

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^{۳*}

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

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۳/۱۸

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱/۲۴

چکیده

زمینه و هدف: سودوموناس آئروژینوزا یک باکتری پاتوژن فرصت طلب بیمارستانی است که به علت دارا بودن مقاومت ذاتی و اکتسابی به آنتی بیوتیک‌های معمول مرگ و میر ناشی از عفونت‌های آن بسیار شایع می‌باشد لذا شناسایی سریع و دقیق باکتری می‌تواند 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 پلی‌مرز 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 ۴۰ 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 ویبریولکرا مورد ارزیابی قرار گرفت. از رقت‌های 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 تمامی سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا جدا شده، آزمون PCR دارای نتیجه مثبت بود. هم‌چنین تا غلظت $10^{-۶}$ از ژنوم باکتری سودوموناس آئروژینوزا 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 روش‌های 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

مقدمه

سرّيع عفونت‌های ناشی از آن هنوز به عنوان یکی از مهم‌ترین شاخصه‌ها از اهمیت بالایی برخوردار است. در حال حاضر اگرچه استفاده از روش‌های میکروپشناسی 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 کمی از باکتری) سبب بروز جواب کاذب منفی می‌گردد (۴).^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 مرز (PCR) و FISH^(۱) به علت سریع و قابل اعتماد بودن بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند (۵-۸). در همه این روش‌ها ژن‌های خاصی به عنوان هدف مورد استفاده قرار می‌گیرند که از مهم‌ترین آنها می‌توان به ژن‌های مربوط به 16S rDNA internally transcribed، 16S rDNA

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، ۱۶ درصد از بیماران مبتلا به ذات‌الریه 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 (۲ و ۳).

بر این اساس شناسایی سریع و به موقع باکتری جهت شروع تیمار آنتی‌بیوتیکی و درمان

1-Fluorescent in Situ Hybridization(FISH)

داشتن حساسیت بالا، برای سودوموناس آئروژینوزا اختصاصی بوده و در بیماری‌زایی سودوموناس نیز نقش مؤثری داشته باشد تا بر این اساس از بروز نتیجه کاذب منفی خطر ساز جلوگیری شود ضروری به نظر می‌رسد. مطالعات نشان داده است بیان اکثر ژن‌های تولید کننده فاکتورهای بیماری‌زای باکتری سودوموناس آئروژینوزا به وسیله یک سیستم ژنی به نام سیستم Quorum Sensing (QS) کنترل و تنظیم می‌گردند (۱۵-۱۲). در این باکتری سیستم QS از ۲ سیستم ژنی LasR-LasI و RhlR-RhlI تشکیل شده است، ژن‌های LasI و RhlI بیان کننده دو آنزیم acyl-hsl (acyl-HSL) homoserine lactone سنتاز می‌باشند، در حالی که ژن‌های LasR و RhlR تولید کننده پروتئین‌های تنظیم کننده رونویسی می‌باشند که با اتصال به سیگنال اختصاصی خود سبب فعال‌سازی ژن‌های هدف (بیماری‌زا) می‌شوند (۱۶). سیستم QS در دیگر گونه‌های سودوموناس نیز وجود دارد، اما تعداد و توالی ژن‌های تشکیل دهنده آنها متفاوت می‌باشد (۱۷)، لذا ژن‌های سیستم کروم سنسینگ در باکتری سودوموناس آئروژینوزا علاوه بر دخالت در بیماری‌زایی، یک ژن اختصاصی گونه بوده که می‌توان با طراحی پرایمر اختصاصی ژن‌های آن، با حساسیت و اختصاصیت بسیار بالای سودوموناس آئروژینوزای بیماری‌زا را به طور ملکولی و سریع با استفاده از روش PCR شناسایی نمود.

(ITS) oprL، gyrB، fliC، spacer، oprI، toxA و oprL اشاره نمود (۹-۱۱ و ۵). این ژن‌ها حساسیت بالایی در شناسایی سودوموناس دارند، اما به غیر از ژن toxA که اختصاصی سودوموناس آئروژینوزا می‌باشد، دیگر ژن‌ها با اختصاصیت کمی در دیگر سویه‌های سودوموناس نیز قابل شناسایی می‌باشند؛ به عنوان مثال محصول واکنش PCR ژن oprI در سویه‌های دیگر سودوموناس مانند *P. fragi*، *P. viridiflava* و *citronellolis* قابل مشاهده است. همچنین محصول PCR ژن oprL در *P. balearica* و *P. citronellolis* محصول PCR ژن 16S rDNA در *P. fragi* و محصول PCR ژن fliC تقریباً در همه گونه‌های سودوموناس به جز *P. chlororaphis* و *P. fluorescens* دیده می‌شود (۱۲-۴)، لذا نتایج مثبت کاذب به دست آمده در PCR مربوط به ژن‌های oprL، oprI، 16S rDNA و fliC نشان‌گر حفاظت شدگی بالای این ژن‌ها در میان سویه‌های مختلف سودوموناس است که البته این امر سبب غیر معتبر بودن آنها به عنوان ژن هدف جهت شناسایی اختصاصی باکتری سودوموناس آئروژینوزا می‌شود. لذا در بیشتر آزمایش‌ها از ژن toxA برای شناسایی کلنی‌های شبیه به این باکتری استفاده می‌گردد که البته این ژن نیز دارای ضریب تشخیص ۹۵ درصد در شناسایی نمونه‌ها می‌باشد، لذا احتمال گرفتن نتایج کاذب منفی نیز وجود دارد (۱۲-۴). بنابراین، استفاده از ژنی که علاوه بر

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 نمونه‌های کلینیکی به وسیله روش PCR شناسایی نمود.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی ۴۰ 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 ۴۲ درجه سانتی‌گراد، بررسی تخمیر بر روی TSI شناسایی شدند (۱۹ و ۲۰).

ژنوم ۴۰ 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.

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 ۶۰-۴۵ می‌باشد که البته برای پرایمرهایی با GC کمتر از ۵۰ درصد لازم است تعداد بازهای پرایمر بیش از ۱۸ در نظر گرفته شود تا دمای ذوب پرایمرها (دمای مناسب بین ۵۲ تا ۵۸ درجه سانتی‌گراد) بالای حداقل دما که ۵۰ 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 ۲ نوکلئید از نوع G یا C باشند باعث کاهش قابل توجه اتصالات ثانویه غیر اختصاصی می‌شود (۱۸).

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

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 گردید جهت بررسی اختصاصیت PCR از ژنوم باکتری‌های *اشرشیاکولی* و *ویبریوکلرا* 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 10^{-1} تا 10^{-6} 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

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 (۳۶) 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 پرایمرهای 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 $10 \times$ ، ۰/۲ میلی مولار از هر dNTP، ۱/۵ میلی مولار کلرید منیزیم، ۰/۵ میکرومولار از هر کدام از پرایمرها، یک واحد از آنزیم Taq پلیمران 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

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 می دهد، در ستون های مربوط به ژنوم باکتری های کنترل هیچ باندهی بر روی ژل مشاهده نمی شود. این امر نمایانگر ویژگی و اختصاصیت بالای پرایمرها برای ژن LasI باکتری سودوموناس آئروژینوزا می باشد.

پس از انجام فرآیند PCR با استفاده از سریالی از ژنوم رقیق شده (10^{-1} تا 10^{-6}) سویه های مورد بررسی و طبق شرایط توضیح داده شده در قسمت روش بررسی، کمترین غلظتی از ژنوم سویه ها که باند مشخصی بر روی ژل ایجاد کرد رقت 10^{-6} بود که معادل ۸۰۰ فمتوگرم می باشد. تصویر شماره ۴ ژل آگارز حاصل از الکتروفورز محصولات این واکنش را نشان می دهد. همان طور که مشخص است باند ۶۰۰bp تا غلظت 10^{-6} وجود دارد. همچنین با توجه به نتایج به دست آمده از آزمون شناسایی نمونه های بالینی به روش کشت و نتایج آزمون PCR برای این نمونه ها و یکسان بودن نتایج در هر دو روش برای تمامی نمونه ها (۴۰ نمونه مورد ارزیابی) حساسیت آزمون PCR، ۱۰۰ درصد بود.

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

داده های جمع آوری شده با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون آماری تی، تجزیه و تحلیل شدند.

یافته ها

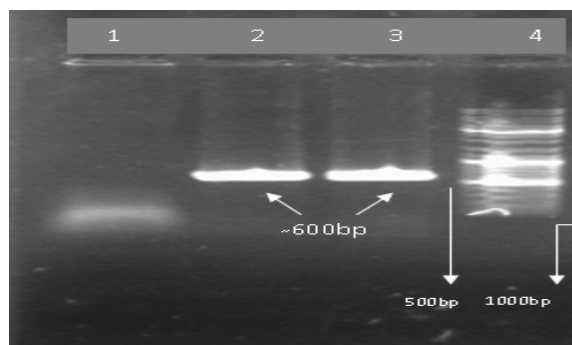
تمامی سویه های دریافت شده با استفاده از محیط کشت و تست های بیوشیمیایی اختصاصی عنوان شده در بخش روش ها مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج به دست آمده تأیید کننده تمامی نمونه ها به عنوان باکتری سودوموناس آئروژینوزا بود.

پس از بهینه سازی شرایط واکنش و انجام PCR با استفاده از ژنوم سویه های 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 می باشد، در مقایسه با باندهای نشانگر اندازه در محل مناسب بر روی ژل آگارز مشاهده می شود. حضور این باند تأیید کننده صحت واکنش می باشد. در تصویر شماره ۲ نیز نتیجه آزمون PCR برای تعدادی از نمونه های بالینی نشان داده شده است.

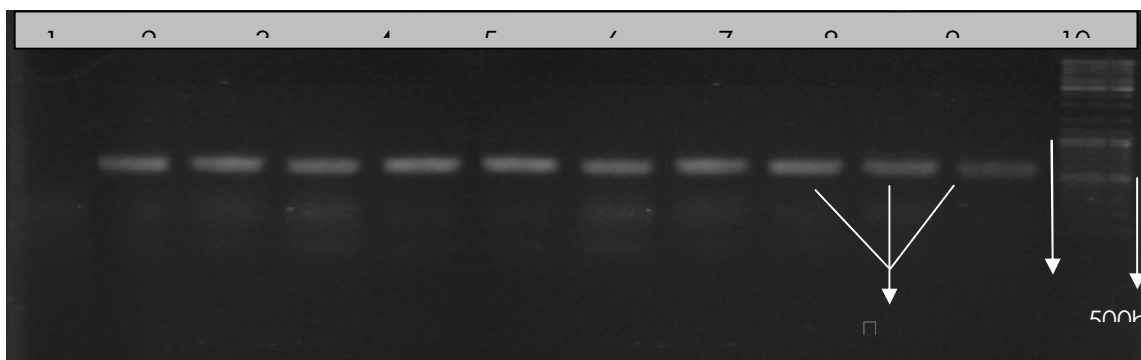
به منظور تعیین اختصاصیت واکنش طراحی شده برای ژن LasI باکتری سودوموناس آئروژینوزا،

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

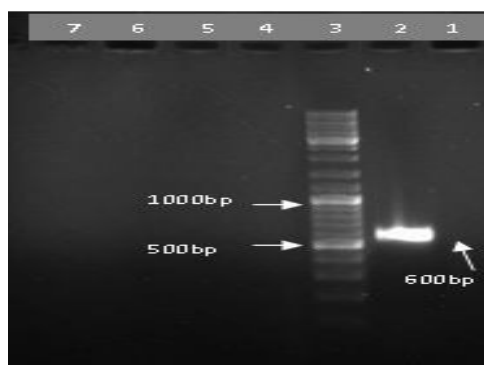
پرایمر	توالی	TM
پیشرو	5'-ATGATCGTACAAATTGGTCGG-3'	۶۱°C
پیرو	5'-GTCATGAAACCGCCAGTC-3'	۶۰°C



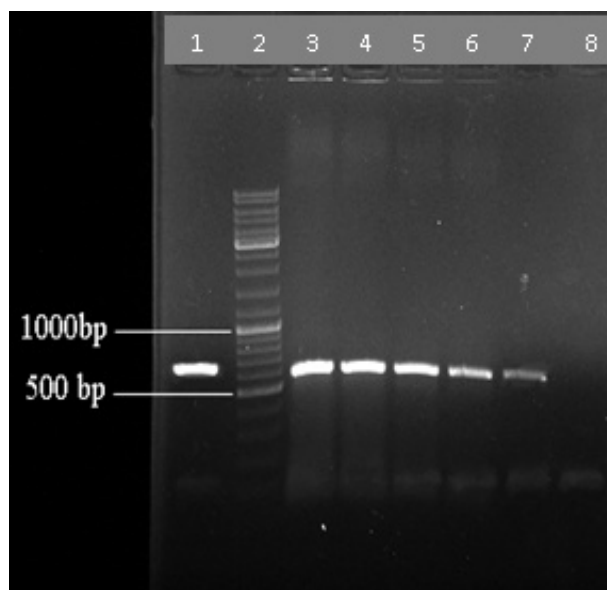
تصویر ۱: محصول PCR ژن *LasI* بر روی ژل آگارز. ستون ۱: کنترل منفی (حاوی آب مقطر استریل به جای ژنوم الگو). ستون ۲: محصول PCR با استفاده از واکنش بهینه شده و ژنوم سویه استاندارد (*P. aeruginosa* ATCC 27853) کنترل مثبت، ستون ۳: محصول PCR با استفاده از واکنش بهینه شده و ژنوم سویه بالینی، ستون ۴: نشانگر DNA



تصویر ۲: محصول PCR ژن *LasI* بر روی ژل آگارز برای ژنوم تعدادی از نمونه های بالینی باکتری. ستون ۱: کنترل منفی (حاوی آب مقطر استریل به جای ژنوم الگو). ستون ۲ 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)، ستون ۱۲: نشانگر DNA



تصویر ۳: محصول ژل الکتروفورز تعیین اختصاصیت واکنش PCR. ستون ۱: کنترل منفی (حاوی آب مقطر استریل به جای ژنوم الگو). ستون ۲: کنترل مثبت (محصول PCR با استفاده از ژنوم سویه استاندارد (*P. aeruginosa* ATCC 27853)). ستون ۳: نشانگر اندازه، ستون ۴: نتیجه PCR با استفاده از ژنوم *استافیلوکوکوس اورئوس*، ستون ۵: نتیجه PCR با استفاده از ژنوم *اشرشیا کولی*، ستون ۶: نتیجه PCR با استفاده از ژنوم *کلبسیلا پنومونیه*، ستون ۷: نتیجه PCR با استفاده از ژنوم *ویبریو کلرا*



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 10^{-1} ، ستون ۴: غلظت 10^{-2} ، ستون ۵: غلظت 10^{-3} ، ستون ۶: غلظت 10^{-4} ، ستون ۷: غلظت 10^{-5} و ستون ۸: غلظت 10^{-6} می باشد.

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 ایمنولوژیک 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 (۲۱ و ۲۲). 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 ایمنولوژیکی 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 روش‌ها 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 (۲۴). برای این منظور از

تکنیک‌های مولکولی مختلفی مانند Real time PCR، LAMP و PCR^(۱) استفاده می‌شود (۲۶ و ۲۵)، 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 روش‌های فنوتیپی بسیار دقیق تر بوده و نسبت به تغییرات محیطی کمتر تحت تأثیر قرار می‌گیرد.

برای اولین بار در سال ۱۹۹۴ خان و سرنگلیا شناسایی این باکتری را با استفاده از PCR و ژن *agoD* (توکسین A) مورد ارزیابی قرار دادند که همانطور اشاره شد در مقایسه با نتایج شناسایی با روش‌های کشت دارای حساسیت ۹۵ درصد می‌باشد (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 (*oprL* و *oprI*) مورد بررسی قرار دادند، که نتایج نشان دهنده اختصاصیت و حساسیت پرایمرهای طراحی شده به ترتیب به میزان ۷۴ درصد و 10^2 سلول بر میلی‌لیتر جهت شناسایی این باکتری در نمونه‌های بالینی بود (۲۹). در سال ۱۹۹۹ نیز داسیلوا فیلهو و همکاران شناسایی باکتری سودوموناس آئروژینوزا در نمونه‌های بالینی استخراج شده از بیماری مبتلا به سیستمیک فیبروزیس را با استفاده از پرایمرهای طراحی شده برای ژن *agoD* با 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 $10^2 \times 8$ 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 ITS rDNA 16S-23S می‌توان باکتری سودوموناس آئروژینوزا را با اختصاصیت ۱۰۰ درصد از سایر گونه‌ها و جنس‌ها جداسازی و شناسایی نمود در صورتی که برای ژن‌های *oprL*، *oprI*، *toxA*، *16s rDNA* و *fliC* این میزان اختصاصیت وجود ندارد (۱۲، ۳۱ و ۳۲).

در تمامی این 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)

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^(۱) 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 نمونه‌ها 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

شرایط فیزیکی‌شیمیایی 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 و ۲۲). 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 (۳۴ و ۳۳)، 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 (۲۵ 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

1-Basic Local Alignment Search Tool(BLAST)

ناحیه ژنی مناسب و قابل اتکا برای تحقیقات اپیدمیوژنیک، 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 پاتوژنتیسیته 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.

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 Review 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, Whaley 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. Christian 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 Thecins. 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.

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, oprI 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 *Pseudomonas 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. Pseudomonas Genome Database, Database Search; www.pseudomonas.com.

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

Aghamollaei H¹, Azizi Barjini K², Moosazadeh Mogaddam^{1*}

¹Applied Biotechnology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran,

²Department of Molecular Biology, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

Received: 13 April 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 pneumoniae*, *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 Author: Moosazadeh Moghaddam M, Applied Biotechnology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Email: mm.genetics@gmail.com