

تایپینگ سالمونلاهای تیفوئیدی با روش تخلیص پروتئینهای محلول در آب و بکارگیری تکنیک SDS-PAGE

دکتر رسول یوسفی مشعوف*، دکتر محمد تقی گودرزی**، سعید آزادی***

دریافت: ۸۳/۱۲/۲۶، پذیرش: ۸۴/۷/۱۱

چکیده:

مقدمه و هدف: سالمونلاها از مهمترین باکتریهای خانواده انتروباکتریاسه هستند که موجب عفونتهای سیستمیک در انسان و حیوانات میشوند. هدف از این مطالعه جداسازی و تایپینگ سالمونلاهای تیفوئیدی با روش پلی اکریل آمید ژل الکتروفورز SDS-PAGE و مقایسه آن با روش سروتایپینگ میباشد.

روش کار: در این مطالعه توصیفی - مقطعی تعداد یکصد مورد سالمونلا که از آزمایشگاه های مراکز درمانی شهر همدان جمع آوری شده بود به همراه ۴ سویه رفرانس سالمونلا و ۵ سویه رفرانس دیگر از خانواده انتروباکتریاسه مورد آزمایش قرار گرفتند. سروتایپینگ نمونه ها با آنتی سرمهای منوالان بیومریو و دیفکو انجام گرفت و الکتروفورز پروتئین های ساختمانی آنها نیز در ژل ۱۰٪ پلی اکریل آمید انجام گرفت. پس از رنگ آمیزی ژل ها با آبی کوماسی، اوزان مولکولی باندهای حاصل از الکتروفورز سویه های مورد مطالعه با استفاده از منحنی مربوط به باندهای حاصل از پروتئین های استاندارد مشخص گردید و توسط دستگاه دנסیتومتر مورد آنالیز قرار گرفتند.

نتایج: از یکصد مورد سالمونلای جدا شده از بیماران ۴۳ مورد (۴۳٪) مربوط به سالمونلا تیفی، ۲۰ مورد (۲۰٪) سالمونلا تیفی موریوم، ۱۲ مورد (۱۲٪) سالمونلا پارا تیفی B، ۱۰ مورد (۱۰٪) سالمونلا پارا تیفی C و یک مورد سالمونلا پارا تیفی A و بقیه نیز غیر تیفوئیدی بودند. در روش الکتروفورز باندهای پروتئینی زیادی از مولکولهای بزرگ بیش از ۲۲۰ کیلو دالتون (KDa) تا مولکولهای کوچک کمتر از ۱۸/۵ کیلو دالتون بدست آمد که به خوبی باعث تمایز سویه ها از یکدیگر گردید و بر این اساس سالمونلا تیفی به ۵ زیر گروه و سالمونلا پارا تیفی B و C هر کدام به ۳ زیر گروه تقسیم شدند. همچنین الگوی پروتئینی سویه های رفرانس سالمونلا اختلاف عمده ای با الگوی پروتئینی سویه های رفرانس انتروباکتریاسه از خود نشان دادند، با اینحال یک باند پروتئینی مشترک در ناحیه ۴۳ کیلو دالتون در مقایسه با الگوی پروتئینی سویه های رفرانس انتروباکتریاسه مشاهده گردید. **نتیجه نهایی:** نتایج این مطالعه نشان داد که تخلیص پروتئینهای محلول در آب سالمونلاها با بکارگیری تکنیک SDS-PAGE میتواند بعنوان یک روش مطمئن تر از روش سروتایپینگ در طبقه بندی و تایپینگ این ارگانیسرها مورد استفاده قرار گیرد. با اینحال تحقیقات بیشتری مورد نیاز است تا این روش بتواند جایگزین روشهای سروتایپینگ گردد.

کلید واژه ها: تایپینگ / سالمونلا / تخلیص پروتئین

مقدمه: انسان و سایر حیوانات بیماریزا میباشند (۱). سالمونلاهای تیفی و پارا تیفی عامل تیفوئید (حصه) و پارا تیفوئید (شبه حصه) هستند، اما سالمونلاهای غیر تیفوئیدی

سالمونلاها از باکتریهای مهم خانواده انتروباکتریاسه هستند که در طبیعت انتشار وسیعی دارند و اکثر آنها برای

* دانشیار گروه میکروپ شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان (yousefimash@yahoo.com)

** دانشیار گروه بیوشیمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان

*** کارشناس ارشد بخش بیوتکنولوژی شرکت داروسازی داروپخش تهران

روش کار:

این پژوهش از نوع توصیفی-مقطعی و آینده نگر بوده و جامعه آماری آن را نمونه های بدست آمده از بیماران مراجعه کننده به مراکز درمانی شهر همدان تشکیل می دادند. در این مطالعه تعداد ۱۰۰ مورد سالمونلا از نمونه های خون، مدفوع، مایع نخاع، ادرار و مایع پلور بیماران با بیماری حصبه و گاستروانتریت جداسازی شده و پس از سروتایپینگ، پروتئینهای ساختمانی محلول در آب (Whole-Cell Proteins) آنها تخلیص شده و مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه همچنین ۴ سویه رفرانس یا استاندارد سالمونلا بدست آمده از کلکسیون PTCC (شامل سالمونلا تیفی PTCC=1609، سالمونلا پاراتیفی PTCC=1230 A، سالمونلا پاراتیفی PTCC=1231 B و سالمونلا پاراتیفی PTCC=1222 C) و ۵ سویه رفرانس دیگر از خانواده انتروباکتریاسه (شامل اشریشیا کلی PTCC=1222، انتروباکتر آئروژینوزا PTCC=1221، سیتروباکتر فروندی PTCC=1600، کلبسیلا پنومونیه PTCC=1953 و سراسیا مارسه سنس PTCC=1111) بکار برده شد. نمونه ها بر روی محیط های کشت انتخابی SS آگار و مکانکی آگار کشت داده شده و پس از انجام آزمایشات بیوشیمیایی (۱۳) تشخیص اولیه آنها صورت گرفت.

سروتایپینگ نمونه ها نیز با آنتی سرمهای منووالان ساخت بیومریو فرانسه (Diagnostic Pasteur, 72200, Lyon France) انجام گرفت (۱۴). الکتروفورز پروتئینهای ساختمانی سویه ها به روش تیلور (Taylor) با اندکی اصلاح صورت گرفت (۱۱).

در این روش ۴ تا ۵ کلنی از محیط کشت برداشته شد و پس از سه بار سانتریفوژ با نرمال سالین، رسوب (Pellet) را در ۱۰۰ میکرولیتر لایزیز بافر (Lysis-buffer) حل نموده، سپس سوسپانسیون را به آرامی مخلوط نموده و مدت ۵ دقیقه در حرارت ۱۰۰ درجه سانتیگراد بن ماری قرار داده و پس از سانتریفوژ مجدداً مقدار ۱۵۰ میکرولیتر لایزیز بافر حاوی ۳٪ SDS به محلول اضافه نموده و پس از ده بار مخلوط نمودن به مدت ۵ دقیقه در ۸۵ درجه سانتیگراد قرار داده شد. سوسپانسیون برای مدت ۳۰ دقیقه در ظرف حاوی یخ سرد شده و سپس با ورتکس بخوبی مخلوط نموده و سوسپانسیون به مدت ده دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفوژ شده و مایع رویی که حاوی

(مانند سالمونلاهای آگونا - تیفی موریوم - ویرشو - هاوانا - دربی - انتریتیدیس) عامل عفونتهای غیر تیفوئیدی مانند گاستروانتریت، سپتی سمی و آبسه های احشایی هستند (۲). تاکنون بیش از ۲۴۰۰ سروتایپ سالمونلای غیر تیفوئیدی (NTS) شناسایی شده است که اکثر آنها از نمونه های کلینیکی با منشأ حیوانی ایزوله شده است (۸-۳). بر اساس طبقه بندی کوفمن-وایت این سروتایپ ها از گروه A تا گروه Z تقسیم میشوند (۹). با توجه به گزارشات مرکز بهداشتی و تحقیقاتی دنیا نظیر سازمان بهداشت جهانی شیوع سالمونلای غیر تیفوئیدی در جوامع انسانی نیز افزایش یافته است و علت آن پیدایش بسیاری از سروتایپهای جدید سالمونلایی است که در گذشته شیوع چندانی نداشته است (۱).

در حال حاضر روش معمول تایپینگ سالمونلاها روش سرولوژیک می باشد، اما این روش بعلت وجود واکنشهای متقاطع (Cross-reaction) در حین سروتایپینگ، مشکلاتی را در تایپینگ سالمونلاها ایجاد کرده است (۱۰، ۹). اخیراً روشهای مولکولی از جمله تخلیص پروتئینهای ساختمانی میکروارگانیزم ها و آنالیز آن با روش پلی اکریل آمید ژل الکتروفورز SDS-PAGE جهت اهداف تایپینگ باکتری ها بکار گرفته شده است (۱۲، ۱۱). در خصوص تایپینگ سالمونلاها با این روش در ایران اطلاعات جامع و کاملی در دسترس نمی باشد، از طرف دیگر سایر مطالعات مولکولی مانند PCR و هیبریداسیون DNA-DNA در چند سال اخیر موجب تغییرات عمده ای در طبقه بندی سالمونلاها شده است که جنس سالمونلا شامل دو گونه می باشد: سالمونلا انتریکا و سالمونلا بونگوری. سالمونلا انتریکا خود شامل شش زیرگونه است (I, II, IIIa, IIIb, IV, VI) که سالمونلاهای انسانی در زیرگونه (I) قرار می گیرد در حالیکه سایر زیرگونه ها و سالمونلا بونگوری معمولاً از حیوانات خونسرد و عوامل محیطی جدا میگردد (۹، ۱).

هدف مطالعه حاضر سروتایپینگ سالمونلاها و تعیین سروتایپ غالب در محل پژوهش، تخلیص پروتئینهای ساختمانی سالمونلاهای تیفوئیدی جدا شده از بیماران با روش پلی اکریل آمید ژل الکتروفورز SDS-PAGE و مقایسه با الگوی پروتئینی برخی از سویه های مهم خانواده انتروباکتریاسه می باشد. استخراج و شناسایی پروتئینهای ساختمانی محلول در آب باکتریها میتواند در تایپینگ و طبقه بندی آنها مورد استفاده قرار گیرد.

B با ۳۲ سرگروپ (۳۲٪) و گروه C₁C₂ با ۱۶ سرگروپ ۱۶٪ بود و همچنین کمترین سرگروپ ۱٪ مربوط به گروه E بود. توزیع فراوانی سروتایپ های بدست آمده به ترتیب زیر بود: ۴۳ مورد (۴۳٪) مربوط به سالمونلا تیفی، ۲۰ مورد (۲۰٪) سالمونلا تیفی موریوم، ۱۲ مورد (۱۲٪) سالمونلا پاراتیفی B، ۱۰ مورد (۱۰٪) سالمونلا پارا تیفی C، و همچنین سالمونلا انتریتیدیس ۳ مورد (۳٪)، سالمونلا کلرا سوئیس و آریزونا هر کدام ۲ مورد (۲٪) و سالمونلا های سالمونلا پارا تیفی A، اینفانتیس، هاوانا، لگزینتون و ویرشو هر کدام یک سروتایپ (۱٪). ۳ مورد (۳٪) نیز با آنتی سرمهای موجود پاسخ نداده و بعنوان سروتایپهای ناشناخته در نظر گرفته شد.

نتایج سروتایپینگ نمونه های تیفوئیدی با نتایج الکتروفورز پروتئین های ساختمانی سویه ها مورد مقایسه قرار گرفت. پس از الکتروفورز پروتئینهای ساختمانی محلول در آب باندهای پروتئینی زیادی از مولکولهای بزرگ بیش از ۲۲۰ کیلو دالتون (KDa) تا مولکولهای کوچک کمتر از ۱۸/۵ کیلو دالتون بدست آمد که به خوبی باعث تمایز سویه ها از یکدیگر گردید.

هر یک از گونه های سالمونلای فرانس شامل سالمونلا تیفی، سالمونلا پاراتیفی A، سالمونلا پاراتیفی B و سالمونلا پاراتیفی C، هر یک الگوی پروتئینی اختصاصی و منحصر به فرد (Protein-profile) نشان دادند. پس از آنالیز الگوی پروتئینی هر یک از نمونه های الکتروفورز شده توسط دستگاه دنسیتومتر، تعداد باندهای ماژور و مینور هر سروتایپ سالمونلا به ترتیب زیر مشخص گردید: سالمونلا تیفی ۲۰ باند مجزا، سالمونلا پاراتیفی A ۲۲ باند مجزا، سالمونلا پاراتیفی B و سالمونلا پاراتیفی C هر کدام ۱۸ باند مجزا. همچنین سالمونلا تیفی استاندارد (فرانس) ۱۱ باند پروتئینی ماژور، سالمونلا پاراتیفی A استاندارد ۱۲ باند پروتئینی ماژور، سالمونلا پاراتیفی B و سالمونلا پاراتیفی C هر کدام ۱۴ باند پروتئینی ماژور نشان دادند. تعداد باندهای ماژور سالمونلا تیفی استاندارد (فرانس) و سالمونلا پاراتیفی B استاندارد و محدوده وزن مولکولی آنها در جداول ۱ و ۲ نشان داده شده است.

پروتئین های ساختمانی محلول در آب بود، جدا نموده و قبل از مصرف در ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری گردید.

مایع حاوی پروتئین در هنگام استفاده در حرارت C ۳۷° گرم شد و مقدار ۱۰ میکرولیتر از آن به هر چاه ژل پلی آکریل آمید ۱۰٪ تزریق نموده و پس از رنگ آمیزی ژلها با آبی کوماسی، اوزان مولکولی باندهای حاصل از الکتروفورز سویه های مورد مطالعه با استفاده از منحنی مربوط به باندهای حاصل از پروتئین های استاندارد مشخص گردید.

چگالی باندهای پروتئینی و تعداد آنها برای هر یک از سویه های استاندارد و نمونه های جدا شده از بیماران با دستگاه دنسیتومتر مشخص گردید. برای تخمین اوزان مولکولی باندهای پروتئینی، با هر ژل یک مارکر استاندارد ساخت شرکت سیگما از 29-205, KDa نیز استفاده گردید. الگوی الکتروفورزی پروتئینی (Protein-profile) هر یک از نمونه های سالمونلا جدا شده از بیماران و همچنین الگوی پروتئینی سالمونلاهای استاندارد (فرانس) با استفاده از روش دنسیتومتری مورد آنالیز قرار گرفت و تعداد باندهای ماژور (بزرگ) و مینور (کوچک) هر سروتایپ سالمونلا شمارش گردید.

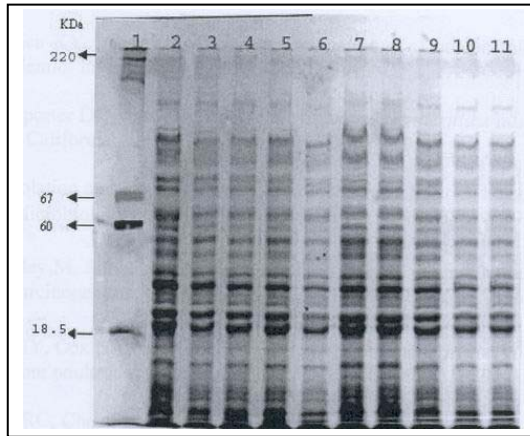
برای تایپینگ سویه ها معمولاً از تعداد باندهای ماژور و وزن مولکولی تقریبی هر یک از باندهای پروتئینی آنها استفاده میگردد. در این مطالعه نیز برای تعیین زیر گروه های گونه های سالمونلاهای جدا شده از بیماران از این روش استفاده گردید.

اطلاعات مورد نیاز بر اساس اهداف تحقیق در پرسشنامه درج و با نرم افزار EPI6 مورد آنالیز قرار گرفت.

نتایج:

بیشترین نمونه های سروتایپ شده (۵۴/۷٪) از کشت خون و سپس از کشت مدفوع (۴۰٪) بدست آمد و همچنین کمترین آنها از کشت های مایع نخاع و مایع پلور هر کدام ۱۶٪ جدا گردید. در این مطالعه از یکصد مورد سالمونلا تیفوئیدی و غیرتیفوئیدی جدا شده از بیماران در مجموع ۷۱٪ سالمونلا تیفوئیدی و ۲۹٪ نیز سالمونلای غیرتیفوئیدی بدست آمد.

در بخش تعیین سرگروپ نیز از ۱۰۰ مورد سالمونلای سروتایپ شده، بیشترین فراوانی به ترتیب مربوط به گروه D₁ با ۴۶ سرگروپ (۴۶٪) و سپس گروه



شکل ۱: مقایسه الگوی الکتروفورزی پروتئینی هریک از نمونه های سالمونلا تیفی جدا شده از بیماران با الگوی پروتئینی سالمونلا تیفی استاندارد. ستون ۱: استاندارد مارکر وزن مولکولی، ستون ۲: سالمونلا تیفی PTCC=1609، ستونهای ۳-۱۱: نمونه های کلینیکی سالمونلا تیفی.

همچنین سوبه های رفرانس سالمونلا تیفی، سالمونلا پاراتیفی A، سالمونلا پاراتیفی B و سالمونلا پاراتیفی C اختلاف عمده ای با الگوی پروتئینی سوبه های رفرانس انتروباکتریاسه از خود نشان دادند که موجب تمایز آنها از یکدیگر گردید، با اینحال یک باند پروتئینی مشترک در ناحیه ۴۳ کیلو دالتون بین الگوی پروتئینی سوبه های رفرانس سالمونلا در مقایسه با الگوی پروتئینی سوبه های رفرانس انتروباکتریاسه مشاهده گردید.

بحث:

نتایج بدست آمده در این مطالعه نشان داد که توزیع فراوانی سالمونلاهای تیفوئیدی جدا شده از بیماران شامل سالمونلا تیفی، سالمونلا پاراتیفی B و سالمونلا پاراتیفی C شایعتر از سالمونلاهای غیرتیفوئیدی مانند سالمونلا تیفی موریوم، سالمونلا انتریتیدیس و سالمونلا آریزونا بود، در حالیکه در سایر مطالعات مشابه که در برخی کشورها صورت گرفته است، سالمونلاهای غیرتیفوئیدی شیوع بیشتری داشته است و شایعترین سروتاپ سالمونلا تیفی موریوم و سالمونلا انتریتیدیس بوده است (۲،۳،۴،۱۵).

در این مطالعه نشان داده شد که تخلیص پروتئینهای ساختمانی محلول در آب (Whole-Cell Proteins) میکروارگانسیم ها از جمله سالمونلاها با روش پلی اکریل آمید ژل الکتروفورزی SDS-PAGE میتواند در تشخیص

جدول ۱: باندهای ماژور سالمونلا تیفی استاندارد و محدوده

وزن مولکولی آنها	شماره باندهای ماژور
۱۵۰ Kda	۱
۸۰ Kda	۲
۶۷ Kda	۳
۶۰ Kda	۴
۵۵ Kda	۵
۴۹ Kda	۶
۴۵ Kda	۷
۴۳ Kda	۸
۳۳ Kda	۹
۱۸/۵ Kda	۱۰
۱۴ Kda	۱۱

جدول ۲: باندهای ماژور سالمونلا پاراتیفی B استاندارد و محدوده وزن مولکولی آنها

وزن مولکولی	شماره باندهای ماژور
۹۴ Kda	۱
۸۰ Kda	۲
۷۰ Kda	۳
۶۰ Kda	۴
۵۵ Kda	۵
۴۹ Kda	۶
۴۵ Kda	۷
۴۳ Kda	۸
۳۳ Kda	۹
۲۸ Kda	۱۰
۲۴ Kda	۱۱
۱۸/۵ Kda	۱۲
۱۶ Kda	۱۳
۱۴ Kda	۱۴

الگوی پروتئینی هریک از نمونه های سالمونلا جدا شده از بیماران با الگوی پروتئینی سالمونلاهای استاندارد (رفرانس) مورد مقایسه قرار گرفت، و با استفاده از روش دنسیتومتری زیر گروههای هر گونه سالمونلا تعیین گردید و بر این اساس سالمونلا تیفی به ۵ زیرگروه، سالمونلا پارا تیفی B و C هرکدام به ۳ زیرگروه تقسیم شدند. الگوی الکتروفورزی پروتئینی هریک از نمونه های سالمونلا تیفی جدا شده از بیماران که با الگوی پروتئینی سالمونلا تیفی استاندارد مورد مقایسه قرار گرفته است، در شکل ۱ نشان داده شده است.

- tions in Los Angeles county, California. *West J Med.* 1996; 165(3): 126-30.
5. Bonnie ER. Isolation and identification of *Salmonella* from meat and egg products. In: Bennet JE, (ed). *Microbiology laboratory guidebook.* 3rd ed. USDA/FSIS, 1998: 122-49.
 6. Singh H, Pandey M, Shukla VK. *Salmonella* carrier state, chronic bacterial infection and gallbladder carcinogenesis. *Eur J Cancer Preven* 1996; 5(2): 144-
 7. Baily JS, Chiu JY, Cox NA, Johnston, RW. Improved selective procedure for detection of *Salmonellae* from poultry sausage products. *J Food Prot* 1998; 51: 391-6.
 8. Lai CW, Chan RC, Cheng AF, Sung IY, Leung JM. Common bile duct stones: a cause of chronic salmonellosis. *Am J Gastroentrol.* 1992; 87(9): 1198-9.
 9. Holt JG, Krieg NR, Sneath PA, Staley JT, Williams ST. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* 4th ed. New York: Williams & Wilkins, 1994;294-299.
 10. Lantana CF, Taffur C, Benavenete L, Botuzzo E, Carrilio C. Detection of *Salmonella typhi* carriers in food handlers by Vi serology in Lima, Peru. *Bull Pan Am Health-organ* 1990; 24 (2): 177-82.
 11. Taylor AJ, Costas M, Owen RJ. Numerical analysis of electrophoretic protein patterns of *Bacteroides ureolyticus* clinical isolates. *J Clin Microbiol* 1987; 25: 660-666.
 12. Jackman PJH. Classification of *Corynebacterium* species from axillary skin by numerical analysis of electrophoresis protein patterns. *J Med Microbiol.* 1982. 15 : 485-488
 13. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Scchreckenberger PC, Winn-Jr WC. *Color atlas and text book of diagnostic microbiology* 5th ed. Philadelphia: Lippincott, 1997: 171-230.
 14. Baron EJ, Peterson L.R, Finegold SM. *Diagnostic microbiology.* 9th ed. Baltimore: Mosby, 1994: 504-519.
 15. Alonso JJ. Splenic *Salmonella typhimurium* abscess. *Med Clin Bare* 1993; 87(18) : 831-832

و تایپینگ آنها کاربرد داشته باشد، همچنانکه این روش اختلاف و اشتراک ساختمان پروتئینی سویه های رفرانس سالمونلا با سویه های رفرانس انتروباکتریاسه را بخوبی مشخص نمود و موجب تعیین زیرگروه های سالمونلا گردید.

سالمونلاهای تیفوئیدی شامل سالمونلا تیفی، سالمونلا پاراتیفی A، سالمونلا پاراتیفی B و سالمونلا پاراتیفی C ضمن اینکه الگوهای پروتئینی متفاوتی از یکدیگر نشان دادند، با اینحال دارای باندهای پروتئینی مازور مشترکی در نواحی ۱۴، ۲۱، ۳۳، ۴۳، ۴۹ و ۵۵ کیلودالتون بودند.

نتیجه نهائی :

این روش در مقایسه با نتایج بدست آمده با روش سروتایپینگ، توانست گونه های سالمونلا را به زیر گونه نیز طبقه بندی نماید و اختلاف ساختمان پروتئینی آنها را با گونه های خانواده انتروباکتریاسه نشان دهد. اما با توجه به زمان و هزینه نسبتاً بالای تهیه پلی اکریل آمید ژل الکتروفوروزیس SDS-PAGE به نظر نمی رسد از این روش بتوان در آزمایشهای روتین تشخیص طبی بهره برد، ضمن اینکه روش سروتایپینگ روشی ساده و سریع و کم هزینه است و در هر آزمایشگاهی با امکانات متوسط قابل انجام است. با این حال روش SDS-PAGE تکنیک قابل اطمینانی در تایپینگ و طبقه بندی میکروارگانیسیم ها جدید و ناشناخته در مراکز تحقیقاتی بشمار میرود.

منابع :

1. Lesser C, Miller SI. Salmonellosis. In: Fauci F, Braunwald E, Isselbacher KJ, (eds). *Harrisons principles of internal medicine.* 17th ed. Vol 2. New York: Mc Graw-Hill, 2001: 970-5.
2. Miller SI, Pegues DA. *Salmonella* species, including *Salmonella typhi*. In: Mandell GL, Bennet JE, Mandell RD, eds. *Principles and practice of infectious disease.* 4th ed. New York: Churchill Livingstone, 2000: 2344-62.
3. Wong SS, Yuen KY, Yam, WC. Changing epidemiology of human salmonellosis in Hong Kong. *Epidemiol Infect.* 1999; 113(3): 425-34
4. Passaro DJ, Reporter DJ, Mascola L. Epidemic *Salmonella enteritidis* infec