Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 12, Number 4 (September - October)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Phylogenetic Analysis of *Salmonella spp*. Isolated from Clinical Samples of Tehran's Hospitals Based on 23S rRNA Gene Sequence

Mercedeh Tajbakhsh[1,2*], Mohammad Reza Zali[1,3], Fatemeh Fallah[2]

1. Foodborne and Waterborne Diseases Research Center, Research Institute for Gastroenterology and Liver Diseases, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2. Pediatric Infections Research Center (PIRC), Research Institute for Children Health, Shahid Beheshti University of Medical Sciences,Tehran, Iran
3. Department of Microbiology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Article Information

Article history:
Received: 2018/05/29
Accepted: 2018/10/24
Available online: 2018/11/23

Article Subject:
Medical Bacteriology

IJMM 2018; 12(4): 239-247

Corresponding author:

Mercedeh Tajbakhsh
Foodborne and Waterborne Diseases Research Center, Research Institute for Gastroenterology and Liver Diseases, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Email:
m_tajbakhsh@sbmu.ac.ir

Use your device to scan and read the article online

Abstract

Background and Aims: *Salmonella Spp.* is one of the most common causes of bacterial gastroenteritis and foodborne diseases. More than 2500 serotypes of *Salmonella* have been identified which most of them cause infections in humans.

Phylogenetic analysis of the family Enterobacteriaceae has not been subjected to extensive variation based on 16S rRNA sequences. In fact 16S rRNA gene was not thought to solve taxonomic problems concerning closely related species because of its highly degree of conservation in own structure. So, 23S rRNA gene which has a potential to classified related strains under sub-species level were candidate to analysis of *Salmonella spp.*

The aim of this study was to evaluate the clinical *Salmonella* strains' relationship using 23S rRNA gene sequence.

Materials and Methods: DNA of identified *Salmonella spp*. from patients with acute diarrhea was extracted. Sequences of 23S rRNA were determined after PCR tests. The whole gene sequences were used to generate phylogenetic trees based on Neighbor-joining method by MEGA 5.05 5.

Results: Helix (25 and 45) structures were detected in the most of different serotypes isolates. All *S.Typhi* included helix-25 in ribosomal structure, but in the other strains, helix-45 was also observed. The similarity between *Salmonella spp*. was 99-100% based on 23S rRNA.

Conclusions: 23S rRNA gene sequence data was better to analyze at subspecies level and differentiation between serovars. According to variety in *Salmonella* serotypes based on difference in Anti gene O and H, application of new molecular methods and substituting them with traditional assays are needed.

Keywords: *Salmonella, Phylogeny, Sequencing, 23S rRNA*

Copyright © 2018 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Tajbakhsh M, Zali M R, Fallah F. Phylogenetic Analysis of Salmonella spp . Isolated From Clinical Samples of Tehran's Hospitals Based on 23S rRNA Gene Sequence. Iran J Med Microbiol. 2018; 12 (4): 239-247

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۲ – شماره ۴ – مهر-آبان ۱۳۹۷

Journal homepage: www.ijmm.ir

بررسی فیلوژنی سویه‌های *سالمونلای* جداشده از نمونه‌های بالینی بیمارستان‌های تهران براساس تعیین توالی ژن *23S rRNA*

مرسده تاج‌بخش[۱،۲*]، محمدرضا زالی[۱،۳]، فاطمه فلاح[۲]

۱. مرکز تحقیقات بیماری‌های منتقل از آب و غذا، پژوهشکده بیماری‌های گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۲. مرکز تحقیقات عفونی اطفال، پژوهشکدهٔ سلامت کودکان، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۳. گروه میکروب‌شناسی، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچهٔ مقاله

دریافت: ۱۳۹۷/۰۳/۰۸

پذیرش: ۱۳۹۷/۰۸/۰۲

انتشار آنلاین: ۱۳۹۷/۰۹/۰۲

موضوع:

باکتری شناسی پزشکی

IJMM1397;12(4): 239-247

نویسندهٔ مسئول:

مرسده تاج‌بخش

دکتری تخصصی پژوهشی، مرکز تحقیقات بیماری‌های منتقل از آب و غذا ، پژوهشکده بیماریهای گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

پست الکترونیک:

m_tajbakhsh@sbmu.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: باکتری *سالمونلا* یکی از مهم‌ترین عوامل گاستروانتریت باکتریایی و بیماری‌های ناشی از غذا است. تاکنون بیش از ۲۵۰۰ سرووار از این جنس شناسایی‌شده که اکثر آنها برای انسان بیماری‌زا هستند. ساختار فیلوژنی خانوادهٔ *انتروباکتریاسه* براساس توالی *16S rRNA* تنوع وسیعی ندارد. بنابراین این ژن به دلیل میزان توالی بالای حفاظت‌شده در ساختار خود، نمی‌تواند مشکلات طبقه‌بندی را در گونه‌های نزدیک به هم حل کند. به این منظور برای بررسی سویه‌های سالمونلا، ژن *23S rRNA* انتخاب شد که توانایی تفکیک سویه‌های مرتبط به هم را در سطح زیرگونه دارد. هدف از این مطالعه بررسی قرابت سویه‌های *سالمونلای* بالینی با استفاده از توالی ژن *23S rRNA* است.

مواد و روش کار: DNA نمونه‌های تأییدشدهٔ *سالمونلا* از بیماران با علائم گوارشی، استخراج و توالی ژن *23S rRNA* پس از PCR در آنها تعیین شد. درختچهٔ فیلوژنی براساس روش Neighbor-joining و با نرم‌افزار MEGA 5.05 5 رسم شد.

یافته‌ها: دو ساختار مارپیچ ۲۵ و ۴۵ در بین اکثر سویه‌ها با سروتیپ‌های مختلف دیده شد. در سویه‌های *سالمونلای* تیفی تنها ساختار مارپیچ ۲۵ و در بقیهٔ سویه‌ها مارپیچ ۴۵ مشاهده شد. میزان قرابت سویه‌های *سالمونلا* براساس توالی *23S rRNA* بین ۱۰۰-۹۹ درصد بود.

نتیجه‌گیری: نتایج ژن *23S rRNA* تمایز بیشتری برای آنالیز در سطح زیرگونه و تفریق سروتیپ‌ها نشان می‌دهد. با توجه به تنوع سروتیپ‌های *سالمونلا* براساس تفاوت آنتی‌ژن‌های O و H سطحی، لزوم به‌کارگیری روش‌های نوین مولکولی در این راستا و جایگزینی آن با روش‌های سنتی ضروری به نظر می‌رسد.

کلمات کلیدی: *سالمونلا*، فیلوژنی، تعیین توالی، *23S rRNA*

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفادهٔ علمی از این مقاله برای مجلهٔ میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

آنالیز ژن‌های کدکنندهٔ زیرواحدهای ریبوزومی 16S و 23S از جمله روش‌هایی است که امروزه به‌طور گسترده و برای طبقه‌بندی و شناسایی پروکاریوت‌ها استفاده می‌شود. پژوهشگران در آغاز بررسی این ژن به‌عنوان نشانگر فیلوژنی، و با مقایسهٔ توالی ژن *RNA* ریبوزومی میکروارگانیسم‌ها، متوجه شدند ممکن است میکروارگانیسمی حاوی چندین کپی از یک ژن یا اپرون ریبوزومی باشد (۱). از الزامات کلیدی ژن مطالعه‌شده در طبقه‌بندی فیلوژنی آن است که همگانی، پایدار، قابل‌تکثیر، مبتنی بر علم و حاوی اطلاعات ژنی بالایی باشد. ژن‌های ریبوزومی در هر طبقه‌بندی اسکلت و پایهٔ علم فیلوژنی به شمار می‌روند (۲). علاوه بر این، ژن‌های ریبوزومی نسبت به ژن‌های کدکنندهٔ پروتئین به آرامی در حال تکامل هستند و این امر در تجزیه‌وتحلیل فیلوژنی گونه‌های دور از هم و یا مرتبط با هم بسیار حائز اهمیت است. به‌ویژه مدل ساختار ثانویهٔ ژن‌های ریبوزومی صرفا براساس مقایسه و تجزیه‌وتحلیل توالی‌های به‌دست‌آمده صورت می‌گیرد (۳). به نظر می‌رسد میزان حفظ‌شدگی و پایداری آن نتیجهٔ نقش مهم و اساسی این ساختار به‌عنوان جزئی از عملکرد اساسی و حیاتی سلولی باشد؛ زیرا ژن‌های ریبوزومی به دلیل کد نکردن پروتئین،

هیچ‌گونه فعالیت آنزیمی ندارند و سلول اغلب جهش در این ژن را تحمل می‌کند؛ به این معنا که این ساختارها در اثر جهش‌های نقطه‌ای، حذف و یا اضافه شدن نوکلئوتیدی دچار تغییر ماهیتی و عملکردی نمی‌شوند (۴). گفتنی است در بررسی‌های فیلوژنی ژن‌های اندکی وجود دارد که میزان ثبات و حفظ‌شدگی توالی آنها مشابه توالی ژن‌های ریبوزومی باشد (۵).

در مطالعات فیلوژنی پروکاریوت‌ها، ژن 23S rRNA مارکر مناسبی است. ساختار اولیهٔ این ژن نواحی حفظ‌شده و متغیری دارد. همچنین به دلیل داشتن توالی، حدود ۳۰۰۰ جفت باز از موقعیت‌های اطلاعاتی بیشتر و بلندتری تشکیل شده که آن را کاندید مناسبی برای بررسی اطلاعات فیلوژنی در سطح زیرگونه (Sub-species) کرده است؛ زیرا هرچقدر توالی و طول ژن بیشتر باشد حاوی اطلاعات ذخیره‌ای بیشتری است. این نکته دربارهٔ ژن های خانه‌دار و به‌ویژه ژن‌هایی که از آنها پروتئین ساخته نمی‌شود بسیارحائز اهمیت است؛ چراکه در اجداد مشترک و براساس یافته های تکاملی مسیر تکامل آنها در طول زمان حفظ شده است. بخشی از قسمت‌های متغیر در این ساختار تحت عنوان توالی‌های میانی یا مداخله‌گر IVS (Intervening sequences) شناسایی شده است. این ساختار اساس مارپیچ (Helix) دارد که در تکامل 23S rRNA در برخی از گونه‌های *انتروباکتریاسه* مؤثر است؛ زیرا در همهٔ اعضای این خانواده دیده نمی‌شود (۶،۷).

مطالعات نشان داده است ۷ کپی از اپرون ریبوزومی در کروموزوم *Escherichia coli* و *Salmonella typhimurium* وجود دارد که همهٔ آنها در یک قالب کلی "*16S rRNA-tRNA-23S rRNA-5S rRNA*" و پایانگر ژن قرار می‌گیرند (۷).

وجود قطعه‌ای اضافه در *23S rRNA* در *S. typhimurium* تحت عنوان ناحیهٔ IVS شناخته شده است. گزارش شده که IVS در جفت باز ۵۵۰ و ۱۱۷۰ ژن *23S rRNA* گونه‌های *Salmonella* وارد می‌شود. این دو ناحیه با عنوان Helix 25 و Helix 45 در ساختار ثانویهٔ ژن *23S rRNA* معرفی شده است (۸).

IVS به‌طور پراکنده در بین دیگر جنس‌های باکتریایی مانند *Campylobacter* و *Helicobacter* وجود دارد. همچنین مشخص شده است که انتشار IVS در بین کپی‌های متعدد ژن زیرواحد بزرگ ریبوزومی (rrl) ناهمگون است. این فرضیه مطرح است که IVS ممکن است در روندی تکاملی نتیجهٔ انتقال افقی با پلاسمیدی باشد که در حال هم‌یوغی (Conjugation) بوده یا با فاژ القایی منتقل شده است (۶،۷،۹).

باکتری *Salmonella* یکی از اعضای خانوادهٔ *انتروباکتریاسه* است که به‌صورت باسیل گرم منفی تاژه‌دار بوده و هوازی یا بی‌هوازی اختیاری است. طبقه‌بندی این جنس براساس روش Kauffman-white صورت می‌گیرد. تاکنون بیش از ۲۵۰۰ سروتیپ براساس ساختار آنتی‌ژن *O* و *H* از این خانواده به دست آمده است. این باکتری از راه دهانی – مدفوعی وارد بدن شده و می‌تواند عامل مسمومیت غذایی و تب تیفوئید باشد (۱۰).

از آنجا که روند تکاملی در ژن‌های ریبوزومی به آهستگی روی داده است، به نظر می‌رسد این ساختار نقش مؤثری در تمایز گونه‌ها از یکدیگر دارد. مطالعات متفاوتی در زمینهٔ فیلوژنی *سالمونلا* با استفاده از توالی ژن‌های حفاظت‌شده به ثبت رسیده است که توانایی جداسازی را در حد زیرگونه دارند (مانند ژن‌های سیتوکروم اکسیداز ۱ و ۲، توپوایزومراز ۲، فاکتور طویل‌کننده پروتئین و ...) و می‌توانند جایگزین ژن *23S rRNA* در مطالعات فیلوژنی شوند (۱۱،۱۲).

مطالعهٔ حاضر با هدف بررسی فیلوژنی *سالمونلا*های بالینی جداشده از بیمارستان‌های تهران و با استفاده از توالی ژن *23S rRNA* و تعیین قرابت آنها برای اولین بار در ایران انجام شده است. بر این اساس این مقاله در پی تعیین فیلوژنی به‌منظور به دست‌آوردن قرابت سویه‌های حاصل و مقدار دوری و نزدیکی آنها از هم براساس ژن *23S rRNA* است. همچنین با بررسی‌های صورت‌گرفته فراوانی IVSهای موجود و توالی آنها در ساختار ژنی سویه‌های سالمونلا مشخص شده است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های سویه‌های بالینی *سالمونلا* از افراد مبتلا به اسهال طی مراجعه به بیمارستان‌های تهران (بیمارستان طالقانی، کودکان مفید، لقمان، مرکز طبی کودکان، میلاد، امام حسین)، در مدت ۱۵ ماه (از تابستان ۹۳ تا پاییز ۹۴) جمع‌آوری شده است. نمونهٔ مدفوع افراد در محیط کری بلر به آزمایشگاه منتقل و به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه در محیط سلنیت F (Merck, Germany) غنی‌سازی شد. سپس نمونه‌ها به محیط‌های انتخابی و اختصاصی مک کانکی و گزیلوز- لیزین- دزوکسی کولات آگار (XLD)، (Merck, Germany) به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس انتقال یافت. شناسایی کلنی‌های مشکوک به *سالمونلا* از طریق آزمایش‌های بیوشیمیایی اختصاصی (تست‌های ایندول، متیل رد، وژز پروسکوئر و سیترات) صورت گرفت و در نهایت جدایه‌های *سالمونلا* به‌روش سرولوژی و آگلوتیناسیون روی لام با آنتی‌سرم‌های اختصاصی مؤسسهٔ رازی تعیین سروتیپ شدند.

نمونه‌های تکراری و سویه‌هایی که سروتیپ آنها غیرقابل‌تشخیص بود از مطالعهٔ حاضر حذف شدند. کلیهٔ باکتری‌های جداشده در محیط تریپتیک سوی براث (TSB) (Merck, Germany) حاوی ۱۰ درصد گلیسرول در دمای ۸۰- درجهٔ سلسیوس ذخیره شد. DNAنمونه‌های تأییدشده با روش فنل-کلروفرم استخراج شد (۱۳). نمونه‌های DNA در دمای ۲۰- درجهٔ سلسیوس در بافر Tris-EDTA (TE) برای تست‌های بعدی نگهداری شد.

طراحی پرایمر

برای طراحی پرایمر از توالی ژنومی سویهٔ ثبت‌شده (GenBank accession number NC-004631)از *S. typhi* به‌عنوان الگو استفاده شد. کلیهٔ پرایمرها با استفاده از نرم‌افزار Gene runner (v3.05) طراحی شدند. برای به‌دست‌آوردن توالی کامل ژن *23S* که با حدود ۳۲۰۰ جفت باز در سویهٔ مزبور به ثبت رسیده بود، پرایمرها از حدود ۵۰ جفت باز فرادست و فرودست ′۵ و′۳ ژن طراحی شدند. برای تسهیل تعیین توالی، ژن مدنظر به چهار قطعه تقسیم شد که طول هریک حدود ۱۱۰۰-۹۰۰ جفت باز بود که با قطعهٔ قبل حدود ۷۰-۵۰ جفت باز هم‌پوشانی داشت. پرایمرهای تعیین توالی برای جلوگیری از خطای دستگاه تعیین توالی در خوانش توالیها و به دست آوردن توالی کامل ژن، طراحی و به کار گرفته شد (جدول ۱). کلیهٔ پرایمرها را شرکت بیونیر (Bioneer Co, Ltd, Daejeon, Republic of South Korea) سنتز کرد.

جدول ۱. پرایمرهای تعیین توالی

Gene	Primer	Sequences (5´- 3´)	Product size
23S rRNA Part I	SAL23S FWD1 SAL23S REV1	TCAAGCTGAAAATTGAAACACAG GCTATCTCCCGGTTTGATTG	۹۰۰-۱۱۰۰ bp*
	23S Sequencing FWD1 23S Sequencing REV1	TACTCCTGACTGACCGATAG CTATCGGTCAGTCAGGAGTA	
23S rRNA part II	SAL23S FWD2 SAL23S REV2	GGGAAACCGAGTCTTAAC GATTTACCTGGAACACATAC	۹۰۰-۱۰۳۱ bp
	23S Sequencing FWD2 23S Sequencing REV2	AAAGCGTAATAGCTCACTGGTC GCATTCGCACTTCTGATACC	
23S rRNA part III	SAL23S FWD3 SAL23S REV3	GCGTAGTCGATGGGAAAC CGACCAGGATTAGCCAAC	۹۵۰ bp
	23S Sequencing FWD3 23S Sequencing REV3	CACGTAGGTGAAGTGATTTA CCTTAGGACCGTTATAGTTAC	
23S rRNA part IV	SAL23S FWD4 SAL23S REV4	GACACTGAACATTGAGCCTTG GTGCTGAAAATCGTCTCTCATC	۹۰۰ bp
	23S Sequencing FWD4 23S Sequencing REV4	TGTTTGGCACCTCGATGTC GGCATGACAACCCGAACA	

* bp: جفت باز

برنامهٔ PCR

برنامهٔ PCR برای چهار قطعه ژن *23S rRNA* در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر (µl) شامل ۱۰ میلی‌مولار Tris-HCl، ۵۰ میلی‌مولار KCl، ۱/۵ میلی‌مولار $MgCl_2$، ۲۰ میکرومولار از dNTPs و یک واحد آنزیم DNA Taq polymerase (سیناژن-ایران) در دستگاه اپندورف مدل AG 22331 انجام شد. به محلول واکنش، پرایمرهای طراحی‌شده برای هر قطعه حدود ۰/۵ میکرو مولار از رشتهٔ Forward و Reverse اضافه شد. در نهایت چهل نانوگرم از DNA باکتری به هر واکنش اضافه شد.

واکنش برنامهٔ ترموسایکلر شامل دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ درجهٔ سلسیوس به مدت ۵ دقیقه بود. سپس دناتوراسیون ثانویه در دمای ۹۴ درجهٔ سلسیوس به مدت یک دقیقه، ۳۰ ثانیه دمای اتصال پرایمر (annealing) برای چهار قطعه به‌ترتیب ۵۹، ۵۸، ۵۵ و ۶۳ درجهٔ سلسیوس، ۳۰ ثانیه دمای تکثیر اولیه در ۷۲ درجهٔ سلسیوس و در آخر تکثیر نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجهٔ سلسیوس صورت پذیرفت. محصول PCR با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی، و روی ژل آگاروز (Merck, Germany) ۱/۵ درصد تحت نور فرابنفش (UV) مشاهده شد.

تعیین توالی

محصول PCR با استفاده از کیت Roche (Germany) تخلیص شد و با دستگاه 3130 genetic analyzer (Foster City, Applied Bio System ABI CA, USA)، ترادف نوکلئوتیدی هر

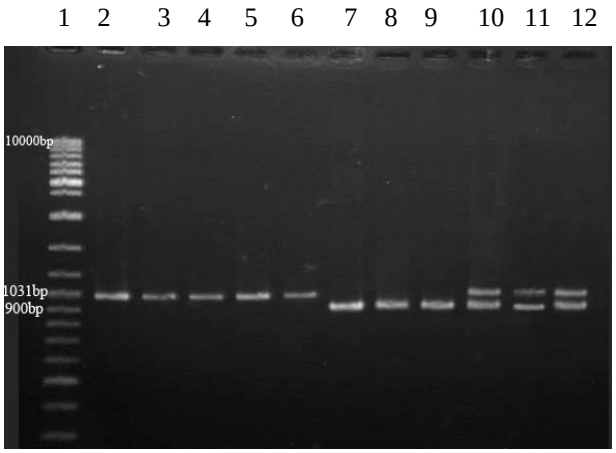
دو رشته با استفاده از پرایمرهای تعیین توالی (Sequencing) و تکثیرکننده (Amplification) مشخص شد. آنالیز توالی‌های حاصل با نرم‌افزارهای Laser gene 6 و Chromas انجام، و در نهایت درخت فیلوژنی با نرم‌افزار Clustal W .811 و MEGA 5.05 رسم شد.

یافته‌ها

تعداد ۲۷ نمونهٔ قابل سروتیپ از بین ۵۲ نمونه *سالمونلا*های جمع‌آوری‌شده از برخی بیمارستان‌های وابسته به دانشگاه شهید بهشتی و دیگر بیمارستان‌های تهران انتخاب شد. فراوانی سروتیپ‌های جداشده به‌ترتیب *S. paratyphi C* ٪۱۴/۸ (n=۴)، *S.typhi*٪۲۹/۶(n=۸)، *S. paratyphi B* ٪۱۸/۵ (n=۵)، ٪۲۶(n=۷) *S. paratyphi A* و ٪۱۱/۱(n=۳) *S. enteritidis* بود.

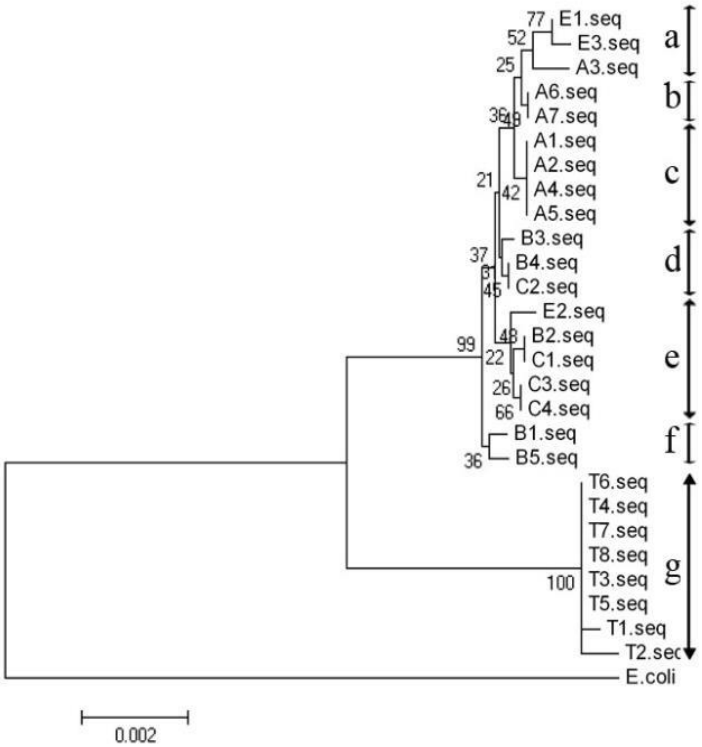
نتایج حاصل از PCR قطعات اول و دوم ژن (شکل ۱) نشان می‌دهد که این قطعه در نمونه‌های مختلف و به دلیل وجود ناحیهٔ IVS، اندازه‌ای متغیر دارد. با توجه به اینکه هفت نسخه از ژن‌های ریبوزومی در اغلب *انتروباکتریاسه*های موجود است، چنین یافته‌ای دور از انتظار نیست. با توجه به شکل ۱، محصول PCR مربوط به قطعهٔ اول ژن، حاکی از تنوع اندازهٔ باندی است. در چاهک‌های ۲ تا ۶ وجود تک‌باند محصول PCR با اندازهٔ ۱۰۳۱ جفت باز نشان می دهد کل ۷ نسخه توالی IVS دارد. به عبارتی هر ۷ نسخهٔ ریبوزومی در ساختار ژنی خود توالی مارپیچ ۲۵ دارند؛ در حالی که در چاهک‌های ۷ تا ۹ اندازهٔ باند ۹۰۰ جفت باز حاکی از نبود این قطعه (مارپیچ ۲۵) در کلیهٔ نسخه‌های ژن مزبور است. در چاهک‌های ۱۰ تا ۱۲، وجود دو باند ۹۰۰ و ۱۰۳۱ جفت باز نشان می‌دهد که برخی نسخه‌های ژن ریبوزومی در ساختار خود توالی (IVS) دارند و برخی نیز فاقد آن هستند.

همین مشاهدات دربارهٔ قطعهٔ دوم ژن *23S rRNA* نیز قابل‌توضیح است که دربرگیرندهٔ ساختار مارپیچ ۴۵ است (شکل ۱). سویه‌های *سالمونلا* تیفی همگی واجد قطعهٔ مارپیچ ۲۵ بود؛ در حالی که در سویه‌های *سالمونلا* پاراتیفی A و *سالمونلا* پاراتیفی C این قطعه مشاهده نشد. بیشترین تنوع کپی‌های کروموزومی *23S* به سویه‌های *سالمونلا* پاراتیفی B و C مربوط است که هر دو قطعه در ساختار ریبوزومی آنها دیده شد. در قطعهٔ دوم ژن که دربرگیرندهٔ مارپیچ ۴۵ است، اکثرنمونه‌ها به‌جز سویه‌های *سالمونلا* پاراتیفی B و C، فاقد قطعهٔ مارپیچ ۴۵ در ساختار کروموزومی خود بودند. برخلاف قطعهٔ اول، در سویه‌های *سالمونلا* تیفی هیچ‌گونه نشانه‌ای از مارپیچ ۴۵ در ساختار کروموزومی این سروتیپ مشاهده نشد. این در حالی است که سویه‌های *سالمونلا* انتریتیدیس در ساختار خود واجد قطعهٔ مارپیچ ۲۵ و فاقد مارپیچ ۴۵ بود.



شکل ۱. PCR مربوط به قطعهٔ اول و دوم ژن *23S rRNA*: چاهک اول DNA Ladder marker، چاهک ۲-۶: محصول مربوط به توالی‌های دارای IVS در همهٔ کپی‌های ژن با اندازهٔ باند (۱۰۳۱ bp)، چاهک ۷-۹: توالی‌های فاقد IVS در همهٔ کپی‌های ژن با اندازهٔ باند (۹۰۰ bp)، چاهک ۱۰-۱۲ مربوط به توالی‌هایی است که در برخی از کپی های ژن دارای IVS و در برخی فاقد آن بوده‌اند.

برای بررسی فیلوژنی، توالی قطعات IVS حذف و درخت فیلوژنی با نرم‌افزار MEGA 5.05 و روش Neighbour joining ترسیم شد (شکل ۲) . توالی *23S rRNA* به‌خوبی سویه‌های دارای سروتایپ یکسان را طبقه‌بندی کرد و در یک خوشهٔ مجزا قرار داد. از آنالیز ۷ خوشهٔ به‌دست‌آمده تفاوت قابل‌ملاحظه‌ای بین سروتیپ‌های *سالمونلا* پاراتیفی B و C دیده نشد که احتمالاً به دلیل حضور قطعه‌های IVS در ساختار آنها است. میزان قرابت سویه‌های *سالمونلا* پاراتیفی A، C و *سالمونلا* انتریتیدیس با روش Maximum likelihood و Kimura two parameter بین ۱۰۰-۹۹ درصد بود. این میزان برای *سالمونلا* تیفی و پاراتیفی B بین ۱۰۰-۹۹/۸ درصد گزارش شد. این توالی به‌خوبی سویه‌های *سالمونلا* تیفی را در خوشه‌ای مجزا قرار داده و آنها را به‌طور کامل از دیگر سروتیپ‌ها جدا کرد. این امر برای *سالمونلا* انتریتیدیس به وضوح مشاهده نشد. به نظر می‌رسد تفاوت نمونه‌ها و ساختار توالی IVSها در این امر دخالت داشته است.



شکل ۲. درختچهٔ فیلوژنی ژن ۲۳S rRNA با روش Neighbor joining و Replicates Bootstrap 1000 به‌وسیلهٔ نرم‌افزار Mega 5.05. E:Salmonella enterica serovar enteritidis، A:Salmonella enterica serovar para typhi A، B:Salmonella enterica serovar para typhi B، C: salmonella enterica serovar paratyphi C و T:Salmonella enterica serovar Typhi. **توالی** E-coli 0157:H7 FDL933 **در** NCBI **برای کنترل و یا به‌عبارتی** Out Group **استفاده شد.**

بحث و نتیجه‌گیری

تکنیک‌هایی که برای طبقه‌بندی باکتری‌ها به کار می‌رود در دو دستهٔ فنوتیپی و مولکولی قرار می‌گیرد (۱). اگرچه روش‌های سنتی و مرسوم مثل بررسی خصوصیات مورفولوژی و فیزیولوژی، خصوصیات بیوشیمیایی و سرولوژی هنوز هم کاربرد وسیعی دارد، در چند دههٔ اخیر استفاده از تکنیک‌های جدید و تازه مشابه منوکلونال آنتی‌بادی، پروب‌های DNA و PCR رو به افزایش نهاده است (۱۴). در بسیاری از موارد، اختلاف ژنتیکی بین ایزوله‌ها تفاوت‌های شاخص فنوتیپی ایجاد می‌کند، مثل تفاوت در فاژ تایپ، آنتی‌ژن، آنزیم‌ها، ایزوزیم‌ها، مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی و چرخه‌های متابولیکی که از لحاظ بالینی حائز اهمیت است (۲،۱۵).

روش‌های تیپ‌بندی ابزار مناسبی برای مطالعهٔ ویژگی‌های اپیدمیولوژی باکتری‌های پاتوژن است. به همین منظور امروزه برای تعیین ارتباط اپیدمیولوژی بین جنس‌ها و سویه‌های غیرمرتبط و مرتبط با هم و نیز تعیین و شناسایی ارتباط تکاملی بین سویه‌های نزدیک به هم و اشتقاق آنها از یک نیای سلولی، از ابزار مولکولی استفاده می‌شود (۲،۱۶).

توالی ژن زیرواحد کوچک ریبوزوم *16S rRNA* و نیز زیرواحد بزرگ آن *23S rRNA* به‌طور مکرر برای تعیین ارتباط فیلوژنی بین باکتری‌ها و شناسایی گونه و جنس استفاده می‌شود؛ چراکه اغلب تعیین توالی به منظور شناسایی باکتری راحت‌تر و دقیق‌تر از روش‌های بیوشیمیایی یا فیزیولوژیکی است. برای بررسی‌های فیلوژنی با استفاده از روش چندفازی (Polyphasic) تعیین توالی ژن و *23S rRNA* معمول‌تر و مرسوم‌تر است؛ زیرا در همهٔ باکتری‌ها وجود دارد، عملکرد آنها در طول زمان حفظ شده است، به‌راحتی تعیین توالی می‌شوند و مهم‌تر از همه وجود نواحی بسیار حفظ شده تا نواحی بسیار متغیر در توالی آنها است (۳،۱۴،۱۷).

زیرواحد بزرگ ریبوزوم حاوی اطلاعات بیشتری نسبت به زیرواحد کوچک است و نه تنها به دلیل بزرگ‌تر بودن آن، بلکه حاوی نواحی گسترده‌ای است که میزان جهش بالاتری دارد و می تواند برای بررسی تکاملی بین سویه‌های نزدیک به هم کاربرد داشته باشد (۱،۱۸،۱۹).

از آنجا که توالی ژن *16S rRNA* ممکن است برای آنالیز فیلوژنی گونه‌های نزدیک به هم؛ به‌ویژه گونه‌های مربوط به یک

جنس به دلیل شباهت بسیار زیاد توالی آن در گونه‌های مختلف باکتری‌های یک جنس کافی نباشد، پیشنهاد شده از شاخص‌ها و ژن‌های دیگر استفاده شود (۲،۲۰،۲۱).

جنس *Salmonella* به خانوادهٔ *انتروباکتریاسه* تعلق دارد. در حال حاضر با توجه به تنوع سروتیپی این جنس، شناسایی و تعیین سروتیپ سویه‌های *سالمونلا* یکی از مشکلات محسوب می شود. بنابراین استفاده از روش‌های جدید تعیین هویت در این مقوله ضروری است. یکی از این روش‌ها استفاده از درختچهٔ فیلوژنی براساس تعیین توالی ژن‌های خانه‌دار است (۱۰).

با توجه به نتایج و تحقیقات صورت‌گرفته مبنی بر تمایز سروتیپ‌های *سالمونلا* براساس توالی *23S rRNA*، به نظر می‌رسد این ژن در مقایسه با *16S rRNA* عملکرد بهتر و دقیق‌تری دارد (۲۲). بنابراین در تحقیق حاضر برای بررسی فیلوژنی *سالمونلا*های بالینی جداشده، از توالی ژن *23S rRNA* استفاده شد. نتایج حاصل از این بررسی با دیگر تحقیق‌های مشابه دربارهٔ جنس *سالمونلا* قابل‌مقایسه است.

در سال ۱۹۹۸، Christensen و همکاران، با استفاده از توالی ژن *16S rRNA* و *23S rRNA*، ارتباط فیلوژنی سویه‌های *Salmonella* را بررسی کردند. آنها در این تحقیق نتایج را با توالی های ثبت‌شده در GeneBank برای *E.coli* و *Shigella* بررسی کردند. نتیجهٔ تحقیق آنها روی ۱۶ نمونه *Salmonella* حکایت از آن داشت که بین سویه‌های *S. enterica* و *S. bongori*، ۳/۵-۲/۸ درصد تفاوت وجود دارد. در این میان بین سویه‌های *S. typhi* و S.*typhimurium* تنها ۰/۳ درصد تفاوت دیده شد که این مقدار با نتایج تحقیق فعلی همخوانی دارد. اما بررسی‌ها با سویه‌های *Shigella* و *E.coli* حدود ۹۱/۵درصد قرابت نشان داد. تحقیق دیگر آنها روی جنس *سالمونلا* و توالی بین دو ساختار *16S rRNA*و *23S rRNA* نیز معلوم کرد توالی Internal transcribed spacer (ITS)) به‌خوبی ژن *23S rRNA* قادر به تمایز سروتیپ‌ها از یکدیگر نیست. نتیجهٔ آنها با بررسی مطالعهٔ اخیر در تمایز و دقت ژن *23S rRNA* در تمایز سویه‌ها، مشابه بود (۲۳،۲۴).

در سال ۲۰۰۰، Pabbaraju و همکاران ساختار IVS را در *سالمونلا* بررسی کردند. بررسی آنها نیز مشابه یافته‌های پژوهش اخیر نشان داد در غالب سویه‌ها ساختار مارپیچ ۲۵ شایع‌تر (>٪۶۰) است، اما در سرووار تیفی تنها مارپیچ ۲۵ وجود داشت و ساختار مارپیچ ۴۵ دیده نشد. یافتهٔ آنها با نتایج بررسی فعلی همسو است که براساس آن در تمام سویه‌های *سالمونلای* تیفی (۱۰۰٪) مارپیچ ۲۵ مشاهده شد. از طرفی با بررسی‌های مولکولی بیشتر (روش MLEE) نشان دادند در تمام زیرگونه‌های *سالمونلا* ساختارهای مارپیچ وجود دارد. بررسی Pabbaraju و همکاران روی ۷۲ سرووار متعدد مربوط به زیرگونه‌های *سالمونلا* تأیید کرد که این ساختار از طریق انتقال عمودی بین سویه‌ها منتقل شده و کاملا تصادفی است. پژوهش آنها نشان داد زیرگونهٔ *Salmonella bongori* هر دو ساختار مارپیچ ۲۵ و ۴۵ را دارد؛ در حالی که سویه‌های *S. enteritidis* مشابه نتیجهٔ به‌دست‌آمده در مطالعهٔ حاضر، قطعهٔ مارپیچ ۲۵ را دارد. دیگر نتایج آنها دربارهٔ مارپیچ ۴۵ به دلیل تفاوت نوع و نبودِ سرووارهای مشابه در سویه‌های مطالعهٔ حاضر قابل بحث و بررسی نبوده است (۸،۱۹).

در سال ۲۰۰۶ Hunt و همکاران با مطالعهٔ ۱۲۰ سویهٔ *سالمونلای* جداشده از نمونه‌های بالینی و غذا و با استفاده از توالی ژن *23S rRNA* و بررسی وجود مارپیچ در آنها، قرابت سویه‌های یادشده را بررسی کردند. آنها نیز مشابه نتایج پژوهش فعلی، در کل سویه‌های *S.typhi* ساختار مارپیچ ۲۵ را مشاهده کردند و در سویه‌های *S. enteritidis* و *S. paratyphi C* وجود مارپیچ ۴۵ ثابت شد. بررسی فیلوژنی آنها بدون در نظر گرفتن ساختارهای مارپیچ نشان داد این ژن می‌تواند در حد زیرگونه جنس *Salmonella* را طبقه‌بندی کرده و گونه‌های یکسان را با قرابتی بین ۱۰۰-۹۹/۳ درصد از هم متمایز کند. این میزان قرابت با نتیجهٔ قرابت سویه‌های *سالمونلا* در مطالعهٔ حاضر همخوانی داشت اما برخلاف نتایج آنها، در مطالعهٔ ما نمونه‌های *S. enteritidis* ساختار مارپیچ ۴۵ را نشان ندادند. این امر می‌تواند به دلیل تفاوت در منبع و محل جغرافیای جداسازی نمونه‌ها و تفاوت تکاملی سویه‌ها در مناطق مختلف باشد (۲۵).

مقایسهٔ این روش با مطالعهٔ قبلی پژوهشگران (Tajbakhsh و همکاران) در سال ۲۰۱۱ نشان داد ژن *23S rRNA* کارایی دقیق‌تر و بهتری نسبت به *16S rRNA* دارد؛ به‌طوری که قادر است سویه‌ها را تا سطح زیرگروه طبقه‌بندی کند، در حالی که برای توالی ژن *16S rRNA* تمایز در حد سرگروه وجود ندارد و تفکیک سویه‌های نزدیک به هم امکان‌پذیر نیست. از این رو می‌توان استفادهٔ توأمان از توالی ژن‌های ریبوزومی *16S rRNA* و *23S rRNA* را در بررسی های فیلوژنی به‌عنوان مکمل همدیگر پیشنهاد داد (۲۲).

Souii و همکاران (۲۰۱۲) فیلوژنی *سالمونلا* را در نواحی IVS و ژن *tRNA* ریبوزومی بررسی کردند. براساس یافته‌های آنها توالی *tRNA* در بین سرووارهای *سالمونلا* کاملا حفاظت‌شده بود و تغییری در ساختار آن وجود نداشت. اما مشابه یافتهٔ پژوهش اخیر، در نواحی IVS، تفاوت‌هایی از قبیل جهش، جایگزینی و

حذف‌شدگی توالی با توجه به نتایج تعیین توالی دیده شد که توانست به‌خوبی سرووارهای مطالعه‌شده را از هم تفکیک کند. این بررسی تأییدکنندهٔ نتایج مطالعهٔ حاضر در کاربرد توالی *23S rRNA*، به‌عنوان توالی هدف جهت جداسازی و تعیین سرووارهای *سالمونلا* است (۲۶).

در نتیجه‌گیری این مطالعه می‌توان به اهمیت روش‌های مولکولی (PCR) در ترکیب با آنالیز تعیین توالی اشاره کرد که در شناسایی ارتباط فیلوژنی و تکاملی باکتری‌ها کاربرد دارد. با توجه به نتایج این مطالعه، بررسی فیلوژنی *سالمونلا* با استفاده از توالی ژن *23S rRNA* در مقایسه با *16S rRNA* و دیگر زیرواحدهای ریبوزومی عملکرد مناسب‌تری دارد. بررسی اخیر به‌صورت دقیق سویه‌های *S. typhi* را براساس توالی *23S rRNA* از دیگر سویه‌ها متمایز ساخت. با توجه به این نتایج به نظر می‌رسد تعیین توالی و آنالیز فیلوژنی ژن *23S rRNA* می‌تواند روشی سریع‌تر، مقرون‌به صرفه‌تر و آسان‌تر برای تعیین و شناسایی سرووارهای *سالمونلا* در مقایسه با روش‌های مرسوم سروتایپینگ با آنتی‌سرم‌ها و یا روش‌های مولکولی پیچیده‌تر مانند MLST باشد. مطالعهٔ فیلوژنی علاوه بر بحث تکامل، عمدتا برای درک و شناسایی انتشار سویه‌های بیماری‌زا در انسان و مطالعات اپیدمیولوژی کاربرد دارد.

ایران جزو کشورهایی است که *سالمونلا*های مولد تب تیفوئید در برخی مناطق جغرافیایی آن به‌صورت بومی و اندمیک بوده و سالانه موارد متعددی از آن گزارش می‌شود. براساس مطالعهٔ حاضر و توالی‌های ژن *23S rRNA* گزارش‌شده، شناسایی و ثبت سویه‌های بومی ایران، بررسی فیلوژنی و اپیدمیولوژیک سویه‌های *سالمونلای* بیماری‌زا، افزودن موارد جدید از سویه‌های مولد تیفوئید پس از ثبت توالی به درختچهٔ فیلوژنی حاضر امکان‌پذیر به نظر می‌رسد. این امر به غنی‌شدن منبع اطلاعاتی ژنومی سویه‌های کشور و مطالعهٔ دیگر محققان در این زمینه کمک شایانی خواهد کرد.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله مراتب سپاسگزاری و قدردانی خود را از کلیهٔ همکاران در مرکز تحقیقات گوارش و کبد به‌خاطر مساعدت‌های ایشان اعلام می‌کنند. این مطالعه با حمایت مالی پژوهشکدهٔ بیماری‌های گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام شده است.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. Fox GE, Wisotzkey JD, Jurtshuk JR P. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 1992;42(1):166-70.
2. Patwardhan A, Ray S, Roy A. Molecular markers in phylogenetic studies-A Review. J Phylogenetics Evol Biol. 2014;131(2):1-9.
3. Rajendhran J, Gunasekaran P. Microbial phylogeny and diversity: small subunit ribosomal RNA sequence analysis and beyond. Microbiological research. 2011;166(2):99-110. https://doi.org/10.1016/j.micres.2010.02.003 PMid:20223646
4. Brochier C, Bapteste E, Moreira D, Philippe H. Eubacterial phylogeny based on translational apparatus proteins. TRENDS in Genetics. 2002;18(1):1-5. https://doi.org/10.1016/S0168-9525(01)02522-7
5. Drancourt M, Bollet C, Carlioz A, Martelin R ,Gayral J-P, Raoult D. 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. J. Clin. Microbiol. 2000;38(10):3623-30.
6. Gogarten JP, Townsend JP. Horizontal gene transfer , genome innovation and evolution. Nat. Rev. Microbiol. 2005;3(9):679-87. https://doi.org/10.1038/nrmicro1204 PMid:16138096
7. Pronk LM, Sanderson KE. Intervening Sequences in rrl Genes and Fragmentation of 23S rRNA in Genera of the FamilyEnterobacteriaceae. J. Bacteriol. 2001;183(19):5782-7. https://doi.org/10.1128/JB.183.19.5782-5787.2001 PMid:11544246 PMCid:PMC95475
8. Pabbaraju K, Sanderson KE. Sequence diversity of intervening sequences (IVSs) in the 23S ribosomal RNA in Salmonella spp. Gene. 2000;253(1):55-66. https://doi.org/10.1016/S0378-1119(00)00239-0
9. Mattatall NR, Sanderson KE. Salmonella typhimurium LT2 possesses three distinct 23S rRNA intervening sequences. J. Bacteriol. 1996;178(8):2272-8. https://doi.org/10.1128/jb.178.8.2272-2278.1996 PMid:8636028 PMCid:PMC177935
10. Pires SM, Vieira AR, Hald T, Cole D. Source attribution of human salmonellosis: an overview of methods and estimates. Foodborne Pathog Dis. 2014;11(9):667-76.

https://doi.org/10.1089/fpd.2014.1744
PMid:24885917

11. Fukushima M, Kakinuma K, Kawaguchi R. Phylogenetic analysis of Salmonella, Shigella, and Escherichia coli strains on the basis of the gyrB gene sequence. J. Clin. Microbiol. 2002;40(8):2779-85. https://doi.org/10.1128/JCM.40.8.2779-2785.2002 PMid:12149329 PMCid:PMC120687

12. Sukhnanand S, Alcaine S, Warnick LD, Su W-L, Hof J, Craver MPJ, et al. DNA sequence-based subtyping and evolutionary analysis of selected Salmonella enterica serotypes. J. Clin. Microbiol. 2005;43(8):3688-98.

13. Sambrook J, Russell D. Molecular Cloning. A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY, USA, 2001.

14. Sullivan CB, Diggle MA, Clarke SC. Multilocus sequence typing: Data analysis in clinical microbiology and public health. Mol Biotechnol. 2005;29(3):245-54. https://doi.org/10.1385/MB:29:3:245

15. Ludwig W, Strunk O, Klugbauer S, Klugbauer N, Weizenegger M, Neumaier J, et al. Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis (review). Electrophoresis. 1998;19(4):554-68.

16. Yarza P, Yilmaz P, Pruesse E, Glöckner FO, Ludwig W, Schleifer K-H, et al. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. Nat Rev Microbiol. 2014;12(9):635-45. https://doi.org/10.1038/nrmicro3330 PMid:25118885

17. Ludwig W, Schleifer K. Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. FEMS Microbiol Rev. 1994;15(2-3):155-73.

18. Woese CR. Bacterial evolution. Microbiol Rev. 1987;51(2):221. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1994.tb00132.x PMid:7524576

19. Miller WL, Pabbaraju K, Sanderson KE. Fragmentation of 23S rRNA in Strains of Proteus andProvidencia Results from Intervening Sequences in therrn (rRNA) Genes. J. Bacteriol. 2000;182(4):1109-17. https://doi.org/10.1128/JB.182.4.1109-1117.2000 PMid:10648538

20. Mattatall NR, Daines DA, Liu S-L, Sanderson KE. Salmonella typhi contains identical intervening sequences in all seven rrl genes. J. Bacteriol. 1996;178(17):5323-6. https://doi.org/10.1128/jb.178.17.5323-5326.1996 PMid:8752356 PMCid:PMC178335

21. Zengel JM, Lindahl L. Transcription of ribosomal genes during a nutritional shift-up of Escherichia coli. J. Bacteriol. 1986;167(3):1095-7. https://doi.org/10.1128/jb.167.3.1095-1097.1986 PMid:2427499 PMCid:PMC215991

22. Tajbakhsh M, Nayer BN, Motavaze K, Kharaziha P, Chiani M, Zali MR, et al. Phylogenetic relationship of Salmonella enterica strains in Tehran, Iran, using 16S rRNA and gyrB gene sequences. J. Infect. Dev. Ctries. 2011;5(6):465-72.

23. Christensen H, Moller PL, Vogensen FK, Olsen JE. 16S to 23S rRNA spacer fragment length polymorphism of Salmonella enterica at subspecies and serotype levels. Journal of applied microbiology. 2000;89(1):130-6. https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01095.x

24. Christensen H, Nordentoft S, Olsen JE. Phylogenetic relationships of Salmonella based on rRNA sequences. Int J Syst Evol Microbiol. 1998;48 Pt 2:605-10.

25. Hunt DE, Klepac-Ceraj V, Acinas SG, Gautier C, Bertilsson S, Polz MF. Evaluation of 23S rRNA PCR primers for use in phylogenetic studies of bacterial diversity. Appl. Environ. Microbiol. 2006;72(3):2221-5. https://doi.org/10.1128/AEM.72.3.2221-2225.2006 PMid:16517676 PMCid:PMC1393206

26. Souii A, NEJMA MB, Rhim AE, Mastouri M, MAKHLOUF M, Mohamed N. Molecular identification of four Salmonella serovars isolated from food in Tunisia based on the sequence of the ribosomal RNA genes. African Journal of Microbiology Research. 2012;6(35):6454-61. https://doi.org/10.5897/AJMR12.964