Archive of SID

مجله علمی- پژوهشی زیست فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی
پاییز 1389، دوره دوم، شماره ششم، صفحه24-19

تیپ بندی مولکولی جدایه های مختلف صفراوی *اشریشیا کلی* با استفاده از روش RFLP- DGGE

سمیه جهانی شرافت[1]،الهه تاج الدین[1]، مسعود آل بویه [1]، احسان ناظم الحسینی مجرد[1]، امیرهوشنگ محمد علیـزاده[1]، محمـد رضا سید مجیدی[1]، محمد رضا زالی[1]

1- پژوهشکده تحقیقات بیماری های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

نویسنده مسؤول: دکتر مسعود آل بویه، پژوهشکده تحقیقات بیماری های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
masoud.alebouyeh@gmail.com

دریافت: 89/6/19 پذیرش: 89/8/28

چکیده

زمینه و هـدف: هدف از این مطالعه ردیابی باکتری های مسئول عفونت های مجاری صفراوی و بررسی حساسـیت روش RFLP- DGGE به عنوان یک روش کمکی جهت تمایز جدایه های مختلف باکتریایی در سطح سویه می باشد.

روش بررسـی: تعـداد 60 نمونـه مـایع صـفراوی بـه روش (ERCP Cholangiopancreatography Endoscopic Retrograde) از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان طالقانی جمع آوری گردید. ایزوله های باکتریایی مرتبط پس از تعیین هویت و بررسی مقاومت دارویی، به منظور ردیابی تنوع ترادفی نواحی ژنـی بـه کمـک روش فنـل- کلروفرم مورد استخراج DNA ژنومی قرار داده شدند. تمایز این جدایه ها بر اساس آزمون RFLP- DGGE بر روی محصول واکنش PCR قطعه ژنی 16s rRNA صورت گرفت. در پایان بر اساس مقایسه الگوی بانـدی نمونـه هـا بـا الگوی باندی سویه استاندارد و نتایج آنتی بیوگرام،کارآیی این روش مورد تفسیر قرار گرفت.

یافته ها: از 60 نمونه جمع آوری شده مایع صفراوی تعداد 38 جدایه باکتریایی از میان 26 نمونه جدا گردید. در سایر نمونه ها نتایج کشت باکتریایی منفی بود. از این 38 جدایه 16 جدایه *اشریشیا کلی*، 10 نمونه *کلبسیلا پنومونیه*، 8 نمونه *انتروکوکوس فکالیس*، و 4 نمونه *سودوموناس ائروژینوزا* بدست آمد. بیشترین میزان مقاومت در میان این جدایه مربوط به داروهای آموکسی سیلین(100%) وآمپی سیلین(75%) بود. نتایج آزمون RFLP- DGGE موید تفاوت در الگوهای باندی جدایه های تحت مطالعه بود؛ این اختلاف ها توسط تنوع الگوی مقاومتی حاصله از آنتی بیوگرام مورد تایید بیشتر قرار گرفت.

نتیجه گیری: نتایج این بررسی نشان داد که روش RFLP –DGGE بر روی نواحی ژنـی طویـل از 16S rRNA روش مناسبی جهت بررسی تفاوت سویه های باکتری هایی جدا شده از نمونه های بالینی می باشد. ایـن روش توانسـت چهار تیپ شایع از جدایه های مقاوم *اشریشیا کلی* را بخوبی از یکدیگر تمایز دهد، از اینرو بنظر می رسـد روش حاضـر بتواند به عنوان یک روش فرعی در غربالگری مولکولی جدایه های *اشریشیا کلی* مورد استفاده قرار گیرد. برای بالا بـردن اختصاصیت و حساسیت این روش به عنوان یک روش استاندارد برای تیپ بندی انجام مطالعات مقایسه ای با سایر روش های تیپ بندی مولکولی و همچنین مطالعه بر روی طیف وسیعتری از باکتری ها نیاز است.

واژه‌های کلیدی: RFLP –DGGE، صفرا، *اشریشیا کلی*

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

ردیابی و شناسایی منبع میکروبی عفونت ها در مناطق درگیر از اهمیت ویژه ای برخوردار است. شناسایی و تمایز سریع سویه های مختلف باکتریایی مسئول این عفونت ها یکی از اهداف مهم در مطالعات اپیدمیولوژیک به منظور ردیابی منبع اصلی آلودگی محسوب می شود. مطالعات متعددی در جهت نیل به این هدف صورت پذیرفته است و در نتیجه آنها روش های مختلفی نیز ابداع گردیده است، از جمله این روش ها می توان به روشهای PCR-RFLP ، PFGE،Ribotyping، روش های مبتنی بر هیبریداسیون و روش های مرتبط با ردیابی نواحی متغیر ژنی در باکتری ها اشاره نمود. ژل الکتروفورز با شیب غلظتی ترکیب دناتوره کننده (DGGE) یکی از دقیق ترین روش های به کار برده شده در این زمینه محسوب می شود (1 و 2). این روش در ابتدا به منظور شناسایی موتاسیون‌های نقطه‌ای ابداع گردید ولی می‌تواند جهت تشخیص حذف‌های کوچک و الحاق های متعدد چند جفت بازی در میان رشته‌های DNA تحت مطالعه نیز مورد استفاده قرار گیرد. این روش بر اساس تفاوت در موقعیت مکانی تفکیک شدن رشته‌های DNA در یک شیب غلظتی از ماده دناتوره کننده انجام می‌شود. از آنجا که هدف از انگشت‌نگاری DNA باکتریایی، شناسایی تفاوت در توالی های موجود میان سویه های مختلف باکتری است، می‌توان با کمک این روش، سویه های مختلف باکتریایی را بر اساس تفاوت در توالی هایشان از یکدیگر تمایز نمود(3). در این مطالعه تلاش شده است تا ضمن ردیابی باکتری های مسئول عفونت های مجاری صفراوی، کارایی روش RFLP- DGGE نیز به عنوان یک روش کمکی به منظور تمایز جدایه های مختلف باکتریایی مورد ردیابی قرار گیرد.

روش بررسی

نمونه گیری: در این تحقیق تعداد 60 نمونه مایع صفراوی به روش ERCP از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان طالقانی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی جمع آوری گردید. علت انجام ERCP در این بیماران سنگ مجاری صفراوی و عفونت مجاری صفراوی، سرطانهای مجاری صفراوی و لوزالمعده و بیماریهای التهابی بود. بدین منظور میزان حداقل دو میلی لیتر صفرا از محتویات مجرای صفراوی هر بیمار، توسط آسپیراسیون در طول جراحی تهیه و در یک ظرف استریل جمع آوری گردید. نمونه ها جهت بررسی های بیشتر بلافاصله به آزمایشگاه ارسال می گردید.

تعیین هویت میکروبی: نمونه ها به منظور بررسی میکروبی پس از دریافت در لوله های انتقال نمونه استریل، بلافاصله در محیط های بلاد آگار و مک کانکی آگار تحت شرایط هوازی و بروسلا آگار حاوی خون 5% تحت شرایط میکروائروفیل (آلمان Merck) کشت و در دمای 37 درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شدند. تعیین هویت جدایه ها با کمک آزمون های بیوشیمیایی استاندارد از قبیل حرکت، سیترات، تخمیر قند گلوکز، اندول و لیزین دکربوکسیلاز و سایر آزمون های تخصصی انجام پذیرفت (4).

بررسی حساسیت آنتی بیوتیکی: آزمون حساسیت آنتی بیوتیکی جدایه ها، با استفاده از راهنمای استاندارد آزمایشگاه های بالینی (CLSI) و با کمک روش انتشار دیسک در محیط مولر هینتون آگارانجام شد(5).

RFLP-DGGE: بمنظور ردیابی تنوع ترادفی نواحی ژنی در میان باکتری های شناسایی شده، DNA ژنومی باکتری ها به کمک روش فنل- کلروفرم مورد استخراج قرار گرفت (6). قطعه 16s rRNA در این نمونه ها با کمک روش PCR تکثیر گردید. توالی پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه به قرار ذیل بود(7).

16s–27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG)

16s– 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT)

واکنش تحت شرایط دناتوراسیون اولیه در دمای 94 درجه سانتی گراد به مدت 5 دقیقه، طویل سازی طی 30سیکل شامل 94 درجه سانتی گراد به مدت 30 ثانیه و ادامه طویل سازی 56 درجه سانتی گراد به مدت 30 ثانیه، و مرحله طویل سازی نهایی در 72درجه سانتی گراد به مدت 10 دقیقه انجام گرفت. محصول های تکثیر یافته با استفاده از این پرایمرها 1100 جفت باز درازا داشته که پس از بررسی بر روی ژل آگارز 1%، تحت تاثیر آنزیم برش دهنده *Sma* I (آلمان- Roche) قرار داده شدند، بدین منظور مقدار 10 µl از محصول PCR با آنزیم برش دهنده (1 µl آنزیم، 18 µl آب مقطر، 2 µl بافر) به مدت 16 ساعت در دمای 25 درجه مجاور گردید. محصول های PCR سپس جهت مشاهده موتاسیون های احتمالی بر روی ژل دناتوره کننده 8% با گرادیان حاصل از اوره و فرماماید (40

www.SID.ir

Archive of SID

تا 80 درصد) در دمای ثابت 60 درجه سانتی گراد به مدت 12 ساعت در 45 ولت الکتروفورز گردیدند. ژل حاصل در خاتمه به مدت 20 دقیقه توسط اتیدیوم برماید رنگ آمیزی گردید.

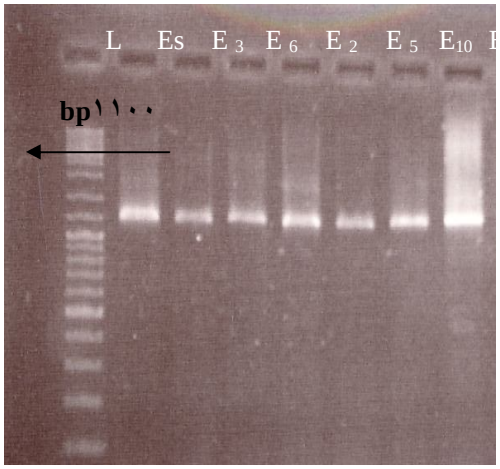
یافته‌ها

در این مطالعه 38 جدایه باکتریایی از 26 نمونه از 60 نمونه صفراوی جداسازی گردید، سایر نمونه ها فاقد باکتری بودند. از میان این 38 نمونه 16 جدایه *اشریشیا کلی* بدست آمد. جدایه های باکتریایی شایع شناسایی شده در این تحقیق متعلق به *اشریشیا کلی* ، *کلبسیلا پنومونیه*، *انتروکوکوس فکالیس* و *سودوموناس ائروژینوزا* بودند(جدول1). این جدایه ها دارای الگوی مقاومت دارویی متفاوتی بودند. بیشترین میزان مقاومت در میان این جدایه مربوط به داروهای آموکسی سیلین(100%) وآمپی سیلین(75%) بود. نتایج آنتی بیوگرام جدایه های *اشریشیا کلی* در جدول شماره 2 نشان داده شده است.

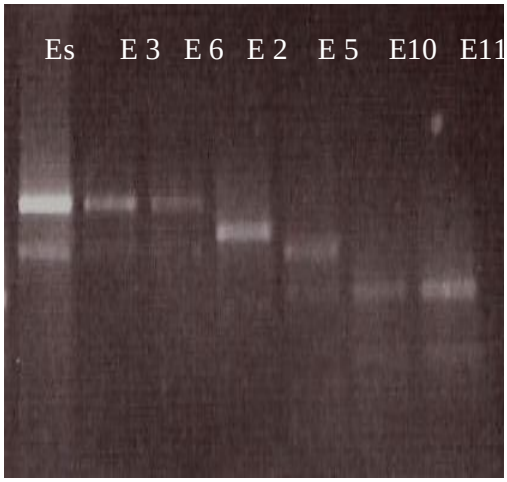
جدول 1. جدایه های باکتریایی جدا شده از نمونه های صفراوی

نام باکتری(تعداد /درصد)		نام باکتری(تعداد /درصد)	
اشرشیا کلی	16(42/1)	*انتروکوکوس فکالیس*	8(21/05)
کلبسیلا پنومنیه	10(26/31)	*سودوموناس آئروژنوزا*	4 (10 /52)
تعداد کل:38(100)			

نتایج حاصل از PCR بر روی ناحیه ژنی 16 s rRNA (شکل 1) و انجام الکتروفورز بر روی محصول هضم آنزیمی توسط آنزیم محدود کننده *Sma* I (دو قطعه bp 500 و bp 600) توسط دستگاه DGGE، در این مطالعه نشان داد که روش RFLP-DGGE روشی کارآمد جهت تمایز سویه های مختلف باکتریایی، در این مطالعه در مورد *اشریشیا کلی* است. همانگونه که در این شکل دیده می شود باند های شناساگر در این روش بر اساس تفاوت های ترادفی در چهار جایگاه متفاوت از ژل قرار گرفته اند(شکل 2).



شکل 1. الگوی باندی PCR جدایه های مختلف اشرشیا کلی. L : مارکر وزن مولکولی مخلوط، Es: سویه E. coli ATCC 25922، نمونه های E3-E11 مربوط به جدایه های بالینی اشرشیا کلی می باشند.



شکل 2. الگوی باندی RFLP-DGGE جدایه های مختلف اشرشیا کلی. نمونه Es : سویه E. Coli ATCC 25922، نمونه های E3-E11 مربوط به جدایه های بالینی اشرشیا کلی می باشند.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول 2 ،بررسی حساسیت دارویی در جدایه های صفراوی اشریشیا کلی

باکتری E.coli / آنتی بیوتیک	TE R (%)	CP R (%)	IMP R (%)	TOB R (%)	SXT R (%)	NA R (%)	AN R (%)	PIP R (%)	CAZ R (%)	GM R (%)	AM R (%)	AMX R (%)	FEP R (%)	FOX R (%)
E 1	R	S	S	S	R	S	S	S	R	S	R	R	R	R
E 2	R	R	R	S	S	R	S	S	R	S	R	R	R	R
E 3	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	R	R
E 4	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
E 5	R	R	S	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	S
E 6	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	R
E 7	R	S	S	S	R	R	S	S	R	S	R	R	R	R
E 8	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S
E 9	R	R	R	S	S	R	S	S	R	S	R	R	R	R
E 10	S	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R
E 11	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R
E 12	R	S	S	S	R	S	S	S	R	S	R	R	R	R
E 13	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
E 14	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S
E 15	S	R	S	S	R	S	R	R	R	S	R	R	S	R
E 16	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S
Total	44/5	44/5	44/5	11/11	44/5	44/5	11/11	11/11	44/5	11/1	77/8	100	55/5	55/5

تتراسایکلین (TE: (30 µg , سیپروفلوکساسین (CP:(5 µg , : ایمی پنم(IMP:(µg10 ,توبرامایسین (TOB: (10 µg , تریمتوپریم, SXT: , نالیدیکسیک اسید(NA:(10 µg
آمیکاسین(AN:,(30 µg پی پراسیلین (PIP: (100 µg , CAZ: سفتازیدیم(30(µg), جنتامایسین(GM:(10 µg , آموکسی سیلین (AMX: (10 µg سفپیم(FEP:(30 µg ,
فلاکساسین(FOX: (10 µg مقاومت دارویی :R ,حساسیت دارویی:S

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

بررسی تنوع جدایه های باکتریایی به روش DGGE با استفاده از تکثیر ناحیه ژنی 16s rRNA روشی بسیار کارآمد و ساده محسوب می شود که بدون نیاز به تعیین توالی ژنومی می تواند اطلاعات ارزشمندی را جهت غربالگری اولیه جدایه های تحت مطالعه فراهم آورد(8). طول قطعات ژنی مناسب برای این روش در محدوده 100 تا 400 جفت باز می باشد. با توجه به اهمیت بررسی قطعات ژنومی بزرگتر می توان این محدودیت را توسط بکارگیری توام آن در کنار روش هضم آنزیمی برطرف نمود. صفرا در افراد سالم استریل و فاقد هر گونه باکتری می باشد و وجود میکرو ارگانیسم ها در صفرای انسان می تواند نشانه ای از وجود یک مشکل بالینی باشد که در اغلب موارد با بیماری cholelithiasis مرتبط است(9و10). شناسایی میکرو ارگانیسم های دخیل در ایجاد این بیماری ها و ارزیابی وضعیت مقاومت دارویی آنها می تواند کمک شایانی به پزشکان جهت تشخیص عوارض بیماری یا کنترل آنها نماید. عفونت های مجاری صفراوی اغلب با منشا اندوژن می باشند در نتیجه هدف از مطالعات اپیدمیولوژیک دراین نوع از عفونت ها اثبات نقش باکتری ها و تنوع در توان بیماری زایی جمعیت های مختلف باکتریایی دخیل در بروز این علائم و پیرو آن شناسایی راهکارهای جدید درمانی جهت کنترل این بیماری ها است (11). مطالعات کمی در رابطه با نقش باکتری ها در ایجاد عفونت های مجاری صفراوی صورت گرفته است، نتایج حاصله از این مطالعات تا حدودی ارتباط باکتری های فلور دستگاه گوارش را در بروز این بیماری ها مورد توجه قرار می دهند(۱۱،۱۲).

نتایج حاصله از کشت باکتری ها در مطالعه حاضر موید این نکته بود که تمامی جدایه های بدست آمده عضوی از باکتری های متعلق به فلور نرمال دستگاه گوارش می باشند؛ بررسی ارتباط کلونال این جدایه ها با باکتری های روده ای در این بیماران نیازمند مطالعات دقیق تری است. وجود مقاومت چند دارویی در میان این جدایه ها نشان دهنده اهمیت شناسایی ترکیبات دارویی مناسب جهت درمان عفونت های حاصل از این باکتری هاست. الگو های حاصله از DGGE بر روی محصول های PCR پس از انجام هضم آنزیمی، نشان دهنده تنوع سویه ای میان این جدایه ها بود. بررسی ارتباط تنوع الگو های مقاومت دارویی این جدایه ها ، به عنوان یک روش ساده در تیپ بندی بیولوژیک باکتری ها و مقایسه نتایج آنها با الگوی باندی حاصل از الکتروفورز در ژل حاوی گرادیان غلظتی ترکیب دناتوره کننده موید این نکته بود که جدایه های دارای الگوی مقاومتی متفاوت می توانند براحتی توسط روش RFLP-DGGE از یکدیگر متمایز شوند. انجام مطالعات بیشتر بر روی باکتری های مختلف و نواحی ژنی دیگر بجز 16 S rRNA در کنار مقایسه نتایج حاصله با نتایج بدست آمده از سایر روش های تیپ بندی مولکولی می تواند دید روشن تری به محققین جهت استفاده از این روش برای مطالعات اپیدمیولوژی مولکولی فراهم آورد.

نتیجه گیری

بر اساس نتایج این بررسی، بنظر می رسد باکتری های فلور دستگاه گوارش با توانایی مقاومت به املاح صفراوی و الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی به طور غالب دخیل در عفونت های مجاری صفراوی باشند. بعلاوه الگوهای باندی حاصله از روش RFLP –DGGE بر روی ناحیه ژنی 16S rRNA نشان داد که این روش، روش مناسبی جهت بررسی تنوع سویه های باکتریایی جدا شده از نمونه های بالینی باشد و بتواند در تیپ بندی مولکولی باکتری ها به عنوان یک روش جدید مورد استفاده قرار گیرد. اثبات حساسیت و اختصاصیت این روش در مقایسه با روش های تیپ بندی دیگر نیازمند مطالعات بیشتری است.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از همکاری تمامی محققین و کارکنان بخش گوارش بویژه سرکار خانم افریشمی و جناب آقای کولیوند که در نمونه گیری و فراهم آوری امکانات لازم تحقیق حاضر تلاش نمودند تشکر می نماییم. تحقیق حاضر مربوط به طرح تحقیقاتی563 به حمایت پژوهشکده گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی می باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

References

1- Muyzer G, De Waal EC, Uitterlinden AG. *Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding 16S rRNA*. Appl Environ Microbiol .1993; 59:695-700.

2- Muyzer G, Ramsing NB. *Molecular methods to study the organization of microbial communities*. Wat Sci Tech.1995; 32:1-9.

3- Alebouyeh M. *Molecular methods in microbial typing and identification*. First ed. Iran: sarcheshme andishe tabligh. 2010; 145-147.

4- Murray PR, Baron EJ, Pefaller M . *Mannal of clinical microbiology*. 7th ed. American society for microbiology. 1999; 459-74.

5- Clinical and laboratory standards institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; seventeenth informational supplement. 2007; 20-25.

6- Hyunsuk Hong, Amy Pruden, Kenneth F. *Comparison of CE-SSCP and DGGE for monitoring a complex microbial community remediating mine drainage*. Reardon J of Microbiological Methods. 2007; 69:52–64.

7- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd edn. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Press.1989.pp:S141-S148.

8- Heuer H, Kresk M, Baker P, Smalla K, Wellington EMH. *Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel electrophoretic separation in denaturing gradients*. Appl Environ Microbial. 1997; 63:3233-3241.

9- Vaishnavi C , Singh S , Kochhar R , Bhasin D , Singh G , Singh K .*Prevalence of Salmonella enterica serovar typhi in bile and stool of patients with biliary diseases and those requiring biliary drainage for other purposes*. Jpn J Infect Dis. 2005; 58: 363-365.

10- Manolis E, Filippou1 DK, Papadopoulos VP, Kaklamanos I, Katostaras T, Christianakis E. *The Culture Site of the Gallbladder Affects Recovery of Bacteria in Symptomatic Cholelithiasis*. J Gastrointestin Liver Dis. 2008; 17 :179-182.

11- Krejci Z, Hanus L, Podstatova H, Reifova EA. *Contribution to the problems of the pathogenesis and microbial etiology of cholelithiasis*. Acta Universitatis Palackianae Olomucensis Facultatis Medicae. 1983; 104: 279–286.

12- Murata H, Tsuji S,Tsujii M, Fu H Y, Tanimura H, Tsujimoto M, et al. *Helicobacter bilis infection in biliary tract cancer*. AP&T J. 2004; 20: 90–94.

www.SID.ir