مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۷ – شماره ۳ – پاییز ۱۳۹۲

Journal homepage: www.ijmm.ir

جداسازی *استرپتوکوکوس اینیه* و تشخیص آن توسط PCR

مهرنوش نوراده کیکاوسی[۱]، مژگان بنده پور[۲]، جمیله نوروزی[۱]، بهرام کاظمی[۲]

۱. گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

۲. مرکز تحقیقات سلولی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت:۱۳۹۲/۰۴/۱۰

پذیرش:۱۳۹۲/۰۷/۱۰

انتشار آنلاین:۱۳۹۳/۰۲/۱۵

موضوع:

باکتری‌شناسی پزشکی

IJMM 1392; 7(3): P 8-11

نویسنده مسئول:

مهرنوش نوراده کیکاوسی

گروه میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

تلفن: ۰۹۱۲۱۴۸۴۹۵۶

پست الکترونیک:

mkeykavosi@gmail.com

چکیده

زمینه و اهداف: *استرپتوکوکوس اینیه* بیماری‌زای مهم در آبزیان و انسان و عامل عفونت سیستمیک در هر دو میزبان می‌باشد. علائم عفونت های حاصل از آن بسیار مشابه علائم ایجادشده توسط استرپتوکوکوس های مهاجم ویژه انسان است و قادر به انتشار به قلب، کبد، طحال و مغز می‌باشد . علی‌رغم انتشار جهانی آن در میان ماهی‌ها، در کشور ما توجه چندانی به این باکتری به عنوان عامل عفونت انسان و آبزیان نمی‌شود. هدف از این مطالعه جداسازی *استرپتوکوکوس اینیه* و تشخیص آن توسط PCR می باشد.

مواد و روش کار: جهت تشخیص *استرپتوکوکوس اینیه*، از بافت ماهی آلوده روی محیط آگار با خون گوسفند کشت داده شد. از کلنی های مشکوک و بافت مغز ماهی DNA استخراج و واکنش PCR برای ژن 16SrRNA باکتری انجام گرفت.

یافته‌ها: *استرپتوکوکوس اینیه* روی محیط آگار خون گوسفند پس از ۲۴ ساعت در انکوباسیون ۳۷ درجه سلسیوس، به صورت کلنی های موکوئید با همولیز بتا رشد کرد. سپس با تکنیک *PCR* آلودگی ماهی‌ها به این باکتری تأیید گردید.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه، *استرپتوکوکوس اینیه* توسط روش حساس و سریع *PCR* در بافت ماهی و کشت حاصل از آن تشخیص داده شد.

کلمات کلیدی: *استرپتوکوکوس اینیه*، *PCR*.

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

مقدمه

استرپتوکوکوس اینیه (*Streptococcus iniae*)، پاتوژن شایع ماهی و بندرت عامل عفونت در انسان می‌باشد. این باکتری اولین بار در سال ۱۹۷۶ از آبسه‌های زیر جلدی دلفین (*Inia geoffrensis*) در آب شیرین از آمریکا جدا شد (**۱، ۲، ۳**). ۲۰ سال پس از کشف آن در دلفین، در زمستان سال ۱۹۹۶– ۱۹۹۵، اولین بار به عنوان عامل عفونت در انسان شناسایی شد که در تورنتو، ۹ مورد از عفونت های تهاجمی *استرپتوکوکوس اینیه* در بیمارانی که اخیراً با ماهی تازه تماس داشته‌اند، گزارش شد و هم اکنون به عنوان پاتوژن ماهی، ایجادکننده عفونت های پراکنده در ماهی دم زرد، قزل آلای رنگین‌کمانی و ماهی آزاد coho می‌باشد و باعث زخم‌های پوستی، میوزیت های نکروز شونده، منتژوانسفالیت و پان افتالمیا در ماهی می‌شود (**۲**). گرچه بالا بودن سن و وجود بیماری‌های زمینه‌ای به نظر می‌رسد که عامل خطری برای عفونت های تهاجمی *استرپتوکوکوس اینیه* باشد، اما به علت مشکلات در تشخیص و جداسازی *S. استرپتوکوکوس اینیه* در آزمایشگاه‌های میکروب شناسی بالینی، عفونت های انسانی حاصل از این باکتری شناخته‌شده نیست و آمار دقیقی از آن در دسترس نمی‌باشد (**۴– ۶**).

عفونت استرپتوکوکی گر چه در ماهی‌ها معمول نمی‌باشد ولی در صورت وقوع بیماری می‌تواند خسارت‌های جبران‌ناپذیری را وارد نماید. عفونت استرپتوکوکی در ماهی، اولین بار در سال ۱۹۵۷ در قزل آلای رنگین‌کمانی پرورشی در ژاپن توسط Hoshina و همکارانش گزارش شد (**۷**). عفونت استرپتوکوکی در آبزیان می تواند باعث مرگ‌ومیر بالایی حدود بیشتر از ۵۰٪ در

مدت ۳ تا ۷ روز شود که معمولاً با رفتارهای غیرطبیعی در حین شنا کردن که غالباً به شکل شنای عمودی و مارپیچی ماهی به دور خود می‌باشد، شناخته می شود. عوامل محیطی و یا ضعف سیستم ایمنی موجب افزایش حساسیت ماهی نسبت به عوامل بیماری زا می‌گردد و این پدیده، اکثراً توسط استرس تسریع می‌یابد. استرس در اغلب موارد نقش مهمی در شیوع بیماری‌های عفونی در جمعیت ماهی‌ها ایجاد می‌کند. بعضی از این استرس ها شامل: افزایش دمای آب (مثلاً در طول تابستان) اغلب بیش از ۱۷ درجه سلسیوس (**۸، ۹**)، نامناسب بودن کیفیت آب از جمله بالا بودن سطح آمونیوم یا غلظت نیترات و نیتریت و کاهش اکسیژن غیر محلول کمتر از ۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر می باشند (**۱۰**).

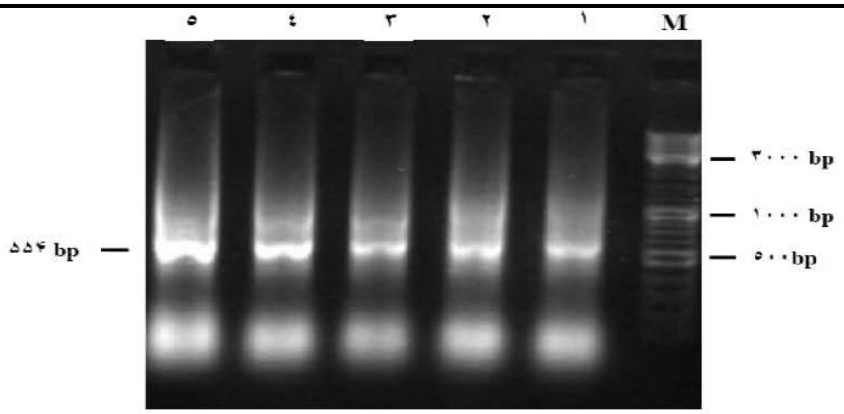
باکتری از ماهی آلوده از طریق پوست آسیب‌دیده یا زخم قادر به انتقال به انسان می باشد از آنجا که اکثر افراد در کشور ما نیز ماهی را به صورت تازه و غیر آماده از مغازه خریداری کرده و اقدام به پاک‌سازی پولک‌ها و جداسازی اندام‌های داخلی ماهی می‌کنند، بنابراین احتمال خراشیدگی پوست دست زیاد است. باکتری از طریق خراش پوست وارد شده و می‌تواند ایجاد سلولیت و عفونت سیستمیک کند که افراد ماهیگیر و کسانی که با ماهی سر و کار دارند و افراد بزرگ‌سال و به ویژه بیماران دیابتی و دارای مشکلات کبدی، کلیه و دچار نقص سیستم ایمنی، بیشتر در معرض خطرند. علی‌رغم انتشار جهانی آن در میان ماهی‌ها، در کشور ما توجه چندانی به این باکتری به عنوان عامل عفونت انسان و آبزیان نمی‌شود. هدف از این بررسی در مرحله اول جداسازی باکتری از ماهی آلوده، کشت و در مرحله بعد تأیید توسط واکنش PCR می‌باشد. بدین منظور ابتدا باکتری را از بافت های مختلف ماهی ایزوله شده و روی محیط بلاد آگار کشت داده شد. سپس برای تأیید *استرپتوکوکوس اینیه* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی 16SrRNA واکنش PCR انجام گردید.

مواد و روش‌ها:

در مرحله اول نمونه‌گیری از ماهیانی که حداقل یکی از علائم بیماری از جمله شنای غیرطبیعی، تیرگی پوست همراه با خونریزی، ادم و بادکردگی شکم، بیرون زدگی چشم و یا سایر علائم را داشتند، به عمل آمد. به این ترتیب که از بافت های مختلف ماهی مانند مغز، قلب، عضله، اطراف چشم و اعماء و احشا توسط سواپ سترون در محیط بلاد آگار حاوی ۵٪ خون گوسفند کشت انجام شد و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. پس از ظاهر شدن کلنی های سفید و موکوئیدی همراه با همولیز بتا و بعد از رنگ‌آمیزی گرم، استخراج DNA به روش دستی فنل – کلروفرم از کلنی های مشکوک انجام شد. سپس غلظت DNA با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۶۰ نانومتر اندازه گرفته شد و با استفاده گرادیان دمایی جهت یافتن بهترین دما انجام شد. محصول PCR در حرارت اتاق روی ژل آگارز ۱/۵٪ در کنار مارکر100 bp در محلول بافر TAE الکتروفورز شد. محلول بافر TAE شامل EDTA، Tris و اسید استیک بود. ژل توسط محلول اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شد و در زیر نور ماورای بنفش مشاهده و عکس‌برداری گردید.

یافته‌ها

پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در شرایط ۳۷ درجه سلسیوس، روی محیط بلاد آگار کلنی های سفید و موکوئیدی با همولیز بتای بسیار واضح مشاهده شدند. پس از رنگ‌آمیزی گرم و مشاهده باکتری های کوکسی گرم مثبت که عمدتاً به صورت زنجیره‌های بودند، شک به استرپتوکوزیس قطعی می‌نمود. در مرحله بعد تجربه نشان داد که شرایط مناسب برای انجام PCR ، غلظت 1 µl کلرور منیزیم 50 mM، 0.25 µl آنزیم Taq DNA polymerase حجم نهایی۳۰ در درجه حرارت ۹۴ درجه سلسیوس (denaturation primary) به مدت ۵ دقیقه، حرارت ۹۴ درجه سلسیوس ۳۰ ثانیه (denaturation)، ۵۱ درجه سلسیوس (annealing) به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ سلسیوس (extension) به مدت ۴۵ ثانیه (۳۰ چرخش) و ۷۲ درجه سلسیوس (Final extension) به مدت ۵ دقیقه می‌باشد. در الکتروفورز محصول PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد، باند 554 bp مشاهده شد (شکل ۲) و بدین ترتیب وجود *استرپتوکوکوس اینیه* تأیید گردید.



شکل ۱: الکتروفورز محصولPCR ژن 16 S r RNA (۵۵۴ bp) متعلق به باکتری *استرپتوکوکوس اینیه* در بافت های مختلف بدن ماهی در کنار مارکر وزن مولکولی بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ M – مارکر وزن مولکولی (10000 bp – 100) ۱ – محصولPCR ژن 16 S r RNA (۵۵۴ bp) متعلق به باکتری *استرپتوکوکوس اینیه* از بافت مغز ماهی. ۲ - محصولPCR ژن bp 554 (16S rRNA) متعلق به باکتری *استرپتوکوکوس اینیه* از بافت قلب ماهی. ۳ - محصولPCR ژن *bp 554 (16S rRNA)* متعلق به باکتری *استرپتوکوکوس اینیه* از عضله ماهی . ۴ - محصولPCR ژنbp 554 (16S rRNA)) متعلق به باکتری *استرپتوکوکوس اینیه* از اعما و احشای ماهی. ۵ - محصولPCR ژن bp 554 (16S rRNA) متعلق به باکتری *استرپتوکوکوس اینیه* از بافت اطراف چشم ماهی

بحث

استرپتوکوکوس اینیه به عنوان پاتوژن مهم ماهی در دهه اخیر ظهور کرد. هر چند که این باکتری اولین بار از دلفین آب شیرین در سال ۱۹۷۶ جدا شد (**۱، ۲، ۳**). ولی هم اکنون به عنوان مشکل اصلی سلامت اقتصاد آبزیان در جهان و به خصوص مناطق گرم مطرح می باشد. اخیراً نیز به عنوان یک پاتوژن زئونوزی بالقوه شناسایی‌شده که دست کم ۲۵ مورد از عفونت انسانی توسط S.inia تأییدشده این اطلاعات است (**۴، ۶، ۱۱**).

در سال ۱۹۹۷ تخمین سالانه از زیان حاصل از عفونت توسط این باکتری روی صنعت آبزیان در آمریکا به تنهایی ۱۰ میلیون دلار و تخمین جهانی آن ۱۰۰ میلیون دلار برآورده شده بود (**۱۲**). از آنجا که این باکتری تقریباً باکتری جدیدی است و اخیراً به عنوان باکتری پاتوژن و تهاجمی شناخته‌شده و عدم آگاهی پزشکان بالینی و همچنین تکنسین های آزمایشگاه میکروب شناسی از این باکتری و به دلیل ایجاد سلولیت و همچنین واکنش بتا همولیز معمولاً به اشتباه *S. pyogenus* گزارش می‌شود. و روش های تشخیصی مرسوم ارزش چندانی برای تشخیص ندارند و به دلیل مقرون به صرفه نبودن تکنیک های مولکولی، لذا آمار دقیقی از شیوع و فراوانی این باکتری در عفونت‌های انسانی و آبزیان در آسیا و به ویژه در ایران در دسترس نیست.

آسیایی بودن، سن بالا و وجود بیماری های زمینه‌ای از جمله دیابت ملتیوس و سیروز کبدی و همچنین سابقه برخورد با ماهی، به نظر می‌رسد عامل خطری برای عفونت با این باکتری باشد (**۱۳**). به همین خاطر *استرپتوکوکوس اینیه* هدف خوبی جهت مطالعات تحقیقاتی اخیر می‌باشد. در تحقیقاتی که تا کنون روی *استرپتوکوکوس اینیه* انجام شده بود، جهت جداسازی این باکتری از محیط های TSA یا آگار خوندار حاوی ۵٪ خون گوسفندی استفاده می‌شد و بررسی همولیز بتا نیز روی محیط آگار خوندار انجام می‌گرفت. در این بررسی نیز از محیط آگار خوندار حاوی ۵٪ خون گوسفندی استفاده شد و با مشاهده کلنی‌هایی با همولیز بتای واضح و کاملاً موکوئیدی، مراحل بعدی تحقیق انجام شد.

اخیراً از چندین تکنیک مولکولی از جمله تعیین توالی 16SrRNA، هیبریداسیون ژن چاپرون ۶۰، ردیابی ژن لاکتاز اکسیداز به عنوان ژن هدف در تشخیص *استرپتوکوکوس اینیه* استفاده می‌کنند که در مقایسه با روش های معمول آزمایشگاهی از حساسیت و ویژگی بالاتری برخوردار می‌باشند (**۱۴، ۱۵، ۱۶**).

در این تحقیق نیز با طراحی پرایمرهای اختصاصی 16SrRNA *استرپتوکوکوس اینیه*، پس از استخراج DNA به روش فنل کلروفرم با انجام واکنش PCR از کلونی های مشکوک ، که روشی نسبتاً ساده، با ویژگی بالا و در مقایسه با روش های دیگر ارزان تر می‌باشد، *استرپتوکوکوس اینیه* تأیید شد.

تقدیر و تشکر

از کارکنان مرکز بیولوژی مولکولی و سلولی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به خاطر همکاری در اجرای این پروژه قدردانی می گردد.

References

1. Pier, G. B and S. H. Madin, Streptococcus iniae sp. Nov., a beta hemolytic streptococcus isolated from an Amazon freshwater dolphin, Inia geoffrensis. International Journal of Systematic Becteriology, 1976. 26 (4): p. 545 – 553.
2. Pier, G. B., S.H. Madin, and S. Al- Nakeeb, Isolation and characterization of a second isolate of Streptococcus iniae. International Journal of Systematic Bacteriology, 1978. 28(2): p .311 – 314.
3. Bonar, C. J. and R.A.Wagner, A third report of " golf ball disease" in an Amazon River dolphin (Inia geoffrensis) associated with Streptococcus iniae. Journal of Zoo and Wildlife Medicine, 2003, 34(3): p. 296- 301.
4. Lau, S. K. P. , et al ., Invasive Streptococcus iniae infections outside North America. Jurnal of Clinical Microbiology, 2003. 41(3): p. 1004 – 1009.
5. Koh, T.H., A. Kurup, and J. Chen, Streptococcus iniae discitis in Singapore (7). Emerging Infectious Diseases, 2004. 10(9): p. 1694 – 1696.
6. Facklam, R., et al., Identification and characterization of sporadic isolates of Streptococcus iniae isolated from humans. Journal of Clinical Microbiology, 2005 . 42 (2): p. 933 – 937.
7. Hoshina, T., T. Sano, and Y. Morimoto, A Streptococcus pathogenic to fish. Journal of TokyoUniversityof Fisheries 1985. 44 : p. 57 – 68.
8. Bercovier, H., C. Ghittino, and A. Eldr, Immunization with bacteria antigens:infections with streptococci and related organisms. Developments in biological standardization, 1997. 90 : p. 153 – 160.
9. Inglis, V. , R. J. Roberts, and N. R. Bromage, Streptococcal Infections, in Bacterial Disease of Fish 1993 John Wiley & Sons: New York. P. 196 – 197.
10. Eldar , A., et al ., Steptococcus shiloi, the name for an agent causing septicaemici nfection in fish, is a junior synonym of Streptococcus iniae. International Journal of SSystematic Bacteriology, 1995. 45: p.840 -842.
11. La, S. K. P. , et al., clinical isolates of Streptococcus iniae from Asia are more mucoid and b-hemolytic than those from North America . Diagn Microbiol Infect Dis, 2006. 54(3): p. 177 – 181.
12. Shoemaker, C. A., P. H. Klesius, and J. J. Evans, Prevalence of Streptococcus iniae in tilapia, hybrid striped bass, and channel catfish on commercial fish farms in the United States. American Journal of Veterinary Research, 2001. 62(2): p. 174 – 177.
13. Sun, J. R., et al . , Invasive infection with Streptococcus iniae in Taiwan. Journal of Medical Microbiology, 2007. 56 (9): p. 1246 – 1249.
14. Berridge, B. R., et al ., Development of specific nested oligonucleotide PCR primers for the Streptococcus iniae 16S 23S ribosomal DNA intergenic spacer. Journal of Clinical Microbiology, 1998. 36(9): p. 2778 – 2781.
15. Goh, S. H., et al., Streptococcus iniae, a human and animal pathogen: specific identification by the chaperonin60 gene identification method. Journal of Clinical Microbiology, 1998. 36: p. 2164 – 2166.
16. Mata, A. I. , et al ., Development of a PCR assay for Streptococcus iniae based of the lactate oxidase (lcto) gene with potential diagnostic value. Veterinary Microbiology, 2004. 101 (2): p. 109 – 116.