بررسی فراوانی اینتگرون‌های کلاس I و پلاسمید حدت در سویه‌های بالینی سالمونلا تیفی موریوم

فرناز حسنیه[۱]، کیومرث امینی*[۲]، میترا صالحی[۳]

چکیده

سروارهای مشخصی از سالمونلا متعلق به تحت گونه I سالمونلا انتریکا پلاسمید حدت حامل اپرون SPV را حمل می‌کنند. این اپرون به همراه دیگر ژن‌ها در ایجاد حدت و مقاومت دارویی نقش عمده‌ای دارد. لذا با توجه به اهمیت موضوع، در این تحقیق به بررسی فراوانی اینتگرون‌های کلاس I و پلاسمید حدت در سویه‌های بالینی سالمونلا تیفی موریوم پرداخته شده است. تعداد ٦٦٣ نمونه مدفوعی از بیمارستان‌های سطح شهر تهران جمع‌آوری گردید. بعد از انجام آزمایشات بیوشیمیایی بر روی نمونه‌ها تعداد ۳۷ جنس سالمونلا جداسازی گردید. سپس با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ST11، ST15 و Fli15، Typ04 به ترتیب مربوط به شناسایی جنس و گونه، از مجموع ۳۷ سالمونلا، ۱۲ جدایه به عنوان سالمونلا تیفی موریوم تائید گردید. در نهایت آزمایش Multiplex PCR با استفاده از پرایمرهای Int و Virجهت بررسی حضور اینتگرون‌های کلاس I و پلاسمید حدت انجام گردید. نتایج نشان داد که از مجموع ۱۲ جدایه، ٤ جدایه (۳۳/۳٪) دارای ژن مربوط به اینتگرون کلاس I و ٥ جدایه (٤١/٧٪) دارای پلاسمید حدت بودند. حضور ژن‌های پلاسمید حدت و اینتگرون‌های کلاس I در بین سویه‌های تیفی موریوم جدا شده در مطالعه حاضر نشان می‌دهد با توجه به انتقال افقی این ژن‌ها، این جدایه‌ها می‌توانند مشکلات جدی در سلامت عمومی، بهداشت جامعه و درمان ایجاد نمایند.

واژگان کلیدی: *سالمونلا تیفی موریوم، پلاسمید حدت، اینتگرون.*

تاریخ دریافت: ۹۲/٤/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۲/٦/۲

مقدمه

باکتری سالمونلا یکی از اعضاء خانواده انتروباکتریاسه است که به صورت باسیل‌های گرم منفی با تاژه‌های پری تریش دیده می‌شود (۱). این باکتری یکی از شایع‌ترین باکتری‌های قابل انتقال از حیوانات به انسان است که به دلیل تنوع مخازن حیوانی یکی از مهمترین عوامل بیماری‌های قابل انتقال از غذا و یکی از مشکلات بهداشتی در سراسر جهان محسوب می‌گردد (١٦). سالمونلاها بیماری‌هایی را در انسان ایجاد می‌کند که به اشکال بالینی گاستروانتریت، تب روده‌ای (تیفوئید یا پاراتیفوئید) و سپتی سمی تظاهر می‌یابند (٦). پیدایش روز افزون مقاومت آنتی بیوتیکی به خصوص مقاومت چند دارویی در سالمونلا انتریکا یک نگرانی مهم است. ژن‌های مقاومت آنتی میکروبی ممکن است از طریق اجزا ژنتیکی متحرک نظیر پلاسمیدها، ترانسپوزون‌ها و اینتگرون‌ها گسترش یابند (۷). اینتگرون‌ها عناصر ژنتیکی هستند که توانایی تسخیر کردن ژن‌ها را به وسیله‌ی نوترکیبی اختصاصی مکان دارند (۹). اینتگرون‌های کلاس I شایع‌ترین نوع اینتگرون‌ها در بسیاری از کشورها، در سروارهای مختلف سالمونلا می‌باشند (۱۱). این اینتگرون‌ها شامل یک قطعه حفاظت شده '٥ (5'CS) و یک قطعه حفاظت شده '۳ (3'CS) می‌باشند. 5'CS حاوی ژن کد کننده آنزیم اینتگراز کلاس I است و همچنین سایت نوترکیبی (attI1) در این ناحیه قرار دارد. 3'CS شامل یک ژن qacEΔ1 است که مقاومت به ترکیبات ٤ گانه آمونیوم را اعطا می‌کند و ژن دیگر این ناحیه sulI می‌باشد که مقاومت به سولفونامیدها را ایجاد می‌نماید (۹). ارتباط اینتگرون‌ها با عناصر متحرک و ژن‌های مقاومت منجر به گسترش و انتشار سریع آنها در بین باکتری ها در محیط هایی که در معرض آنتی بیوتیک قرار دارند، می‌گردد (۱۸). پلاسمید حدت در سروارهای متعددی از سالمونلا انتریکا حامل اپرونSPV است. این اپرون که در حدود ۸ کیلو باز است نقش مهمی در حدت باکتری در برابر میزبان ایفا می‌کند (٤). این اپرون از ٥ ژن *spvA*، *spvB*، *spvC* ، *spvD*

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، گروه میکروبیولوژی، قم، ایران
۲*- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پردیس علوم تحقیقات ساوه، گروه میکروبیولوژی، ساوه، ایران
Kamini@iau.saveh.ac.ir
۳- استادیار گروه میکروب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران

و *spvR* تشکیل شده است که در تقویت و افزایش گسترش سیستمیک پاتوژن نقش دارد (۱۸). ژن‌های *spv* در گونه‌های سالمونلا بونگوری (S. Bongori) حضور ندارند ولی در تحت گونه های I، II، IIIa، IV، VII سالمونلا انتریکا مشخص شده‌اند (۱۲). تحقیقات در سال‌های اخیر نشان داده است که پلاسمیدهای مقاومت ـ ویرولانس نیز می‌توانند شکل بگیرند. اینها پلاسمیدهای هیبریدی هستند که حامل عوامل موثر در مقاومت و ویرولانس یا بیماریزایی می‌باشند(۱۷و۱۳، ۸).

لذا با توجه به اهمیت موضوع در مطالعه حاضر با استفاده از روش Multiplex PCR به بررسی حضور ژن‌های حدت و اینتگرون‌های کلاس I در سویه های بالینی سالمونلا تیفی موریوم به طور همزمان پرداخته شده است.

مواد و روش کار

تعداد ٦٦٣ نمونه از مدفوع بیماران در مراکز درمانی سطح شهر تهران جداسازی گردید. نمونه‌های مدفوع بلافاصله پس از نمونه‌گیری به محیط کشت راپاپورت واسیلیادیس (Rappaport Vasiliadis) منتقل گردید و به آزمایشگاه میکروب‌شناسی انتقال داده شد. سپس بعد از ٢٤ ساعت انکوباسیون به محیط های کشت انتخابی مانند سالمونلا-شیگلا آگار (ssآگار) انتقال داده شد و به مدت ٢٤ ساعت در دمای ٣٧ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس کلونی‌های مشکوک به سالمونلا، جداسازی و جهت انجام تست‌های بیوشیمایی استاندارد نظیر سیمون سیترات، TSI، SIM، MR-VP و اوره مورد شناسایی قرار گرفت. باکتری جدا شده با ویژگی‌های بیوشیمیایی لاکتوز منفی، H_2S مثبت، حرکت مثبت، سیترات مثبت، متیل رد مثبت، هیدرولیز اوره منفی به عنوان یک جدایه متعلق به جنس سالمونلا تعیین گردید. سپس جهت تایید سالمونلا تیفی موریوم ازروش PCR چندگانه با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ST11، ST15 ، Fli15 و Typ04 به ترتیب مربوط به شناسایی جنس وگونه استفاده گردید. برای این روش ژنوم سالمونلا با استفاده از کیت استخراج DNA ژنومی باکتری استخراج گردید. بعد از انجام واکنش PCR و تائید جنس و گونه تیفی موریوم، آزمون Multiplex PCR برای بررسی حضور ژن‌های پلاسمید حدت و اینتگرون‌های کلاس I بکار گرفته شد(جدول ۱). سپس جهت آشکارسازی DNA تکثیر یافته از الکتروفورز نمونه‌ها بر روی ژل آگارز ۰/۸٪ استفاده گردید.

جدول ۱- پرایمرهای مربوط به شناسایی اینتگرون های کلاس I و پلاسمید حدت (۱۰).

نام پرایمر	ژن هدف	توالی پرایمر (5′→3′)	محصول PCR (bp)
FloF FloR	*flo*$_{st}$ (florfenicol)	ACCCGCCCTCTGGATCAAGTCAAG CAAATCACGGGCCACGCTGTATC	٥٨٤
VirF VirR	*spvC* (virulence)	GGGGCGGAAATACCATCTACA GCGCCCAGGCTAACACG	٣٩٢
InvF InvR	*invA* (invasion)	CGCGGCCCGATTTTCTCTGGA AATGCGGGGATCTGGGCGACAAG	٣٢١
IntF IntR	*int* (integron)	GCCCTCCCGCACGATGAT ATTGGCGGCCTTGCTGTTCTTCTA	٢٦٥

واکنش Multiplex PCR در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر شامل بافر PCR (حاوی ۱۵ میلی مولار $MgCl_2$) ۵ میکرولیتر، dNTPs ٤ میکرولیتر، ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر، ۱ واحد آنزیم Taq پلیمراز، DNA الگو ۱ میکرولیتر و آب مقطر استریل ۳٦ میکرولیتر انجام شد. از برنامه Multiplex PCR که شامل دناتوراسیون اولیه در ۹٤ درجه سانتی گراد به مدت ۹۰ ثانیه با تکرار ۱ سیکل، دناتوراسیون در ۹٤ درجه سانتی گراد به مدت ٤٥ ثانیه با تکرار ۳۰ سیکل، اتصال پرایمرهای در ٦۰ درجه سانتی گراد به مدت ٤٥ ثانیه با تکرار ۳۰ سیکل، بسط ابتدایی در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۹۰ ثانیه با تکرار ۳۰ سیکل و تکثیر نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه با تکرار ۱ سیکل استفاده گردید. از سویه استاندارد تیفی موریوم موجود در کلکسیون میکروبی دانشگاه آزاد ساوه با ATCC ۱٤۰۲۸ به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

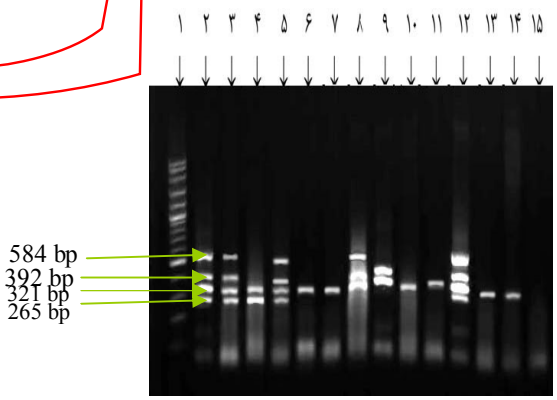
نتایج

بعد از انجام آزمایشات بیوشیمیایی و مولکولی بر روی نمونه های بالینی جدا شده ، از مجموع ٦٦۳ نمونه ،۳۷ جدایه مشکوک به سالمونلا تشخیص داده شد و با استفاده از واکنش Multiplex PCR، از مجموع ۳۷ جدایه جنس سالمونلا ، ۱۲ گونه تیفی موریوم تایید گردید. از این ۱۲ جدایه، ٤ جدایه برای ژن *int* که ژن مربوط به اینتگرون کلاس I می‌باشد مثبت بودند و ٥ جدایه ژن *spvC* که ژن مربوط به پلاسمید حدت می‌باشد را دارا بودند. تمام ۱۲ جدایه باند *invA* که ژن مربوط به تهاجم می‌باشد را نشان دادند. ٤ جدایه نیز برای ژن flo_{st} که ژن مقاومت به آنتی بیوتیک فلورفنیکل می‌باشد مثبت بودند(نگاره ۱).

درصد فراوانی ژن‌های فوق در جدول ۲ بیان شده است.

جدول۲- درصد فراوانی ژن‌ها

باکتری	تعدادکل	ژن*int*	ژن*spvC*	ژن*invA*	ژنflo_{st}
سالمونلا تیفی موریوم	۱۲	٤(٪۳۳/۳)	٥(٪٤۱/۷)	۱۲(٪۱۰۰)	٤(٪۳۳/۳)



نگاره ۱- نتایج حاصل از Multiplex PCR سویه‌های سالمونلا تیفی موریوم

به ترتیب از سمت چپ ۱- Ladder 100 bp ، ۲- کنترل مثبت *S.*Typhimurium(ATCC14028)، ۳ تا ۱٤- سویه‌های بالینی *S.*Typhimurium ، ۱٥- کنترل منفی(آب مقطر).

بحث

بیماری منتقل شونده از راه غذا که به وسیله سالمونلاهای غیرتیفوئیدی ایجاد می‌شود یک مشکل عمده سلامت عمومی در جهان است (۷). اخیراً ظهور سویه‌های واجد مقاومت چندگانه آنتی بیوتیکی سبب بروز مشکلاتی در درمان عفونت حاصل از این باکتری در انسان‌ها و حیوانات شده است (۱٤). بسیاری از ژن‌های مقاوم به آنتی بیوتیک در سالمونلا در عناصر یا اجزاء ژنتیکی متحرک به خصوص اینتگرون‌های کلاس I شناسایی شده‌اند که غالبترین نوع اینتگرون در بین سالمونلاهای دارای مقاومت چندگانه آنتی بیوتیکی می‌باشند (٥). اپرون SPV در پلاسمید ویرولانس چندین سرووار از زیرگونه‌های سالمونلا انتریکا وجود دارد که مسئول عفونت سیستمیک و مقاومت چند

دارویی در انسان‌ها و حیوانات مـی‌باشـد. ژن‌هـای ایـن اپـرون همچنین مسئول القا تکثیر باکتریایی در داخل سلول و آپوپتوزیز ماکروفاژهای آلـوده شـده هسـتند (۲). سـویه‌هـایی از بـاکتری سالمونلا به خصوص تیفـی موریـوم و انتریتیـدیس کـه حامـل پلاسمید ویرولانس هستند می‌توانند بیمـاری سیسـتمیک ایجـاد کنند در حالی که گونه‌هـای فاقـد پلاسـمید حـدت مـی‌تواننـد بیماری موضعی یا بدون علامت را ایجاد کنند (۲). عامل حدت اپرون SPV را به *spvB* و *spvC* نسبت داده‌اند و ژن‌هـای *spvB* و *spvC* می‌توانند به تنهایی جایگزین همه ژن‌های اپـرون SPV پلاسمید حدت از سرووار تیفی موریوم گردند (٦).

یافته‌های ما نشان داد که تقریباً نیمی از جدایه ها برای ژن *spvC* مثبت بودند. در مطالعه انجام شده توسـط Chiu و همکـاران در سال ۲۰۰٦ در کشور تایوان بر روی ۵۹ سالمونلا تیفی موریـوم جدا شده از انسان نشان داد که ۹۱/۵ درصد آنها واجد پلاسـمید حدت بودند (۳). در مطالعه ای که توسط Wienser و همکـاران در سال ۲۰۰۹ در کشور مکزیک بـر روی ۷٦ جدایـه سـالمونلا تیفی موریوم انسانی انجام گردید مشخص شد که ۳۲/۹ درصـد از آنها دارای پلاسمید حدت بودند (۱۹). شیوع اینتگـرون هـای کلاس I در مطالعه حاضر در مقایسه بـا مطالعـات دیگـران نیـز تفاوت‌هایی را نشان می‌دهد. در مطالعه‌ای کـه توسـط Zhang و همکاران در سال ۲۰۰٤ در کشور چـین بـر روی ۲۳ سـالمونلا جدا شده از انسـان انجـام گردیـد مشـخص شـد ۱۷/۳ درصـد جدایه‌ها دارای اینتگرون کلاس I بودند (۲۰). در مطالعـه انجـام شده توسط Jin و همکاران در سال ۲۰۰۹ در کشور هنگ کنـگ بر روی ۸۳٤ سالمونلای جدا شده از انسان مشخص گردید کـه ۱۳ درصـد از آنهـا دارای اینتگـرون کـلاس I بودنـد (۹). در مطالعه‌ای که توسط رجایی و همکاران در سـال ۲۰۱۱ در ایـران بر روی ۸٤ سالمونلا جدا شده از انسان انجام گردید معلوم شـد که ۵۹/۵ درصد از جدایـه‌هـا از اینتگـرون کـلاس I برخـوردار بودند (۱۵).تفاوت در شیوع اینتگرون‌های کـلاس I و همچنـین پلاسمید حدت در مطالعه حاضر در مقایسه با مطالعات دیگـران احتمالاً می‌تواند به دلیل تفـاوت در رعایـت بهداشـت در بـین جمعیت های انسـانی و یـا حیـوانی در کشـورهای مختلـف و همچنین مناطق مختلف یـک کشـور باشـد. همچنـین احتمـالاً می‌تواند به دلیل تفاوت در میزان استفاده از مواد ضـد میکروبـی در درمان انسان و حیوان در کشـورهای مختلـف باشـد. وجـود اینتگرون‌های کلاس I و پلاسـمید حـدت در بـین جدایـه‌هـای بدست آمده در مطالعه حاضر و احتمال انتقال افقی آنها مـا بـین سویه‌ها، می‌تواند نشان دهنده یک زنگ خطر جـدی در جامعـه بهداشتی ما باشد. برخورداری این جدایه‌ها از پلاسمید حدت و اینتگرون‌های کلاس I نشان می‌دهد که این جدایه‌ها مـی‌تواننـد مشکلات جدی در سلامت عمومی، بهداشت جامعـه و درمـان ایجاد نمایند. نتیجه نهایی اینکه روش‌های تشخیصی سریع مانند Multiplex PCR مـی‌توانـد در شناسـایی همزمـان ژن‌هـای اینتگرون و پلاسمید حدت مفید باشد. با شناسایی ایـن ژن‌هـا و اطلاع از حضور آنها و با درمان آنتی بیوتیکی به موقع و استفاده از آنتی بیوتیک‌های مناسب و با رعایت دوز کامـل مـی‌تـوان از انتقال این ژن‌ها مابین سویه‌ها جلوگیری به عمل آورد.

فهرست منابع

۱. رنجبر، ر.، ناغونی، ع.، تبرائی، ب. (۱۳۸۷): ناهمگونی الگـوی مقاومت آمینو گلیکوزیدی در میان ایزوله های بالینی سالمونلا در تهران، مجله میکروب شناسی پزشکی ایران، (۲): ۳۳-۲۷.

2. Amini, K., Zahreai salehi, T., Nikbakht, G., Ranjbar, R., Amini, J., Ashrafgan jooei, Sh. (2010): Molecular detection of *invA* and *spv* virulence genes in *salmonella* Enteritidis isolated from human and animals in Iran. Afri. J. Micro. 4(21): 2202-2210.

3. Chiu, C.H., Su, L.H., Wang, M.H., Yeh, C.M., Weill, F.X., Chu, C. (2006): Detection of multidrug- resistant *salmonella enterica* serovar Typhimurium phagetypes DT102, DT104 and U320 by multiplex PCR. JMC. 44(7): 2354-2358.

4. Chu, C. S., Hong Tsai, C. W., Lin, T., Liu, J. T. ou. (2001): Comparative physical and genetic maps of the virulence plasmids of *salmonella enterica* serovar Typhimurium, Enteritidis, Cholerasuis, and Dublin. Infect. Immun. 67: 2611-2614.
5. Chuanchuen, R., Ajari Yakhajorn, K., Koowatananukul, C., Wanna Prasat, W., Khemtong, S., Samngamnim, S. (2010): Antimicrobial resistance and virulence genes in *salmonella enterica* isolates from dairy cows. Food. Pathog. .Dis. 7(1): 63-68.
6. Donald, G., Fierer, J. (2011): The role of the *spv* genes in *salmonella* pathogenesis. Front. Microb. (2): 1-8.
7. Firoozeh, F., Shaheheraghi, F., Zahraei salehi, T., Karimi, V., Aslani, MM. (2011): Antimicrobial resistance profile and presence of class I integrons among *salmonella enterica* serovars isolated from human clinical specimens in Tehran. Iran. Iranian J. Microb. 3(3): 112-117.
8. Irene Rodriguez, M. Rosario Rodico, Beatriz Guerra, katie L. Hopkins. (2012): Potential International spread of multidrug- resistant invasive *salmonella enterica* serovar Enteritidis. Emer. infec. Dis. 18(7): 1173-1176.
9. Jin, Y, Ling, J. M. (2009): Prevalence of integrons in antibiotic resistant *salmonella* spp. in Hong Kong. Jpn. J. Infect. Dis. 62: 432-439.
10. Khan, A., Nawaz, M., Khan, S., cerniglia, C. (2000): Detection of multidrug- resistant *salmonella* Typhimurium DT104 by multiplex polymerase chain reaction. FEMS Microb. letters. 182: 355-359.
11. Levings, R. S., D. Lightfood, S. R. Partridge, R. M. Hall, S. P. D jordjevic. (2005): The genomic island SGI1, containing the multiple antibiotic resistance region of *salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 or variant of it, is widely distributed in other S. enterica serovars. J. Bacteriol. 187: 4401-4409.
12. Libby, S. J., Lesnick, M., Hasegawa, P., kurth, M., Belcher, C., Fierer, J., Guiney, D. G. (2002): Characterization of the *spv* locus in *salmonella enterica* serovar Arizona. Infect Immun. Jun. 3290-3294.
13. Lindstedt, B. A., Heir, E., Nygard, I., Kapperud G. (2003): Characterization of class I integrons in clinical strains of *salmonella* enterica subsp. *Enterica* serovars Typhimurium and Enteritidis from Norwegian hospitals. Med. Microb. 52: 141-148.
14. Miriagou, V., Carattoli, A., Fanning, S. (2006): Antimicrobial resistance islands: Resistance gene cluster in *salmonella* chromosome and plasmids. Microbes Infect. 8: 1923- 1930.
15. Rajaei, B., Siadat, S. D., Razavi, M.R., Aghasadeghi, M.R., Sepehri Rad, N., Badmasti, F., Khanjani Jafroodi, S., Rajaei, T., Moshiri, A., Javadian, S. (2011): Expanding drug resistance through integron acquisition in *salmonella* spp. Isolated obtained in Iran. Afric. J. Microb. 5(16): 2249-2253.
16. Ranjbar, R., Salimkhani, E., Sadeghifard, N., Zaeimi Yazdi, J., Morovvati, S., Jonaidi, N., et al. (2007): An outbreak of gastroenteritis of unknown origin in Tehran. Pak J Biol Sci. 10(7): 1138-40.
17. Rodicio, MR., Herrero, A., Rodriguez, I., Garcia, P., Montero, I., Beuthch, J., et al. (2011): Acquisition of antimicrobial resistance determinants by virulence plasmids specific for non typhoid serovars of *salmonella enterica*. Rev. Med. Microbiol. 22: 55-65.
18. White, P.A., C. J. Mclver, W.D. Rawlinson. (2001): Integrons and cassettes in the *Enterobacteriacea*. Antimicrob. Agents chemother. 45: 2658-2661.
19. Wienser, M., Zaidi, M.B., Calva, E., Fernandez-Mora, M., Calva, J.J., Silva, C. (2009): Association of virulence plasmid and antibiotic resistance determinants with chromosomal multilocus genotypes in Mexican *samonella enterica* serovar Typhimurium strains. BMC Microbiol. 278: 223-230.
20. Zhang, H., Shi, L., Li, L. (2004): Identification and characterization of calss I integrons from healty human in China. Microbiol. Immunol. 48: 639-645.

JCP