Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 5:20 +0330 on Monday November 19th 2018

مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۱۸، شماره۹، دی۱۳۹۲(شماره پی در پی۸۱)

تشخیص سریع باکتری سودوموناس آئروژینوزا به روش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن LasI سیستم کروم سنسینگ باکتری

حسین آقاملایی[۱]، کمال عزیزی بارجینی[۲]، مهرداد موسی زاده مقدم[۱*]

[۱] مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه اله (عج)، تهران، ایران. [۲] گروه زیست شناسی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران.

تاریخ دریافت:۱۳۹۲/۱/۲٤ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۳/۱۸

چکیده

زمینه و هدف: سودوموناس آئروژینوزا یک باکتری پاتوژن فرصت طلب بیمارستانی است که به علت دارا بودن مقاومت ذاتی و اکتسابی به آنتی‌بیوتیک‌های معمول مرگ و میر ناشی از عفونت‌های آن بسیار شایع می‌باشد لذا شناسایی سریع و دقیق باکتری می تواند در کنترل عفونت و کاهش مرگ و میر موثر باشد. هدف این مطالعه، ارزیابی استفاده از روشی سریع با اختصاصیت و حساسیت بالا بر پایه واکنش زنجیره پلی‌مراز و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن LasI سیستم کروم سنسینگ باکتری جهت شناسایی آن بود.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی که به روش مقایسه ای بین نتایج حاصل از تشخیص به روش کشت و PCR برای باکتری سودوموناس آئروژینوزا موجود در نمونه بالینی و چهار گونه باکتریایی دیگر انجام گرفت، ابتدا ٤٠ سویه سودوموناس آئروژینوزا از نمونه‌های بالینی جدا شده و به وسیله تست‌های بیوشیمیایی شناسایی و تأیید شدند. یک جفت پرایمر اختصاصی ژن LasI از طریق روش آنالیز بیوانفورماتیک طراحی گردید. پس از استخراج ژنوم باکتری، توالی این ژن با استفاده از تکنیک PCR تکثیر یافت. اختصاصیت آزمون PCR با ژنوم چهار گونه مختلف استافیلوکوکوس اورئوس، کلبسیلا پونومونیه، اشیریشیاکلی و ویبریوکلرا مورد ارزیابی قرار گرفت. از رقت های مختلف ژنوم باکتری سودوموناس آئروژینوزا در آزمون PCR نیز جهت بررسی حساسیت پرایمر طراحی شده استفاده شد. داده‌ها با آزمون آماری تی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: برای تمامی‌سویه های سودوموناس آئروژینوزا جدا شده، آزمون PCR دارای نتیجه مثبت بود. هم‌چنین تا غلظت $۱۰^{-۵}$ از ژنوم باکتری سودوموناس آئروجینوزا نتیجه آزمون PCR مثبت بود. برای ژنوم چهار باکتری دیگر نیز نتایج آزمون PCR منفی بود.

نتیجه گیری: این مطالعه نشان داد که پرایمرهای طراحی شده جهت شناسایی باکتری سودوموناس آئروژینوزا با استفاده از PCR در مقایسه با روش های قبلی شناسایی مبتنی بر این روش از اختصاصیت و حساسیت بیشتری برخوردار می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: سودوموناس آئروژینوزا، PCR، کروم سنسینگ، LasI

***نویسنده مسئول**: مهرداد موسی زاده مقدم، تهران، دانشگاه علوم پزشکی بقیه اله (عج)، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی
Email:mm.genetics@gmail.com

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 5:20 +0330 on Monday November 19th 2018

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 5:20 +0330 on Monday November 19th 2018

مقدمه

باکتری سودوموناس آئروژینوزا پاتوژن فرصت طلبی است که به عنوان یک عامل بیماری‌زای فرصت طلب، بیشتر در افرادی که دچار نقص یا تضعیف سیستم ایمنی بوده به ویژه در بیمارانی که دچار سوختگی شدید شده و یا افراد مبتلا به سرطان و ایدز که سیستم ایمنی آنها به نحوی تضعیف یا سرکوب شده است عفونت ایجاد می‌کند(۱). با توجه به کثرت عفونت‌های ایجاد شده به وسیله این باکتری (حدود ۲۰ درصد عفونت‌های بیمارستانی) و مقاومت ذاتی آن به اکثر آنتی‌بیوتیک‌های مرسوم، مرگ و میر ناشی از عفونت‌های سودوموناس آئروژینوزا بسیار شایع است، به طوری که مطالعات نشان داده است این باکتری سبب مرگ در ۷۰ درصد از افرادی است که به پنومونی ناشی از این باکتری مبتلا شده‌اند. هم‌چنین این باکتری عامل ۱۲ درصد از عفونت‌های مجاری ادراری بیمارستانی، ۱٦ درصد از بیماران مبتلا به ذات الریه بیمارستانی، ۸ درصد از عفونت‌های زخم‌های جراحی و ۱۰ درصد از عفونت‌های خونی است. بنابراین با توجه به عفونت‌های متنوعی که به وسیله باکتری سودوموناس آئروژینوزا ایجاد می‌شود و هم‌چنین مقاومت بالای آنتی‌بیوتیکی این باکتری، تشخیص به موقع جهت درمان دارویی سریع و مناسب از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد(۳ و ۲).

بر این اساس شناسایی سریع و به موقع باکتری جهت شروع تیمار آنتی‌بیوتیکی و درمان سریع عفونت‌های ناشی از آن هنوز به عنوان یکی از مهم‌ترین شاخصه‌ها از اهمیت بالایی برخوردار است. در حال حاضر اگرچه استفاده از روش‌های میکروب‌شناسی برای تشخیص سودوموناس آئروژینوزا خیلی راحت قابل انجام است، اما ضمن این که زمان‌گیر می‌باشد نیز در برخی موارد نیز اگر تعداد باکتری کم باشد(در بیماران تحت تیمار آنتی‌بیوتیک یا بیماران حاوی تعداد کمی‌از باکتری) سبب بروز جواب کاذب منفی می‌گردد(٤). [۱]

بنابراین، به کارگیری روشی حساس و اختصاصی که به وسیله آن بتوان باکتری را سریع‌تر از روش‌های معمول شناسایی نمود و هم توانایی شناسایی تعداد کم آن را در نمونه داشته باشد و نیز در بین سویه‌های مختلف سودوموناس کاملاً برای باکتری سودوموناس آئروژینوزا اختصاصی باشد از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد. در دهه اخیر روش‌های ملکولی مانند واکنش زنجیره ای پلی مراز(PCR) و FISH [۱] به علت سریع و قابل اعتماد بودن بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند(۸ـ۵). در همه این روش‌ها ژن‌های خاصی به عنوان هدف مورد استفاده قرار می‌گیرند که از مهم‌ترین آنها می‌توان به ژن‌های مربوط به 16S rDNA ، the 16S–23S rDNA internally transcribed

1-Fluorescent in Situ Hybridization(FISH)

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 5:20 +0330 on Monday November 19th 2018

(ITS) spacer، fliC، gyrB، toxA، oprI و oprL اشـــاره نمـــود (۱۱ـ۹ و ۵). این ژن‌ها حساسیت بـالایی در شناسـایی سـودوموناس دارنـد، امـا بـه غیـر از ژن toxA کـه اختصاصی سودوموناس آئروژینوزا می‌باشـد، دیگـر ژنهـا بـا اختـصاصیت کمـی در دیگـر سـویه‌هـای سودوموناس نیز قابل شناسایی می‌باشـند؛ بـه عنـوان مثـــال محـــصول واکـــنش PCR ژن oprI در سـویه‌هـای دیگـر سـودوموناس ماننـد *P. fragi*، *P. citronellolis* و *P. viridiflava* قابل مشاهده اسـت.هـم‌چنـین محـــصول PCR ژن oprL در *P. balearica* و *P. citronelloli*، محـصول *PCR* ژن 16S rDNA در *P. fragi* و محـصول PCR ژن fliC تقریبـاً در همـه گونـه‌هـای سودوموناس بـه جـز *P. fluorescens* و *P. chlororaphis* دیده می‌شود(۱۲ـ٤)، لذا نتایج مثبـت کـاذب بـه دسـت آمده در PCR مربوط بـه ژن‌هـای oprL، oprI، 16S rDNA و fliC نشان‌گر حفاظت شدگی بالای این ژنها در میـان سویه‌های مختلف سودوموناس است که البته این امـر سبب غیر معتبر بودن آنها به عنـوان ژن هـدف جهـت شناســـایی اختـــصاصی بـــاکتری ســـودوموناس آئروژینوزا می‌شود. لذا در بیـشتر آزمـایش‌هـا از ژن toxA برای شناسایی کلنی‌هـای شـبیه بـه ایـن بـاکتری استفاده می‌گردد که البتـه ایـن ژن نیـز دارای ضـریب تشخیص ۹۵ درصد در شناسایی نمونه‌ها می‌باشد، لذا احتمـال گـرفتن نتـایج کـاذب منفـی نیـز وجـود دارد (۱۲ـ۴). بنـــابراین، استفاده از ژنـی کـه عـلاوه بـــر داشتن حساسیت بالا، برای سودوموناس آئروژینـوزا اختصاصی بوده و در بیماری‌زایی سـودوموناس نیـز نقش مؤثری داشته باشد تـا بـر ایـن اسـاس از بـروز نتیجه کاذب منفی خطرساز جلوگیری شـود ضـروری به نظر می‌رسد. مطالعات نشان داده اسـت بیـان اکثـر ژن‌های تولید کننـده فاکتورهـای بیمـاری‌زای بـاکتری سودوموناس آئروژینوزا به وسیله یک سیستم ژنی به نـام سیـستم Quorum Sensing (QS) کنتـرل و تنظـیم می‌گردند(۱۵ـ۱۳). در ایـــن بـاکتری سیـستم QS از ۲ سیـستم ژنـی LasR-LasI و RhlR-RhlI تـشکیل شـده است، ژن‌های LasI و RhlI بیـان کننـده دو آنـزیم acyl-homoserine lactone (acyl-HSL) سـنتاز مـی‌باشـند، در حالی که ژن‌های LasR و RhlR تولید کننده پروتئین‌های تنظیم کننـده رونویـسی مـی‌باشـند کـه بـا اتـصال بـه سیگنال اختصاصی خـود سـبب فعـال‌سـازی ژن‌هـای هدف (بیماری‌زا) می‌شـوند(۱٦). سیـستم QS در دیگـر گونه‌های سودوموناس نیـز وجـود دارد، امـا تعـداد و توالی ژن‌های تشکیل دهنده آنها متفاوت می‌باشد(۱۷)، لـذا ژن‌هـای سیـستم کـروم سنـسینگ در بـاکتری ســودوموناس آئروژینــوزا عــلاوه بــر دخالــت در بیماری‌زایی، یک ژن اختصاصی گونه بوده که می‌توان با طراحی پرایمر اختصاصی ژن‌های آن، با حـساسیت و اختـــصاصیت بـــسیار بـــالای ســـودوموناس آئروژینوزای بیماری‌زا را به طور ملکولی و سـریع بـا استفاده از روش PCR شناسایی نمود.

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 5:20 +0330 on Monday November 19th 2018

باید توجه داشت که توالی پرایمرهای طراحی شده نقش بسزایی در میزان حساسیت و اختصاصی بودن واکنش PCR مورد نظر دارند، زیرا توالی تعیین کننده نوع و طول محصول و هم‌چنین شاخصه‌های مهمی چون درصد GC، توانایی تشکیل ساختارهای سنجاق سر (Hairpin)، دمای ذوب (Melting Temperature) و هم سرشته‌سازی (Annealing) می‌باشد. نتایج نشان داده است که میزان محتوای GC توالی یک پرایمر تأثیر مستقیمی بر افزایش دمای ذوب و هم سرشته‌سازی پرایمرها دارد. بهترین درصد GC بین ٦٠ـ٤٥ می‌باشد که البته برای پرایمرهایی با GC کمتر از ٥٠ درصد لازم است تعداد بازهای پرایمر بیش از ١٨ در نظر گرفته شود تا دمای ذوب پرایمرها (دمای مناسب بین ٥٢ تا ٥٨ درجه سانتی‌گراد) بالای حداقل دما که ٥٠ درجه سانتی‌گراد می‌باشد قرار گیرد. هم‌چنین بررسی‌ها نشان داده است که انتهای '3 پرایمر نقش مهمی در کنترل و جلوگیری از اتصالات غیر اختصاصی دارد. وجود یک انتهای '3 که از سه نوکلئید انتهایی آن ٢ نوکلئید از نوع G یا C باشند باعث کاهش قابل توجه اتصالات ثانویه غیر اختصاصی می‌شود(١٨).

در این مطالعه با توجه به اهمیت بیماری‌زایی و عفونت‌های ناشی از باکتری سودوموناس آئروژینوزا و ضرورت شناسایی سریع و به موقع این باکتری جهت شروع یک برنامه درمانی مؤثر، اختصاصیت و حساسیت یک جفت پرایمر طراحی شده بر اساس توالی ژن lasI به منظور شناسایی نمونه‌های باکتریایی جدا شده از محیط‌های بیمارستانی و عفونی مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت. با استفاده از این پرایمرها می‌توان به طور مستقیم باکتری را در نمونه های کلینیکی به وسیله روش PCR شناسایی نمود.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی ٤٠ سویه بیمارستانی باکتری سودوموناس آئروژینوزا دریافت شده از دو بیمارستان شهید مطهری و خاتم الانبیاء تهران مورد بررسی قرار گرفتند. سویه‌های مورد نظر بر اساس روش‌های استاندارد با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی شامل رشد بر روی محیط ستریماید آگار، تست سیترات و اکسیداز، رشد در دمای ٤٢ درجه سانتی‌گراد، بررسی تخمیر بر روی TSI شناسایی شدند(١٩ و ٢٠).

ژنوم ٤٠ سویه بیمارستانی باکتری سودوموناس آئروژینوزا و سویه استاندارد باکتری (ATCC 27853) با استفاده از کیت استخراج ژنوم شرکت BiO NEER (کره جنوبی) استخراج گردید. مقدار و خلوص DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ (شرکت Thermo) اندازه‌گیری شد. جهت ارزیابی اختصاصیت واکنش PCR از ژنوم باکتری‌های *اشرشیاکولی*، *ویبریو کلرا*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *کلبسیلا* پونومونیه نیز به عنوان کنترل منفی استفاده گردید.

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 5:20 +0330 on Monday November 19th 2018

با توجه به اختصاصی بودن ژن LasI در سودوموناس آئروژینوزا این ژن جهت شناسایی سریع باکتری انتخاب شد. توالی ژن مذکور از بانک ژن استخراج شد (۳٦) و دو پرایمر پیشرو و پیرو بر اساس توالی این ژن و شاخصه‌های مورد اشاره با استفاده از نرم افزارهای DNAsis و Oligo طراحی و بررسی شدند. سپس پرایمر های طراحی شده (جدول ۱) با استفاده از سرویس BLAST مورد ارزیابی قرار گرفتند تا از اختصاصی بودن آنها اطمینان حاصل شود.

واکنش PCR جهت تکثیر ژن LasI طبق مراحل مورد نظر انجام شد. برای انجام این فرآیند در حجم ۵۰ میکرولیتر از محلول واکنش، ۵ میکرولیتر بافر ۱۰X، ۰/۲ میلی مولار از هر dNTP، ۱/۵ میلی‌مولار کلرید منیزیم، ۰/۵ میکرومولار از هر کدام از پرایمرها، یک واحد از آنزیم Taq پلیمراز و ۱۰۰ نانوگرم از ژنوم سودوموناس آئروژینوزا استفاده گردید. جهت تست کنترل عدم آلودگی نیز آب دیونیزه استریل به جای محلول حاوی ژنوم مورد استفاده قرار گرفت. پس از آماده‌سازی مخلوط فوق در تیوب‌های مخصوص، فرآیند PCR در دستگاه ترموسایکلر اپندورف شامل ۵ دقیقه ۹۵ درجه سلسیوس، به دنبال آن ۳۰ سیکل که هر دوره سیکل شامل؛ ۳۰ ثانیه دمای ۹۵ درجه سلسیوس ،۳۰ ثانیه دمای ۵۸ درجه سلسیوس برای واسرشتگی و ۳۰ ثانیه دمای ۷۲ درجه سلسیوس جهت تکثیر و در نهایت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس بود. پس از اتمام فرآیند PCR با استفاده از الکتروفورز نتایج بر روی ژل آگارز یک درصد مورد ارزیابی قرار گرفت. از مارکر مولکولی SM0333 (Fermentase) برای تعیین اندازه قطعه تکثیر شده استفاده گردید.

همان طور که قبلاً عنوان گردبد جهت بررسی اختصاصیت PCR از ژنوم باکتری‌های *اشرشیاکولی* و *ویبریو کلرا* و همچنین باکتری‌های گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* و *کلبسیلا پونومونیه* به عنوان الگو استفاده گردید. واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی طراحی شده برای ژن LasI و طبق شرایط واکنش مربوط به باکتری سودوموناس آئروژینوزا انجام شد. محصول PCR بر روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شد و پس از رنگ آمیزی با رنگ ریما (شرکت طیف آرا)، ژل جهت وجود محصولات احتمالی مورد ارزیابی قرار گرفت.

برای تعیین حساسیت ابتدا غلظت ژنوم هر یک از سویه‌ها با استفاده از دستگاه نانودراپ اندازه گیری شد و پس از تهیه غلظت ژنومی یکسان از نمونه‌ها رقت‌های متوالی از ژنوم‌ها با استفاده از آب مقطر استریل و از غلظت $۱۰^{-۱}$ تا $۱۰^{-٦}$ تهیه گردید و واکنش PCR طبق شرایط اشاره شده در قبل برای ژنوم هر کدام از این نمونه‌ها و در رقت‌های مورد اشاره انجام شد. البته در برخی از مطالعات حساسیت آزمون PCR جهت شناسایی نمونه‌های باکتریایی را بر اساس میزان تشابه بین نتایج به دست آمده از روش استاندارد کشت و PCR ارزیابی می‌کنند. در این حالت اگر نتایج مثبت به دست آمده کاملاً منطبق با نتایج

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 5:20 +0330 on Monday November 19th 2018

مثبت حاصل از روش استاندارد کشت باشد حساسیت آزمون PCR، ۱۰۰ درصد خواهد بود.

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون آماری تی، تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

تمامی سویه‌های دریافت شده با استفاده از محیط کشت و تست‌های بیوشیمیایی اختصاصی عنوان شده در بخش روش‌ها مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج به دست آمده تأیید کننده تمامی نمونه‌ها به عنوان باکتری سودوموناس آئروژینوزا بود.

پس از بهینه‌سازی شرایط واکنش و انجام PCR با استفاده از ژنوم سویه‌های تأیید شده به روش استاندارد، محصول بر روی ژل آگارز الکتروفورز شد. همان طور که در تصویر شماره ۱ مشخص است باند مورد انتظار که حاصل تکثیر ژن LasI است و حدود ۶۰۰bp می‌باشد، در مقایسه با باندهای نشانگر اندازه در محل مناسب بر روی ژل آگارز مشاهده می‌شود. حضور این باند تأیید کننده صحت واکنش می‌باشد. در تصویر شماره ۲ نیز نتیجه آزمون PCR برای تعدادی از نمونه‌های بالینی نشان داده شده است.

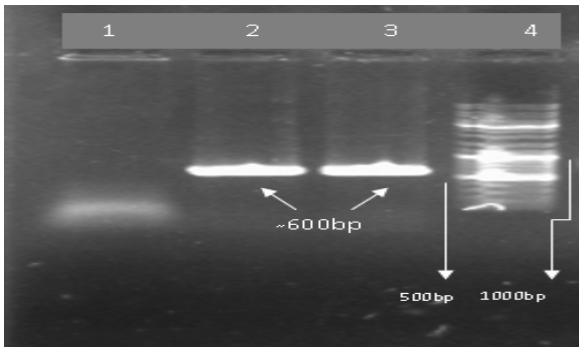
به منظور تعیین اختصاصیت واکنش طراحی شده برای ژن LasI باکتری سودوموناس آئروژینوزا، پس از انجام فرآیند PCR با استفاده از ژنوم باکتری های کنترل (منفی) به عنوان الگو (*اشرشیا کولی*، *ویبریو کلرا*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *کلبسیلا پونومونیه*) و پرایمرهای اختصاصی ژن مورد نظر، محصولات واکنش بر روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شدند. تصویر شماره ۳ این ژل را نشان می‌دهد، در ستون‌های مربوط به ژنوم باکتری‌های کنترل هیچ باندی بر روی ژل مشاهده نمی‌شود. این امر نمایانگر ویژگی و اختصاصیت بالای پرایمرها برای ژن LasI باکتری سودوموناس آئروژینوزا می‌باشد.

پس از انجام فرآیند PCR با استفاده از سریالی از ژنوم رقیق شده($۱۰^{-۱}$ تا $۱۰^{-۶}$) سویه‌های مورد بررسی و طبق شرایط توضیح داده شده در قسمت روش بررسی، کمترین غلظتی از ژنوم سویه‌ها که باند مشخصی بر روی ژل ایجاد کرد رقت $۱۰^{-۵}$ بود که معادل ۸۰۰ فمتوگرم می‌باشد. تصویر شماره ۴ ژل آگارز حاصل از الکتروفورز محصولات این واکنش را نشان می‌هد. همان طور که مشخص است باند ۶۰۰bp تا غلظت $۱۰^{-۵}$ وجود دارد. هم‌چنین با توجه به نتایج به دست آمده از آزمون شناسایی نمونه‌های بالینی به روش کشت و نتایج آزمون PCR برای این نمونه‌ها و یکسان بودن نتایج در هر دو روش برای تمامی نمونه‌ها(٤٠ نمونه مورد ارزیابی) حساسیت آزمون PCR، ۱۰۰ درصد بود.

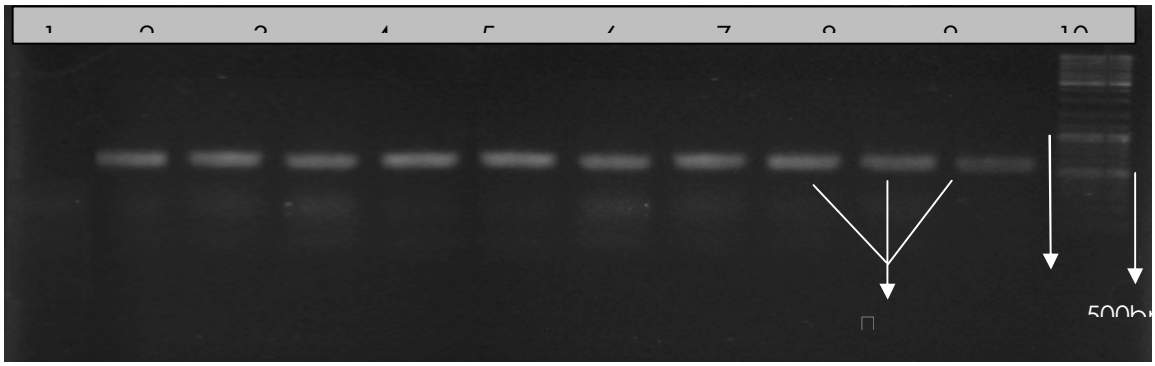
Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 5:20 +0330 on Monday November 19th 2018

جدول ۱: توالی و مشخصات پرایمرهای طراحی شده بر اساس توالی ژن LasI

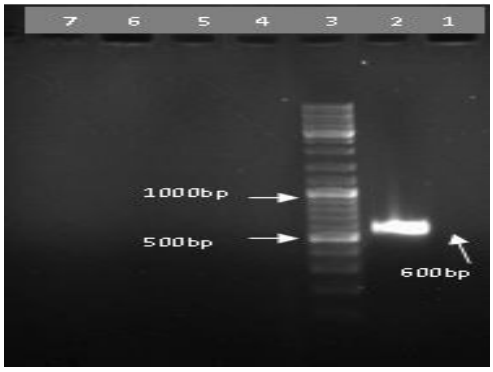
پرایمر	توالی	TM
پیشرو	5´-ATGATCGTACAAATTGGTCGG-3´	۶۱°C
پیرو	5´-GTCATGAAACCGCCAGTC-3´	٦۰°C



تصویر ۱: محصول PCR ژن LasI بر روی ژل آگارز. ستون۱؛ کنترل منفی (حاوی آب مقطر استریل به جای ژنوم الگو)، ستون۲؛ محصول PCR با استفاده از واکنش بهینه شده و ژنوم سویه استاندارد(*P. aeruginosa* ATCC 27853) کنترل مثبت، ستون۳؛ محصول PCR با استفاده از واکنش بهینه شده و ژنوم سویه بالینی، ستون٤ ؛ نشانگر DNA

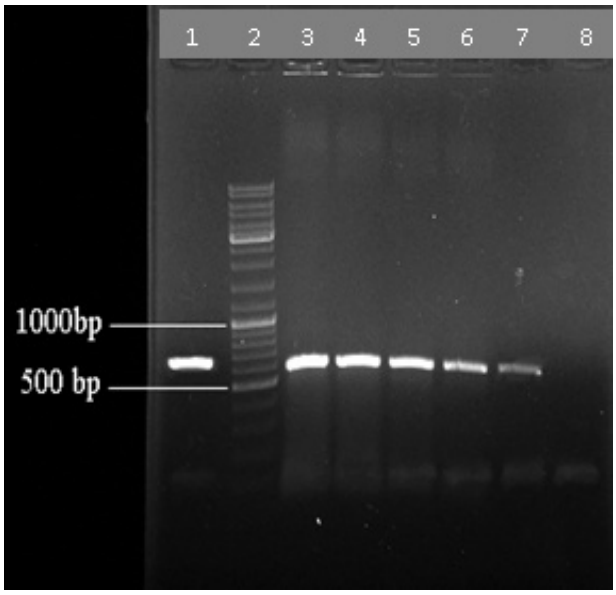


تصویر ۲: محصول PCR ژن LasI بر روی ژل آگارز برای ژنوم تعدادی از نمونه های بالینی باکتری. ستون۱؛ کنترل منفی (حاوی آب مقطر استریل به جای ژنوم الگو)، ستون۲ تا ۱۰؛ محصول واکنش PCR با استفاده از ژنوم چندین نمونه بالینی، ستون ۱۱؛ محصول واکنش PCR با استفاده از ژنوم سویه استاندارد (*P. aeruginosa* ATCC 27853) (کنترل مثبت)، ستون۱۲ ؛نشانگر DNA



تصویر ۳: محصول ژل الکتروفورز تعیین اختصاصیت واکنش PCR، ستون ۱؛کنترل منفی (حاوی آب مقطر استریل به جای ژنوم الگو)، ستون۲؛ کنترل مثبت (محصول PCR با استفاده از ژنوم سویه استاندارد (*P. aeruginosa* ATCC 27853)، ستون ۳؛ نشانگر اندازه، ستون٤؛ نتیجه PCR با استفاده از ژنوم *استافیلوکوکوس اورئوس*، ستون ٥؛ نتیجه PCR با استفاده از ژنوم *اشرشیا کولی*، ستون ٦؛ نتیجه PCR با استفاده از ژنوم *کلبسیلا پنومونیه*، ستون ۷ ؛ نتیجه PCR با استفاده از ژنوم *ویبریو کلرا*

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 5:20 +0330 on Monday November 19th 2018



تصویر ۴: محصول ژل الکتروفورز تعیین حساسیت واکنش PCR. ستون ۱؛ کنترل مثبت (محصول PCR با استفاده از غلظت استاندارد ژنوم باکتری)، ستون ۲؛ نشانگر اندازه، ستون ۳؛ غلظت $۱۰^{-۱}$ ، ستون ٤؛ غلظت $۱۰^{-۲}$، ستون ٥؛ غلظت $۱۰^{-۳}$ ، ستون ٦؛ غلظت $۱۰^{-٤}$ ، ستون ۷ ؛ غلظت $۱۰^{-٥}$ و ستون ۸ ؛ غلظت $۱۰^{-٦}$ می‌باشد.

بحث

باکتری سودوموناس آئروژینوزا یکی از عوامل مهم در مرگ و میر ناشی از عفونت‌های ثانویه می‌باشد. در این عفونت‌ها گاهی کلونیزه شدن باکتری در بدن بیمار و عدم پاسخ ایمونولوژیک مناسب و به موقع سبب می‌گردد بیمار وارد مرحله باکتریمی و سپس سپسیس شده که نهایتاً مرگ بیمار را در پی دارد، بنابراین تشخیص به موقع همراه با اختصاصیت و حساسیت مناسب نسبت به عامل عفونی به منظور انتخاب مسیر درمانی مناسب از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (۲۲ و۲۱). روش‌های شناسایی بر پایه تکنیک‌های استاندارد شامل رشد بر روی محیط کشت و جداسازی، آزمون‌های بیوشیمیایی و سرولوژیکی می‌باشد، اما با این حال ردیابی باکتری در نمونه‌های بالینی با استفاده از این روش‌ها مشکل و وقت‌گیر بوده و به چند روز زمان نیاز دارد(۲۳). روش‌های ایمونولوژیکی نیز از حساسیت کافی برخوردار نمی‌باشند و در صورت بروز برخی از موارد آلودگی حاد که نیاز به عملکرد فوری است این روش‌ها قابل اطمینان نیستند. هم‌چنین در این روش ها ممکن است در صورت آلودگی نمونه با گونه‌های باکتریایی دیگر، به علت ایجاد تداخل در رشد باکتری مورد نظر نتایج منفی حاصل شود. همان‌طور که قبلاً اشاره شد روش‌های تشخیص ملکولی که بر اساس آن وجود ژن‌های منحصر به فردی از باکتری سودوموناس آئروژینوزا به عنوان هدف مورد ارزیابی قرار می‌گیرند طراحی شده که طبق آن می‌توان این باکتری را از سایر گونه‌ها متمایز نمود(۲٤). برای این منظور از

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 5:20 +0330 on Monday November 19th 2018

تکنیک‌های مولکولی مختلفی مانند Real time PCR، PCR و LAMP [1] استفاده می‌شود(۲۶ و۲۵)، که در این میان تکنیک PCR به علت در دسترس بودن، آسانی و دارا بودن هزینه پایین تر به طور گسترده‌تری در آزمایش‌های تشخیصی آزمایشگاهی و کلینیکی به کار گرفته شده است(۲۷). این روش در مقایسه با روش های فنوتیپی بسیار دقیق تر بوده و نسبت به تغییرات محیطی کمتر تحت تأثیر قرار می‌گیرد.

برای اولین بار در سال ۱۹۹٤ خان و سرنیگلیا شناسایی این باکتری را با استفاده از PCR و ژن اگزوتوکسین A (toxA) مورد ارزیابی قرار دادند که همانطور اشاره شد در مقایسه با نتایج شناسایی با روش های کشت دارای حساسیت ۹۵ درصد می باشد(۲۸). در ۱۹۹۷ دی ووس و همکاران شناسایی باکتری سودوموناس آئروژینوزا را به روش PCR با استفاده از پرایمرهای طراحی شده بر اساس توالی دو ژن لیپوپروتئین سطحی(oprI و oprL) مورد بررسی قرار دادند، که نتایج نشان دهنده اختصاصیت و حساسیت پرایمرهای طراحی شده به ترتیب به میزان ۷٤ درصد و $۱۰^{۲}$ سلول بر میلی‌لیتر جهت شناسایی این باکتری در نمونه های بالینی بود (۲۹). در سال ۱۹۹۹ نیز داسیلوا فیلهو و همکاران شناسایی باکتری سودوموناس آئروژینوزا در نمونه‌های بالینی استخراج شده از بیماری مبتلا به سیستیک فیبروزیس را با استفاده از پرایمرهای طراحی شده برای ژن algD GDP mannose به وسیله PCR بررسی نمودند. در این مطالعه اختصاصیت و حساسیت پرایمرهای طراحی شده به ترتیب به میزان ۱۰۰ درصد و تا ۱۰۰ پیکوگرم از DNA باکتری (معادل ۸×۱۰^{۳} سلول باکتریایی) گزارش شده است که در مقایسه با پرایمرهای طراحی شده در این مطالعه (شناسایی ۸۰۰ فمتوگرم DNA باکتری) حساسیت بسیار کمتری را نشان می‌دهند (۳۰). در دهه ۲۰۰۰ تا ۲۰۱۰ میلادی نیز مطالعات گسترده‌ای به منظور ارایه یک کاندید ژنی مناسب به منظور شناسایی باکتری سودوموناس آئروژینوزا با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و حساس در نمونه‌های بالینی ارایه شده است، که در تعداد معدودی از آنها اختصاصیت ۱۰۰ درصد همراه با حساسیت بالا گزارش شده است. بر اساس این مطالعات با استفاده از PCR اختصاصی ژن‌های gyrB و 16S-23S rDNA ITS می‌توان باکتری سودوموناس آئروژینوزا را با اختصاصیت ۱۰۰ درصد از سایر گونه‌ها و جنس‌ها جداسازی و شناسایی نمود در صورتی که برای ژن‌های 16s rDNA, toxA, oprL, oprI و fliC این میزان اختصاصیت وجود ندارد(۱۲، ۳۱ و۳۲).

در تمامی‌این مطالعات ایجاد اختصاصیت لازم اگرچه یک اصل می‌باشد، اما بهبود حساسیت آزمون PCR جهت افزایش امکان شناسایی کمترین تعداد باکتری مولد بیماری بسیار ضروری به نظر می‌رسد. طبق این مطالعات فاکتورهای متنوعی مانند نحوه نمونه‌گیری، شیوه جداسازی DNA، شرایط PCR،

1-Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 5:20 +0330 on Monday November 19th 2018

شرایط فیزیکوشیمیایی پرایمر مانند احتمال ایجاد دایمریزاسیون، تشکیل ساختارهای سنجاق سری و ساختار سه بعدی DNA هدف می‌توانند حساسیت روش شناسایی براساس PCR را تحت تأثیر قرار دهند، اما در این میان بیشترین اطلاعات گزارش شده تأیید کننده اهمیت پرایمر به منظور افزایش اختصاصیت و حساسیت روش می‌باشد (۲۹ و۲۲). هم‌چنین در بسیاری از تحقیقات انجام گرفته جهت شناسایی اختصاصی باکتری سودوموناس آئروژینوزا با استفاده از PCR ، ردیابی ژن‌های بیماری‌زا و ژن‌های کد کننده پروتئین‌های سطحی که عامل تهاجم می‌باشند، بیشتر مورد توجه قرار گرفته‌اند، چرا که استفاده از ژن‌هایی که برای سودوموناس آئروژینوزا اختصاصی بوده و هم‌چنین در شروع و ایجاد بیماری به وسیله این باکتری نقش مؤثری داشته باشند، جهت جلوگیری از بروز نتیجه کاذب منفی خطر ساز ضروری به نظر می‌رسد، لذا با توجه به این نکات و نیز با توجه به این که فاکتورهای بیماری‌زای خارج سلولی ترشح شده به وسیله سودوموناس آئروژینوزا مسئول تمام عفونت‌های ایجاد شده به وسیله این باکتری می‌باشند(۳٤ و۳۳)، ژن LasI که در بیماری‌زایی این باکتری دارای نقش کلیدی و کنترل کننده می‌باشد به عنوان یک کاندید قابل توجه هم از نظر نقش محوری در بیماری‌زایی و نیز به دلیل حساسیت پذیری و اختصاصیت انتخاب گردید(۳۵ و ۳۴).

با توجه به توالی ژن LasI آغازگرهای مختلفی با استفاده از نرم افزارهای بیوانفورماتیکی طراحی گردید و با توجه به اختصاصیت آغازگری که بالاترین امتیاز را به خود اختصاص داد، توالی مورد نظر انتخاب شد و در پایگاه‌های اطلاعاتی داده‌های ژنومی(ColiBASE ،NCBI) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج BLAST [1] نشان داد، که پرایمر طراحی شده برای ژن LasI در ناحیه این ژن در ژنوم تمامی سویه‌های باکتری سودوموناس آئروژینوزا موجود در بانک NCBI و بانک ژنی اختصاصی این باکتری دارای ناحیه مکمل ۱۰۰ درصد و کاملاً اختصاصی بوده و فاقد هیچ‌گونه ناحیه مشابه حتی به صورت ناقص در گونه‌های دیگر سودوموناس و جنس‌های دیگر باکتریایی می‌باشد. [۱]

از بین ۴۰ سویه بیمارستانی باکتری سودوموناس آئروژینوزا که با استفاده از PCR اختصاصی مورد ارزیابی قرار گرفتند، نتیجه تکثیر برای ژن LasI در تمامی نمونه ها مثبت بود که منطبق با نتایج حاصل از بررسی به روش کشت و تست‌های بیوشیمیایی برای این نمونه‌ها بود، هم‌چنین در بین سویه‌های مورد بررسی نمونه‌ای با نتیجه منفی مشاهده نشد. لذا با توجه به این نتایج تمامی سویه‌ها واجد ژن LasI بودند و این سویه‌ها برای ژن LasI اختصاصیت ۱۰۰ درصد را نشان دادند. هم‌چنین با بهینه‌سازی شرایط واکنش PCR زمان انجام این واکنش به کمتر از یک ساعت تقلیل یافت.

نتیجه‌گیری

نتایج تحقیق حاضر در مقایسه با نتایج قبلی نشان داد، ژن انتخاب شده می‌تواند به عنوان یک

1-Basic Local Alignment Search Tool(BLAST)

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 5:20 +0330 on Monday November 19th 2018

ناحیه ژنی مناسب و قابل اتکا برای تحقیقات اپیدمیوژیکی، ارزیابی پایش‌های منطقه‌ای به منظور دستیابی به الگوی شیوع و فراگیری باکتری سودوموناس آئروژینوزا مورد استفاده قرار گیرد. در پایان باید اشاره کرد که با توجه به مزایای روش‌های ملکولی، به کارگیری این روش‌ها در شناسایی باکتری‌های مولد عفونت‌های بیمارستانی از جمله سودوموناس آئروژینوزا می‌تواند راهی سریع و مهم در تشخیص عامل عفونت، میزان آن (دوز عفونت) و در نتیجه انتخاب روش صحیح درمان و جلوگیری از عوارض بیشتر عفونت در بیماران باشد. به علاوه تشخیص عوامل مؤثر در پاتوژنتیسیتی سودوموناس آئروژینوزا می‌تواند در انتخاب روش‌های پیشگیری و درمان مناسب عفونت‌های مختلف سودوموناس کاربرد ویژه و منحصر به فردی داشته باشد.

تقدیر و تشکر

این طرح پژوهشی با حمایت مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌اله (عج) انجام شد.

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 5:20 +0330 on Monday November 19th 2018

REFERENCES

1.Palleroni NJ. The Pseudomonas story. Environ microbiol 2010; (6)12: 1377-83.
2.Moore NM, Flaws ML. Epidemiology and pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infections. Clin Lab Sci 2011; 24(1):43-6.
3.Driscoll JA, Brody SL, Kollef MH. The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. Drugs 2007; 67(3):351-68.
4.Qin X, Emerson J, Stapp J, Stapp L, Abe P, Burns JL. Use of real-time PCR with multiple targets to identify *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermenting gram-negative bacilli from patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol 2003; 41(9): 4312-7.
5.Khan AA, Cerniglia CE. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* from clinical and environmental samples by amplification of the exotoxin A gene using PCR. Appl Environ Microbiol 1994; 60(10): 3739-45.
6.Ranjbar R, Hosseini Doust SR. A Reveiw of Molecular methods Used for Epidemiological Studies of biological agent. J Mili Med 2003; 5(2) :157-64.
7.Pirnay JP, De Vos D, Duinslaeger L, Reper P, Vandenvelde C, Cornelis P, et al. Quantitation of *Pseudomonas aeruginosa* in wound biopsy samples: from bacterial culture by rapid 'real-time' polymerase chain reaction. Crit Care 2000; 4(4): 255-61.
8.Hogardt M, Trebesius K, Geiger AM, Hornef M, Rosenecker J, Heesemann J. Specific and Rapid Detection by Fluorescent In Situ Hybridization of Bacteria in Clinical Samples Obtained from Cystic Fibrosis Patients. J Clin Microbiol 2003; 38(2): 818–25.
9.Clifford RJ, Milillo M, Prestwood J, Quintero R, Zurawski DV, Kwak YI, Waterman PE, Lesho EP. Detection of bacterial 16S rRNA and identification of four clinically important bacteria by real-time PCR. PLoS One 2012; 7(11):e48558.
10.Anuj SN, Whiley DM, Kidd TJ, Bell SC, Wainwright CE, Nissen MD, Sloots TP. Identification of *Pseudomonas aeruginosa* by a duplex real-time polymerase chain reaction assay targeting the ecfX and the gyrB genes. Diagn Microbiol Infect Dis 2009 Feb; 63(2):127-31.
11.Cornelis P, De Vos D, Lim A, Pirnay JP, Struelens M, Vandenvelde Ch, et al. Direct detection and identification of *Pseudomonas aeruginosa* in clinical samples such as skin biopsy specimens and expectorations by Multiplex PCR based on two outer membrane genes, oprI and oprL. J Clin Microbiol 1997; 35(6):1295–99.
12.Lavenir R, Jocktane D, Laurent F, Nazaret S, Cournoyer B. Improved reliability of *Pseudomonas aeruginosa* PCR detection by the use of the specific ecfx gene target. J Microbiol Methods 2007; 2007; 70(1): 20-9.
13.Antunes LC, Ferreira RB, Buckner MM, Finlay BB. Quorum sensing in bacterial virulence. Microbiol 2010; 156(Pt 8):2271-82.
14.Whitehead NA, Barnard AM, Slater H, Simpson NJ, Salmond GP: Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. FEMS Microbiol Rev 2001; 25(4):365-404.
15.Galloway WR, Hodgkinson JT, Bowden SD, Welch M, Spring DR. Quorum sensing in Gram-negative bacteria: small-molecule modulation of AHL and AI-2 quorum sensing pathways. Chem Rev 2011; 111(1): 28-67.
16.Cheristian Van Delden BHI. Cell-to-Cell Signaling and Pseudomonas aeruginosa Infections. Emerg Infect Dis 1998; 4(4):10.
17.Venturi V. Regulation of quorum sensing in Pseudomonas. FEMS Microbiol Rev 2006; 30(2):274-291.
18.Jamshidian M, Basami MR. Bioinformatic Tools and Primer Design Guidance in PCR Base Thecincs. The 4th National Biotechnology Congress; Kerman 2005.
19.Howard BJ, Klaas J, Rubin SJ, Weissfeld A, Tilton RC. Clin Pathol Microbiol. Toronto: The CV. Mosby Co; 1987.
20.Winn WC, Allen SD, Janda W, Koneman EW, Procop GW, Schreckenberger PC. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2006.
21.Winstanley C. Flagellin gene and protein variation amongst clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiol 1996; 142 (8): 2145-51.

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 5:20 +0330 on Monday November 19th 2018

22.Arora SK. Identification of two distinct types of flagellar cap proteins, FliD, in *Pseudomonas aeruginosa*. Infect immun 2000; 68(3): 1474-9.
23.Tramper-Stranders GA, vander CK, Wolfs TF. Detection of Pseudomonas aeruginosa in patients with cystic fibrosis. J cyst fibros. Official Journal Of The European Cystic Fibrosis Society 2005; 4(2): 37- 43.
24.Holder IA, Wheeler R, Montie TC. Flagellar preparations from *Pseudomonas aeruginosa*: animal protection studies. Infect Immun 1982; 35(1): 276-80.
25.Shi H. A universal primer multiplex PCR method for typing of toxinogenic *Pseudomonas aeruginosa*. Appl microbiol biotech 2012; 95(6): 1579-87.
26.Zhang YC. Pathogen diagnosis of children sepsis by LAMP technology. Asian Pacific j Tropical Med 2013; 6(3): 242-5.
27.Choi HJ. Improved PCR for identification of *Pseudomonas aeruginosa*. Appl Microbiol Biotech 2013; 97(8): 3643-51.
28.Khan AA, Cerniglia CE. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* from clinical and environmental samples by amplification of the exotoxin A gene using PCR. Appl Environ Microbiol 1994; 60(10): 3739-45.
29.De Vos D, Lim A, Pirnay JP, Struelens M, Vandenvelde C, Duinslaeger L, et al. Direct Detection and Identification of *Pseudomonas aeruginosa* in Clinical Samples Such as Skin Biopsy Specimens and Expectorations by Multiplex PCR Based on Two Outer Membrane Lipoprotein Genes, oprl and oprL. J Clin Microbiol 1997;12(3): 1295-9.
30.Dasilva Filho LVF, Levi JE, Bento CNA, Dasilva Ramos SRT, Rozov T. PCR identification of *Pseudornonas aeruginosa* and direct detection in clinical samples from cystic fibrosis patients. J Med Microbiol 1999; 48: 357-61.
31.Spilker T. PCR-based assay for differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other Pseudomonas species recovered from cystic fibrosis patients. J Clin Microbiol 2004; 42(5): 2074-9.
32.Deschaght P, Vandaele S, Baets FD, Vaneechoutte M. CR and the detection of *Pseudomonas* aeruginosa in respiratory samples of CF patients A literature review. J Cyst Fibros 2011; 10: 293–7.
33.Ellis JM, Kuti JL, Nicolau DP. Use of Monte Carlo simulation to assess the pharmacodynamics of beta-lactams against *Pseudomonas aeruginosa* infections in children: a report from the OPTAMA program. Clin Therap 2005; 27(11): 1820-30.
34.Driscoll JA, Brody SL, Kollef MH. The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. Drugs 2007; 67(3): 351-68.
35.Glessner A. Roles of *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl quorum-sensing systems in control of twitching motility. J Bacter 1999; 181(5):1623-9.
36. Psedumonas Genome Database, Database Search; www.pseudomonas.com.

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 5:20 +0330 on Monday November 19th 2018

Rapid Detection of *Pseudomonas Aeruginosa* by PCR Method Using Specific Primers of Quorum Sensing LasI gene

Aghamollaei H[1], Azizi Barjini K[2], Moosazadeh Mogaddam[1*]

[1]Applied Biotechnology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran, [2]Department of Molecular Biology, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

Received:13 Aprl 2013 Accepted: 08 June 2013

Abstract

Background & aim: Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic nosocomial pathogen that due to having intrinsic and acquired resistance to common antibiotics, mortality due to infections is very common. Therefore, early and accurate identification of bacteria could be effective in controlling infections and deaths. The aim of this study was to evaluate the use of a rapid method with high sensitivity and specificity based on polymerase chain reaction using gene-specific primers quorum sensing LasI system for detection of bacteria.

Methods: In this study, the comparison between the results of culture and PCR for the diagnosis of Pseudomonas aeruginosa in clinical samples and other bacterial species were carried out. 40 strains of Pseudomonas aeruginosa from isolated clinical specimens were identified and confirmed by biochemical tests. LasI gene specific primers were designed using bioinformatics analysis. Sequence of this gene was amplified techniques after extraction of bacterial genome. The specificity of PCR tests with DNA from of different species, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumonia, Escherichia coli and Vibrio cholerae were evaluated. A different dilution of the bacterial genome of Pseudomonas aeruginosa was used in PCR to evaluate the sensitivity of primer. Data were analyzed by t-test

Results: The results indicated that the PCR test result was positive for all strains of P. aeruginosa isolates; however, PCR test results were negative for the four other bacteria. Even at 10^{-5} *Pseudomonas aeruginosa* genome concentration, PCR test was positive for all isolated strains

Conclusion: This study showed that the primers designed for detection of Pseudomonas aeruginosa using PCR, had higher sensitivity and specificity compared to previous methods.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa,* PCR, Quorum sensing, LasI

[*]**Corresponding Auther:** Moosazadeh Moghaddam M, Applied Biotechnology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
Email: mm.genetics@gmail.com