypes were related to two different profiles with 11 and 9 kb band respectively in IS200 fingerprinting.

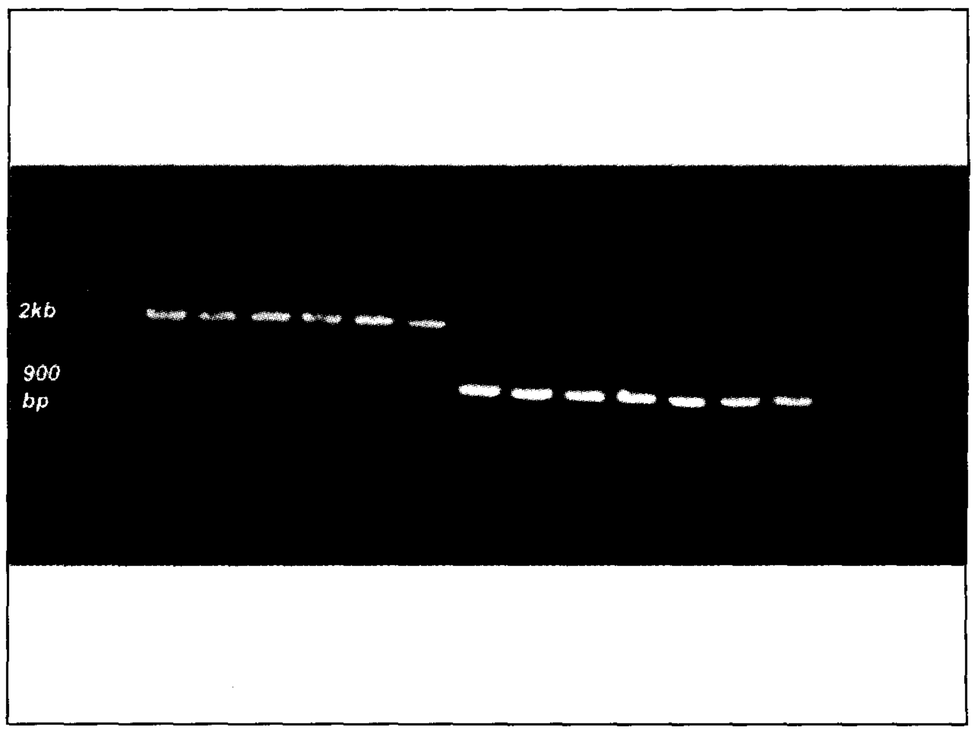
Conclusion: PCR amplification by serovar specific primers was capable of grouping the strains in 2 major genotypic patterns. ***J.Fac.Vet.Med. Univ. Tehran. 60,3:283-286,2005.***

Keywords: salmonella, Abortusovis, PCR, IS200

Corresponding author's email:nikbakht@ut.ac.ir

تشخیص بیوشیمیایی ID E 32 و API 20 E قادر به تفکیک آبورتوس از تیفی نمی‌باشند و سروتایپینگ در نهایت برای تفریق باکتری از سایر سروتیپ‌های سالمونلا مورد استفاده قرار می‌گیرد(۱،۵،۱۱). در صورتی‌که پرایمرهای مناسبی در اختیار باشد از روش PCR نیز می‌توان برای تشخیص سالمونلا آبورتوس اویس استفاده کرد.

IS200 یکی از عناصر جایگزینی است که در سالمونلا آبورتوس اویس به خوبی حراست شده است. در تایپینگ سویه‌های مختلف باکتری، Schiaffino و همکاران در سال ۱۹۹۶ دریافتند که ژنوم تمامی سویه‌های آبورتوس اویس مورد مطالعه در هضم آنزیمی PstI باندی حدود ۹ کیلوباز ایجاد کرده که در هیبریدیزاسیون با پروب IS200 مشخص می‌شود(۱۳). با این احتمال که این باند برای سروار اختصاصی است Beuzon و همکاران در سال ۱۹۹۷ باند IS200 ویژه سروار را در سیستم کلونینگ تهیه و سپس ردیف نوکلئوتیدی آن را مشخص کردند. این محققین همچنین پرایمرهایی را بر اساس ردیف‌های مشخص شده طراحی کرده‌اند تا در روش افزوده سازی PCR جهت تشخیص باکتری به کار رود(۷).



تصویر ۱- نتایج PCR بر روی سویه‌های سالمونلا آبورتوس اویس با استفاده از پرایمرهای اختصاصی سرووار
A) سویه‌های آبورتوس اویس مربوط با پروفایل فاقد باند ۹کیلوبازدر آزمون ساترن بلات B) سویه‌های آبورتوس اویس مربوط با پروفایل واجد باند ۹کیلوبازدر آزمون ساترن بلات C) سالمونلا تیفی موریوم

ما در این تحقیق به ارزیابی پرایمرهای مذکور در تشخیص سویه‌های سالمونلا آبورتوس اویس جداشده در ایران پرداختیم.

مواد و روش کار

درمجموع تعداد ۹۷ سویه سالمونلا آبورتوس اویس دراین تحقیق موردبررسی قرارگرفتند. سویه‌های مذکور در ۶ استان مختلف ایران جدا شده بودند؛ ۲۱ سویه دراستان تهران؛ ۷ سویه دراستان اصفهان؛ ۳۴ سویه در استان چهارمحال و بختیاری؛ ۲۳سویه در خراسان؛ ۱۰سویه فارس ویک سویه در استان گیلان. تمامی سویه‌ها به غیر از استان فارس و چهارمحال و بختیاری بین سالهای ۱۳۴۳ تا۱۳۴۹ جداشده بودند. سویه‌های استان فارس بین سالهای ۱۳۸۰تا۱۳۸۱ و سویه‌های استان چهار محال و بختیاری بین سالهای ۱۳۷۷ و ۱۳۷۸جداشده بودند. یکی از سویه‌ها در سال ۱۳۴۹ از انگلستان دریافت شده بود. تمامی سویه‌ها بر اساس خواص بیوشیمیایی و سروتایپینگ، سرووار آبورتوس اویس شناخته شدند. سروتیپ تیفی موریوم جهت مقایسه با سروتیپ آبورتوس اویس مورد استفاده قرار گرفت.

استخراج DNA: استخراج توسط فنل براساس روش Ausuble وهمکاران درسال ۱۹۸۷ صورت گرفت(۶). ۱/۵ میلی لیتر از کشت ۱۸ ساعته باکتری درمحیط LB در ۱۲/۰۰۰ دور به مدت دو دقیقه سانتریفوژ گردید. رسوب باکتری در ۵۶۷ میکرومتر بافر TE حل گشته وپس از اضافه نمودن ۳۰ میکرولیتر SDS(۱۰درصد) و۳ میکرولیتر پروتئیناز K(۲۰mg/ml) به مدت یک ساعت درگرم خانه ۳۷ درجه سانتیگراد قرار می‌گرفت. سپس ۱۰۰ میکرولیتر M5 NaCl و۸۰ میکرولیتر CTAB/NaCl اضافه شده ومخلوط در ۶۵درجه برای ده دقیقه قرارداده می‌شد. دراین مرحله فنل - کلروفرم - ایزوآمیل الکل به میزان هم حجم به آن اضافه شده، مخلوط گشته ودر ۱۲/۰۰۰ دور به مدت۱۰ دقیقه سانتریفوژ می‌شد (Spectrafuge, Labnet co.). مایع رو دوبار دیگر بافنل کلروفرم ایزوآمیل الکل مخلوط و سانتریفوژ می‌شد. پس از بار سوم انتقال مایع رو به یک لوله تمیز جهت رسوب DNA از ایزوپروپانول استفاده شده ورسوب DNA پس از اضافه کردن یک میلی لیتر اتانل ۷۰درصد وسانتریفوژ ۱۲/۰۰۰ دور به مدت ۵دقیقه خشک ودر میکرولیتر بافر TE حل می‌گشت. درخاتمه یک میکرولیتر RNase (۰/۱mg/ml) (Fermentas co.) اضافه شده ویک شب در ۴درجه سانتیگراد قرارمی‌گرفت.

آزمون PCR: افزوده سازی PCR برای تشخیص سالمونلا آبورتوس اویس براساس روش Beuzon وهمکاران درسال ۱۹۹۷ صورت گرفت(۷). دراین روش از پرایمرهای زیر استفاده شد:

Forward: 5' CGA TGA AAG CGT AAA TAA GG 3'

Reverse : 5' TTC TCT TGT CAG TCT CAA AC 3'

در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر غلظت مواد استفاده شده به ازای هر واکنش بدین قرار است: ۱/۵MgCl2 میلی مول، ۲۰۰dNTPs میکرومول، از هر پرایمر ۱ میکرومول، پلیمراز یک واحد و ۱ میکرولیتر از DNA استخراج شده از باکتری‌ها. چرخه‌های حرارتی شامل ۳ مرحله بودند. مرحله یکم با ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳ دقیقه، مرحله دوم که طی ۳۰ چرخه صورت گرفت و هر چرخه شامل سه گام می‌شد: ۹۴درجه بمدت ۳۰ ثانیه (گام اول)، ۵۲درجه بمدت ۳۰ ثانیه (گام دوم) و ۷۲ درجه بمدت ۶۰ ثانیه (گام سوم) و مرحله سوم ۷۲ درجه به مدت ۵دقیقه.

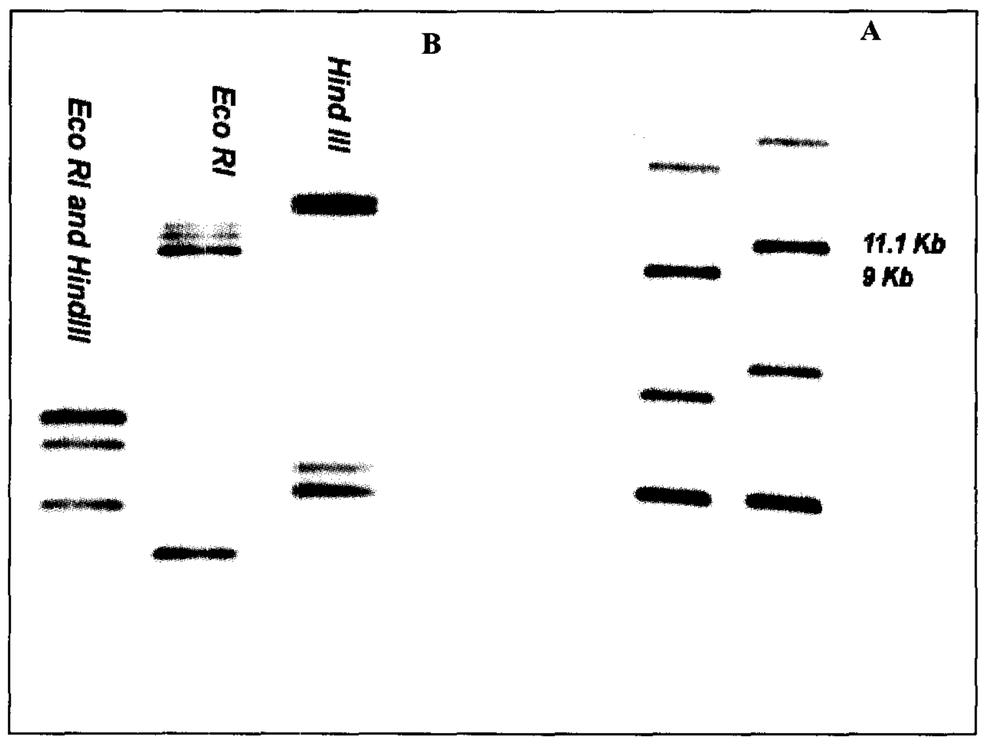
هضم آنزیمی: جهت هضم آنزیمی DNA از آنزیم‌های Pst 1، Eco R1 و Hind III استفاده گردید. پس از اضافه نمودن یک واحد آنزیم برای ۱۰۰۰ نانوگرم DNA، مخلوط به مدت ۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد قرارمی‌گرفت. برای جداسازی باندهای DNA هضم شده از الکتروفورز (BIO-RAD) بر روی ژل آگارز با غلظت ۰/۸ درصد در بافر تریس استات EDTA استفاده شد. شرایط آزمایش با روش Sambrook وهمکاران درسال ۱۹۸۹ تطبیق یافته بود(۱۲).

تهیه پروب IS200: پلاسمید PIZ46 که حامل دی مر IS200 بود. با روش لیز قلیایی جدا شده و با روش استاندارد خالص سازی شد. قطعه ۰/۶ کیلوباز که با اثر آنزیم EcoRI بر روی پلاسمید PIz46 پدید می‌آمد. از ژل آگارز جدا و سیستم Gen clean خالص سازی شد. پروب‌های به‌دست آمده با استفاده از روش کمولومینسانس نشاندار شدند.

آمیخته گری باپروب IS200: ابتدا قطعات مجزای DNA هضم شده بر روی ژل آگارز دناتوره شده وسپس به پرده‌های غشایی نایلون انتقال می‌یافتند. تمامی اعمال پیش از آمیخته گری وپس از آن براساس روش شرح داده شده توسط ساترن انجام گرفتند(۱۴).

نتایج

نتایج آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی سرووار در جدول ۱ نشان داده شده است. همان‌گونه که مشاهده می‌شود سویه‌های مورد آزمایش را می‌توان به دو گروه با افزوده‌های ۲ کیلوباز و ۹۰۰ جفت باز تقسیم نمود. سروتیپ تیفی موریوم افزوده‌ای کمتر از ۲۰۰ جفت باز داشته است. در کل تنها ۱۶ سویه از مجموع کل باکتری‌های مورد مطالعه باندهای ۲ کیلوباز را تولید کردند.



تصویر۲- نتایج آزمون انگشت نگاری ساترن بر علیه IS200با آنزیم Pst I(A) و آنزیم‌های Hind III، EcoR I و هضم مضاعف با هر دو آنزیم (B)

برروی سویه‌های واجد افزوده‌های ۲ کیلوباز و ۹۰۰ جفت باز هضم آنزیمی با آنزیم‌های Pst I، Hind III و Eco RI و همچنین هضم آنزیمی همزمان Hind III و Eco RI نیز صورت گرفت که نتایج آزمون انگشت نگاری IS200 آنها در تصویر ۲ مشخص شده است.

تمامی سویه‌های واجد افزوده‌های ۲ کیلوباز در PCR، فاقد باند ۹ کیلوباز در انگشت نگاری IS200 بودند و تمامی سویه‌های واجد افزوده‌های ۹۰۰ جفت باز در PCR، واجد باند ۹ کیلوباز در نتایج انگشت نگاری IS200 بودند.

تنها اثر هضم آنزیمی Pst I قادر به تفکیک سویه‌های فوق بوده و سایر آنزیم‌ها پروفایل‌های مشابهی را در آزمون انگشت نگاری IS200 نشان دادند. به عبارت دیگر هضم آنزیمی Hind III و Eco RI به طور جداگانه و همچنین هضم آنزیمی همزمان Eco RI و Hind III قادر به تفکیک سویه‌های واجد افزوده‌های ۲ کیلوباز و ۹۰۰ جفت باز نبودند.

بحث

در تایپینگ سویه‌های مختلف باکتری با استفاده از پروب اختصاصی IS200، اسکیافینو و همکاران در سال ۱۹۹۶ دریافتند که ژنوم سویه‌های آبورتوس اویس دارای کپی‌های متعدد IS200 هستند و بر اساس محل قرار گرفتن این کپی‌ها در ژنوم می‌توان سویه‌های مختلف را تفکیک نمود. این محققین نشان دادند که در هضم آنزیمی ژنوم با PstI و سپس هیبریدیزاسیون با پروب IS200 در تمامی پروفایل‌های به‌دست آمده از سویه‌های آبورتوس اویس مورد مطالعه آنها باند حدود ۹ کیلوباز حضور دارد(۱۳). با این احتمال که این باند برای سرووار اختصاصی است Beuzon و همکاران در سال ۱۹۷۷ IS200 ویژه سرووار را در سیستم کلونینگ تهیه و سپس ردیف نوکلئوتیدی آن را مشخص کرده‌اند. بر اساس اطلاعات به دست آمده پرایمرهایی توسط این محققین طراحی و برای تشخیص باکتری با استفاده از روش افزوده سازی PCR معرفی شده است. DNA باکتری‌هایی که واجد IS200 ویژه سرووار هستند با این پرایمرها در PCR قطعات حدود ۹۰۰ جفت باز تولید خواهند کرد و سایر سروتیپ‌های سالمونلا که IS200 را در وضعیت مشابه با آبورتوس اویس ندارند قطعات ۲۰۰ جفت باز را تولید خواهند کرد(۷).

ما در بررسی خود بر روی سویه‌های سالمونلا آبورتوس اویس جدا شده در ایران به دو ژنوتیپ متفاوت برخوردیم که در افزوده سازی PCR با استفاده از پرایمرهای مذکور باندهای ۹۰۰ جفت باز و ۲ کیلوباز را تولید کردند. البته تولید باند ۲ کیلوباز در استفاده از این پرایمرها در مورد دو سویه فرانسوی نیز گزارش شده بود (۷). ولی جالب توجه آن بود که تمامی سویه‌هایی که قطعات ۲ کیلوباز را در PCR نشان داده بودند در انگشت نگاری IS200 به جای باند ۹ کیلوباز، باندی حدود ۱۱ کیلوباز را دارا بودند. (تصویر ۲ بخش A) تغییر محل باند اخیر در ژنوم ممکن است به دلیل موتاسیون جایگزینی یا حذفی و یا موتاسیون در محل برش آنزیم باشد. به همین منظور با سایر آنزیم‌ها نیز برش آنزیمی صورت گرفت ولی در هضم آنزیمی با Hind III، Eco RI و هضم مضاعف با هر دو آنزیم تفاوتی بین سویه‌های متفاوت از لحاظ پاسخ PCR مشاهده نشد. (تصویر ۲ بخش B) از یافته اخیر چنین برمی‌آید که موتاسیون در محل برش آنزیم بوده است ولی باند ۲ کیلوباز در PCR مؤید موتاسیون جایگزینی یا حذفی است.

به هر حال چنین می‌توان نتیجه گرفت که محل برش آنزیم‌های Hind III و EcoR I بعد از محل موتاسیون (Downstream) و محل برش آنزیم Pst I قبل محل موتاسیون (Upstream) قرار گرفته‌اند.

در مجموع این تحقیق نشان می‌دهد که با استفاده از پرایمرهای ویژه سرووار می‌توان سویه‌های سالمونلا آبورتوس اویس جدا شده در ایران را به دو ژنوتیپ عمده تفکیک نمود. از سوی دیگر می‌توان اظهار داشت که هنوز بهترین آنزیم برای تایپینگ سویه‌های سالمونلا آبورتوس اویس در روش انگشت نگاری IS200 آنزیم Pst I است، چرا که به خوبی تفاوت‌های ژنومی را در بین سویه‌های مختلف باکتری مشخص می‌نماید.

References

۱. تاج بخش، ح، نیکبخت بروجنی، غ. (۱۳۸۳): بررسی خواص بیوشیمیایی و الگوهای انتقال مقاومت آنتی بیوتیکی جهت بیوتایپینگ، سویه‌های سالمونلا آبورتوس اویس جدا شده از استان چهار محال بختیاری، مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، در دست چاپ
۲. تاج بخش، ح. (۱۳۵۵): وضعیت سالمونلوزهای دامی ایران، هشتمین کنگره دامپزشکی ایران، تهران.
۳. تاج بخش، ح، محزونیه، م. (۱۳۷۸): آنتی ژن‌های سالمونلا آبورتوس اویس و ره یابی سرم شناسی برای تشخیص موارد آلودگی با کمک آنتی ژن‌های اختصاصی، مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، شماره۲، دوره ۵۴، صفحه: ۴۸ ـ ۴۳.
۴. تاج بخش، ح، نظری آریا، ع، ا. (۱۳۵۸): جغرافیای بیماری‌های واگیر مناطق بیابانی ایران، نامه دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، شماره۳ و ۴ دورهٔ ۳۵، صفحه: ۴۵ تا ۶۸.
۵. زهرایی صالحی،ت. (۱۳۷۸): سالمونلا، انتشارات دانشگاه تهران، شماره ۲۴۲۹
6. Ausuble, M., Brent, R., Kingston, E., Moore, D., Smith, J.K. and Struhl,J. (1987): Current protocols in

molecular biology. Sigma, U.S.A pp: (11)2-9.

7. Beuzon, C., Schiaffino, A., Leori, G., Cappuccinelli, P., Rubino, S. and Casadesus, J.(1997): Identification of Salmonella abortusovis by PCR amplification of a serovar-specific IS200 element. Appl. Environ. Microbiol. 63:2082-2085.
8. Jack.E.J. (1968): Salmonella abortusovis: an Atypical salmonella. Vet. Record. 82:558-561.
9. Pardon, P., Sanchis, R., Marly, J., Lantier, F., Guilloteau, L., Buzoni-Gatel, D., Oswald, I., Pepin, P., Kaeffer, M., Berthon, B. and M. Y. Popoff (1990): Experimental ovine salmonellosis (Salmonella abortusovis). pathogenesis and vaccination. Research. in Microbiology (France.) 141:945-953.
10. Pardon, P., Sanchis, R., Marly, J., Lantier, F., Pepin, M. and M. Popoff(1988):. Ovine salmonellosis caused by Salmonella abortus ovis. Ann. Rech. Vet. 19:221-235.
11. Plagemann, O.(1989): Differential diagnosis of Salmonella abortus ovis and Yersinia pseudotuberculosis isolated from abortions in ewes. J. Vet. Med. Series. B 36:509-514.
12. Sambrook.F, Fritsch, E. and Maniatis, T. (1989): Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.pp: 200-475
13. Schiaffino, A., Beuzon, C. R., Uzzau, S., Leori, G., Cappuccinelli, P., Casadesus, J. and Rubino, S.(1996): Strain typing with IS200 fingerprints in Salmonella abortusovis. Appl. Environ. Microbiol. 62:2375-2380.
14. Southern, E. M. (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J Mol. Biol. 98:503-517.
15. Tadjebakhche, H. and Gatel, A.(1972): Epidemiological study of a severe outbreak of ewe abortions due to Salmonella abortusovis in Khorasan, Iran. Archive of the Faculty of Veterinary Medicine, Tehran. University. , Iran 1:60-64.
16. Travnicek, M., Dravecky, T., Balascak, J. and Prochazka, R.(1986): Bivalent vaccine against Chlamydia psittaci and Salmonella abortusovis infection in sheep. Veterinarstvi 36: 12:548.