مجله میکروب شناسی پزشکی ایران

سال ۱ شماره ۴ زمستان ۱۳۸۶، صفحات ۴۱-۴۵

تشخیص باکتری های استاندارد عامل عفونت های ادراری با استفاده از پرایمرهای فراگیر

هومن صدیقیان [۲،۱]، محمد رضا پورمند*[۲]

۱) مرکزتحقیقات اورولوژی بیمارستان سینا، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۲) بخش میکروب شناسی، گروه پاتوبیولوژی ، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

نویسنده رابط: محمد رضا پورمند، بخش میکروب شناسی، گروه پاتوبیولوژی ، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

تلفن: ۸۸۹۵۴۹۱۰ mpourmand@tums.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۸۶/۱۲/۲۷ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۷/۲/۲۲

چکیده :

زمینه و اهداف: عفونت ادراری(UTI) یکی از شایعترین عفونت ها به ویژه در بیماران بستری در بیمارستان می باشد. امروزه روش معمول و استاندارد در تشخیص عوامل باکتریایی ایجاد کننده عفونت های فوق، کشت ادرار می باشد. شناسایی و ردیابی عوامل پاتوژن فوق، به کمک روش های مولکولی منجر به سرعت و دقت در تشخیص عفونت می گردد. پژوهش حاضر به منظور طراحی روشی مولکولی در تشخیص عفونت های ادراری ناشی از عوامل باکتریایی صورت گرفته است .

روش بررسی: بدین منظور گونه های شایع و استاندارد باکتریایی موثر در عفونت های ادراری تهیه گردید واستخراج DNA ژنومی در آنها صورت گرفت. با استفاده از روش PCR و به کمک پرایمرهای فراگیر قطعه ای از 16S rDNA تکثیر گردید و الگوهای ویژه هر باکتری استاندارد توسط هضم آنزیمی به کمک دو آنزیم محدودگر *Hae* III و *Alu* I شناسایی گردید .

یافته ها: الگوهای فوق از گونه ای به گونه ای دیگر کاملا متمایز بودند. بدین ترتیب الگوی هضم آنزیمی قطعات 16S rDNA باکتری های *اشریشیاکلی*، *کلبسیلا پنومونیه*، *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *پسودوموناس آئروژینوزا*، و *پروتئوس میرابیلیس* کاملا متمایز از یکدیگر در ژل الکتروفورز دیده شدند.

نتیجه گیری: با توجه به الگوهای فوق شاید بتوان باکتری های پاتوژن را در نمونه های ادراری عفونی با سرعت بیشتر و دقت لازم شناسایی نمود .

کلید واژه ها :عفونت های ادراری، پرایمر فراگیر، واکنش زنجیره ای پلیمراز، هضم آنزیمی

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه :

در تشخیص عفونت ها در نمونه‌های بالینی، شناسایی عامل عفونی و تشخیص دقیق آن در زمانی بسیار کوتاه، در سلامت و بهبودی بیمار از اهمیت زیادی برخوردار است و چنین روش و پاسخی خواست همهٔ متخصصان آزمایشگاه و پزشکان است.

از جمله عفونت های شایع به ویژه در بیماران بستری در بیمارستان، عفونت دستگاه ادراری می‌باشد. از طرفی این عفونت می‌تواند به عنوان یک عفونت یا مشکل مضاعف و ثانویه در فرد بستری به شمار آید و موجب وخامت وضعیت بیمار شود و از سوی دیگر گسترش عفونت ادراری به بخش های بالاتر و جریان خون می‌تواند پیامدهای ناگوار و حتی جبران ناپذیری برای بیمار داشته باشد که از این میان می‌توان به اورتریت، سیستیت، پروستاتیت، پیلونفریت، آبسه‌های کلیوی و حتی در زنان عفونت دستگاه تناسلی اشاره کرد.

برای بیمار بستری در بیمارستان که به دلیلی غیر از عفونت ادراری بستری شده و به دلایل گوناگون از جمله استفاده از کاتتر ادراری، دچار عفونت ادراری گردیده است، همیشه این پرسش پیش می‌آید که اگر این عفونت خیلی زود و دقیق تشخیص داده می‌شد، از درد و رنج و وخامت حال بیمار پیشگیری می‌گردید.

طراحی و انجام دادن یک روش مولکولی که در زمانی کوتاه، وجود عفونت باکتریایی را تعیین کرده و گونهٔ باکتری بیماریزا را تعیین می نماید هدف این مطالعه می باشد. انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) با بهره‌گیری از پرایمر فراگیر(۱و۲) که براساس بخش مشترک در همهٔ باکتری ها (بخشی از ۱۶S r DNA) طراحی شده است، این امکان را پدید می‌آورد که با هرگونه باکتری موجود در نمونه واکنش دهد و به دنبال آن هضم آنزیمی با کمک آنزیم‌های محدودگر (Restriction Enzyme) برای به دست آوردن الگوی اختصاصی هر باکتری، امکان تشخیص باکتری را تا سطح گونه پدید می‌آورد بنابراین این فرآیند تشخیصی را می‌توان به عنوان روشی نو در تشخیص سریع و دقیق عوامل عفونی به شمار آورد.

این روش برای تشخیص عوامل پدیدآورندهٔ باکتری های شایع در عفونت های ادراری طراحی و تنظیم گردیده است. با توجه به بررسی هایی که تاکنون در زمینهٔ عوامل عفونت ادراری انجام شده است شایعترین باکتری ها در پیدایش عفونت ادراری عبارتند از: *اشریشیاکلی*، *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس*، *پروتئوس میرابیلیس*، *کلبسیلا پنومونیه*، *آنتروکوکوس فکالیس* و *پسودوموناس آئروژینوزا*(۸-۳).

در این مطالعه که از نوع بررسی آزمایش ها می‌باشد با استخراج DNA از باکتری، انجام PCR و سپس هضم آنزیمی، پلی مورفیسم طول قطعات محدود (RFLP) مربوط به هر یک از باکتری‌ها به دست می‌آید که به عنوان یک الگوی معیار برای مقایسه الگوهای بدست آمده از عفونت ادراری و تعیین گونهٔ باکتری به کار می‌رود.

مواد و روش‌ها :

نوع مطالعه: این پژوهش در قالب مطالعهٔ بررسی آزمایش ها انجام گردید. نمونه‌های مورد بررسی سویه‌های استاندارد باکتری های شایع در عفونت‌های ادراری بودند که عبارتند از :

۱- *اشریشیاکلی* ATCC 35218

۲- *کلبسیلاپنومونیه* ATCC 7881

۳- *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* ATCC 15305

۴- *پسودوموناس آئروژینوزا* ATCC 27853

۵- *آنتروکوکوس فکالیس* ATCC 29212

۶- *پروتئوس میرابیلیس* ATCC 15146

برای پی بردن به درستی کار، هر آزمایش به طور کامل ۳ بار تکرار گردیده و در نهایت برای تأیید الگوهای به دست آمده از هضم آنزیمی، پاسخ الکتروفورز با پاسخ به دست آمده از بررسی نظری توالی ژنوم باکتری (به دست آمده از پایگاه اینترنتی CMR-TIGR) مقایسه گردید، تا درستی نتیجهٔ آزمایش قطعی گردد.

استخراج DNA:

نخست سویه‌های استاندارد باکتری‌های پدید آورندهٔ عفونت ادراری تهیه گردید (به شرح گفته شده در بالا). این باکتری‌ها جهت کشت و تشخیص، روی محیط آگار خوندار و محیط‌های اختصاصی و سپس محیط‌های افتراقی (تشخیص بیوشیمیایی) کشت داده شدند. از پرگنه‌های موجود روی محیط آگارخوندار برای تهیهٔ سوسپانسیون جهت استخراج DNA استفاده گردید.

آنگاه با بهره‌گیری از کیت استخراج DNA مربوط به شرکت کیاژن (QIAGEN , DNeasy Blood & Tissue kit) ژنوم باکتری های نامبرده که روی محیط آگار خوندار کشت داده شده بودند، استخراج شد. سپس DNA استخراج شده با استفاده از پرایمرهای فراگیر و به روش PCR، افزایش DNA استخراج شده انجام گردید. پس از آن فرآوردهٔ PCR با استفاده از کیت شستشوی شرکت کیاژن (QIAGEN , PCR purification kit) شستشو داده شد و نیز تغلیظ گردید و به دنبال آن با کمک آنزیم‌های محدودگر، فرآورده‌های PCR، برش داده شد و مرحله هضم

Archive of SID

www.SID.ir

آنزیمی انجام گردید. سپس قطعات DNA به دست آمده الکتروفورز شد و الگوی مربوط به هر باکتری به دست آمد.

مشخصات روش PCR :

مواد : DNA الگو ۲µl، پرایمر رفت و برگشت هر کدام (100µM)،۵µl dNTPs (10mM) ۲µl، بافر ۱۰µl، کلرید منیزیم ۳µl، آب مقطر استریل ۷۲/۷µl و آنزیم (Taq DNA polymerase) ۰/۳µl [5U/µl].

توالی پرایمر رفت: ′۳- CAGCAGCCGCGG TAA -′۵

توالی پرایمر برگشت:′۳-ACGGTTACCTTGTTACGACTTC-′۵

مراحل کار :

دمای مقدماتی ^{C}۹۴ به مدت ′۵، مرحله جداسازی دو رشته ^{C}۹۴ به مدت ۴۵ ثانیه، مرحلهٔ چسبیدن پرایمرها ^{C}۶۰ به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله فعالیت آنزیم ^{C}۷۲ به مدت ۹۰ ثانیه و تعداد چرخه‌ها ۳۰ دور می‌باشد.

مشخصات روش هضم آنزیمی :

مواد : بافر ۲/۵µl، DNA ۶µl، آنزیم ۱/۵µl و آب مقطر استریل ۱۵µl. آنزیم BSURI (Hae III) با بافر R و با جایگاه برش GGCC و آنزیم *Alu* I با بافر Tango با جایگاه برش AGCT از شرکت ژن فن آوران (Fermentas) خریداری گردید.

روش کار : این مجموعه را درون ویال ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته و درش را سفت بسته و پارافیلم کشیده و به مدت ۲ ساعت در بن ماری ^{C}۳۷ قرار دادیم.

مشخصات روش الکتروفورز :

مواد : ۸µl از قطعات به دست آمده از اثر آنزیم و ۲µl رنگ 6x، ژل پلی آکریل آمید و بافر TAE 1 x .

روش کار: ژل پلی آکریل آمید ۸٪ تهیه شده (بر اساس روش Sambrook) و مخلوط مورد بررسی (۱۰µl برش داده شده و ۲µl رنگ) درون هر چاهک ریخته می‌شود. برای الکتروفورز (ساخت ژل و الکترولیت درون مخزن) از بافر TAE 1x استفاده می‌شود و الکتروفورز به مدت ۲ ساعت و با شدت جریان ۲۵ میلی آمپر انجام شد.

یافته‌ها :

مرحله استخراج DNA حدود ۲ ساعت، PCR ۲ ساعت، شستشو و تغلیظ فرآوردهٔ PCR حدود ۲۰دقیقه و مرحله هضم آنزیمی ۲ ساعت و الکتروفورز ۲ ساعت طول می‌کشد و در مجموع حدود ۸/۵ ساعت زمان برده شد. برای مرحله هضم آنزیمی فرآوردهٔ PCR هر باکتری، دو آنزیم محدودگر استفاده شد که الگوی به دست آمده از آنها با توجه به نتیجهٔ به دست آمده از الکتروفورز بدین ترتیب می‌باشد (به شکل زیر توجه شود):

در اثر برش با آنزیم *Hae* III، *اشریشیاکلی* ۶ قطعه (۲۱۶، ۲۱۰، ۱۸۰، ۱۶۵، ۱۲۵ و ۶۸)، *کلبسیلاپنومونیه* ۶ قطعه (۲۱۶، ۲۱۰، ۱۸۰، ۱۶۵ و ۱۲۵و۶۸ bp)، *پروتئوس ولگاریس* ۵ قطعه (۳۰۰، ۱۸۰،۲۲۰، ۱۶۰ و ۱۲۰ bp) و *پسودوموناس آئروژینوزا* ۴ قطعه (۳۷۷، ۲۱۹، ۱۷۱ و ۱۲۵ bp) پدید آورده است.

در اثر برش با آنزیم *Alu* I، *اشریشیاکلی* ۴ قطعه (۳۶۰، ۲۰۰، ۱۸۰ و ۱۲۰ bp)، *کلبسیلا پنومونیه* ۴ قطعه (۳۶۰، ۳۴۰، ۲۲۰ و ۷۰ bp)، *پروتئوس میرابیلیس* ۴ قطعه (۳۴۰، ۲۰۰، ۱۸۰ و ۱۲۰ bp) و نیز *پسودوموناس آئروژینوزا* ۶ قطعه (۲۱۱، ۲۰۰، ۱۸۰، ۱۷۵، ۱۲۱ و ۷۰ bp) تولید کرده است.

بنابراین با توجه به نتیجه‌های بدست آمده از برش این دو آنزیم و پیدایش الگوهای متفاوت باکتری‌های نامبرده در بالا در سطح گونه از هم قابل شناسایی می‌باشند.

در اثر برش با آنزیم *Hae* III، *آنتروکوکوس فکالیس* ۳ قطعه(۴۳۰، ۴۲۰ و ۱۲۰ bp)، *استافیلوکوکوس اورئوس* بدون برش، *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* ۵ قطعه (۲۸۰، ۲۲۰، ۱۸۰، ۱۷۰ و ۱۲۰ bp) و استرپتوکوکوس بتاهمولیتیک گروه A ۴ قطعه (۴۶۰، ۳۱۵، ۱۲۰ و ۹۲ bp) پدید آورده است.

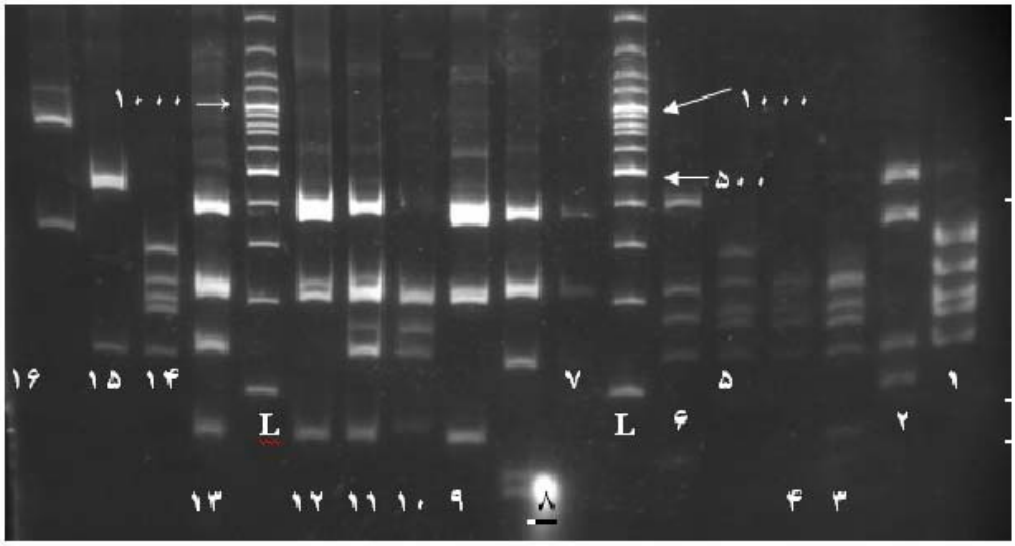
در اثر برش با آنزیم *Alu* I به ترتیب، استرپتوکوکوس بتاهمولیتیک گروه A ۴ قطعه (۳۴۵، ۲۲۹، ۲۰۷ و ۲۰۶ bp)، *آنتروکوکوس فکالیس* ۴ قطعه (۳۶۰، ۲۳۰، ۲۰۵ و ۱۸۰ bp)، *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* ۴ قطعه (۲۱۰، ۱۳۸، ۱۲۴ و ۵۳ bp) و *استافیلوکوکوس اورئوس* ۴ قطعه (۳۷۴، ۲۱۸، ۱۲۰ و ۵۵) پدید آورده است.

پس برای باکتری‌های نامبرده در بالا به کمک هر یک از این دو آنزیم، می‌توان این باکتری‌ها را در سطح گونه شناسایی کرد.

Archive of SID

www.SID.ir

شکل۱: نمایش قطعات آنزیمی برش خورده توسط ژل الکتروفورز پلی آکریل آمید ۸٪



HaeIII
1) S. saprophyticus
2) S. pyogenes
3) E. coli
4) K. pneumoniae
5) Proteus vulgaris
6) P. aeroginosa
L: Ladder(100bp)

AluI
7) S. aureus
8) S. epidermidis
9) S. saprophyticus
10)P. aeroginosa
11) E.coli
12) K. pneumoniae

HaeIII
13) Y. enterocolitica
14) V. cholerae
15) B. subtilis
16) N. meningitidis

۱) ۵ قطعه ۲) ۴ قطعه ۳) ۶ قطعه ۴) ۶ قطعه ۵) ۵ قطعه ۶) ۴ قطعه

۷) ۲ قطعه ۸) ۵ قطعه ۹) ۴ قطعه ۱۰) ۴ قطعه ۱۱) ۴ قطعه

۱۲) ۴ قطعه ۱۳) ۴ قطعه ۱۴) ۵ قطعه ۱۵) ۲ قطعه ۱۶) ۲ قطعه

بحث :

هدف اصلی از انجام این پژوهش دست یافتن به روشی سریع و دقیق برای تشخیص عوامل باکتریال ایجاد کننده عفونت های دستگاه ادراری می باشد. پرایمرها به گونه ای طراحی شده اند که با توجه به گستردگی باکتری ها یعنی باکتری های گرم مثبت، گرم منفی، گونه های سخت رشد، باکتری های درون سلولی و غیره، همه را پوشش دهد و برای دیگر نمونه ها نیز کاربرد داشته باشد. چنانچه در دیگر کارهای مشابه به این موضوع توجه نشده است(۱،۲و۱۰).

در بررسی‌هایی که در گذشته درباره PCR با پرایمرهای فراگیر (Universal Primers) انجام گردیده بود پرایمرهای مورد استفاده گرچه گسترهٔ زیادی از باکتری ها را شامل می‌شد اما برای تشخیص همه باکتری ها کارآیی نداشت (۱و۲و۱۱). همچنین در برخی از این مقاله ها تنها به تشخیص عامل عفونی اکتفا شده بود و کار برای تشخیص جنس و گونه باکتری دنبال نشده بود(۹).همچنین در پاره ای از مقاله ها روش هایی پیچیده و هزینه بر مانند دورگه سازی(Hybridization) و PCR-ELISA به کار رفته است (۱۰) که در مقام عمل در همه آزمایشگاه ها امکانپذیر نیست و تنها در یک مقاله برای تشخیص گونه باکتری روش هضم آنزیمی به کار رفته بود (۱) که در مقایسه با روش های دیگر ساده تر و ارزانتر می باشد. گرچه در این مطالعه نیز مجددا اشکال گفته شده در صدر گفتار(عدم پوشش همه باکتری ها) وجود

www.SID.ir

دارد.

بنابراین ما در این پژوهش با بررسی توالی 16S rDNA در ژنوم باکتری ها (تا جایی که در دسترس بود و مشخص گردیده بود و با استفاده از پایگاه های اینترنتی CMR-TIGR و NCBI، تلاش کردیم تا پرایمرهای مورد استفاده را به گونه‌ای طراحی کنیم که در همه باکتری ها کار کند و بتواند فرآیند PCR را انجام دهد.

همچنین با مقایسهٔ توالی های نامبرده و بررسی جایگاه های برش آنزیم های محدودگر روی قطعهٔ به دست آمده از فرآیند PCR باکتری‌ها، دو آنزیم (*Alu* I و *Hae* III)را برگزیدیم. بدین ترتیب به کمک این دو آنزیم و پرهیز از استفاده از آنزیم‌های گوناگون، هم در زمان صرفه‌جویی می‌شود و هم به نتیجهٔ دلخواه یعنی به دست آوردن الگوهای متفاوت در باکتری‌ها برای تشخیص جنس و گونه آنها دست یافتیم.

نتیجه گیری:

بنابراین شاید بتوان گفت که با استفاده از این روش پس از استخراج DNA از یک نمونهٔ ادرار به ویژه انواعی از نمونه های ادراری که باید استریل باشند مانند نمونه سوپراپوبیک و انجام PCR و هضم آنزیمی و سرانجام مقایسهٔ الگوی آن با الگوهای به دست آمده از نمونه‌های معیار (که در این مطالعه به دست آمده است) در زمانی کمتر از ۹ ساعت (به جای ۴۸ ساعت معمول در آزمایشگاه‌ها) می‌توان گونهٔ باکتری عامل عفونت در ادرار را تشخیص داد.

شایان ذکر است که به همین ترتیب می‌توان نمونه‌های بالینی دیگر را هم مورد بررسی قرار داد و با تهیه الگوی هضم آنزیمی دیگر باکتری ها، از این روش تشخیص سریع دربارهٔ دیگر نمونه‌های بالینی و دیگر باکتری ها نیز بهره‌مند گردید.

فهرست مراجع:

1. Lu JJ, Perng CL, Lee SY, Wan CC., Use of PCR with universal primers and restriction endonuclease digestions for detection and identification of common bacterial pathogens in cerebrospinal fluid , *J Clin Microbiol* 2000; **38**(6):2076-80.
2. Schuurman T, de Boer RF, Kooistra-Smid AM, van Zwet AA., Prospective study of use of PCR amplification and sequencing of 16S ribosomal DNA from cerebrospinal fluid for diagnosis of bacterial meningitis in a clinical setting. *J Clin Microbiol* 2004; **42**(2): 734-740.
3. Sherwood L. Gorbach, John G Bartlett and Neil R Blacklow, *Infections Diseases*, Third edition, USA, Lippincott Williams and wilkins, 2004 .

۴. یلدا ع، رسولی نژاد م، عظیمی‌کیا ع و یوسفی ع، *درمان قدم به قدم بیماری‌های عفونی*، چاپ اول، تهران،انتشارات برای فرد ، ۱۳۸۰.

۵. خطایی ق، ممیشی س، بخار سلیقه ر، بررسی میزان مقاومت به آنتی بیوتیک‌های متداول در عفونت ادراری، *مجلهٔ بیماری‌های کودکان ایران*، سال دوازدهم (دورهٔ جدید)(شمارهٔ ۲)، صفحهٔ ۳۱-۲۸.

۶. پورمند غ، پورمند م، سالم س، طاهری محمودی ح، مهرسای ع، ابراهیمی ر، نیکوبخت م و نوری جلیانی ک، عوارض عفونی پس از پیوند در گیرندگان کلیه در ایران، *مجلهٔ دانشکدهٔ بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی*، **دورهٔ ۴**(شمارهٔ ۲) تابستان ۱۳۸۵، صفحه‌های ۷۱-۵۹.

7. M. Haghi-Ashtiani M. , N. Sadeghifard N. , M. Abedini M. , S.Soroush S. and M. Taheri-kalani M. , Etiology and antibacterial resistance of bacterial urinary tract infections in children's medical center, Tehran, Iran, *AMI***,** 2007**; 45**(2): 153-157.
8. Esmaeili M. , Antibiotics for causative microorganisms of urinary tract infections, *Iran J Ped*, 2005; **15**(2):165-173
9. Afsharpaiman S, Mamishi S, Pourakbari B, Siyadati A, Tabatabaee P and Khotaee G. Diagnosis of bacteremia using Universal PCR in febrile children, *AMI*, 2007**; 45**(2):13-138
10. McCabe KM, Zhang YH, Huang BL, Wagar EA, McCabe ER., Bacterial species identification after DNA amplification with a Universal Primer pair, *Mol Genet Metab* , 1999; **66**(3): 205-211
11. Pandit L, Kumar S, Karunasagar I, Karunasagar I, Diagnostic of partially treated culture-negative bacterial meningitis using 16S rRNA universal primers and restriction endonuclease digestion , *J Med Microbiol***,** 2005; **54**(6): 539-542

Archive of SID

www.SID.ir