Archive of SID

مجله پزشکی کوثر
دوره ۱۱ ، شماره ۲ ، تابستان ۱۳۸۵
صفحات: ۱۲۵ – ۱۳۳

تشخیص و تعیین هویت باکتری‌های بیماریزای شایع با استفاده از PCR همگانی (Universal PCR) و هضم آنزیم‌های محدود کننده

مصطفی ملّت* M.Sc. ، میر لطیف موسوی✍ Ph.D. ، جعفر امانی** M.Sc. ،
شهرام نظریان** M.Sc.

چکیـــده

هدف: در این تحقیق با استفاده از ژن 16s rRNA به عنوان هدف سعی کردیم باکتری‌های بیماریزای شایع در نمونه‌های بالینی را تشخیص دهیم. ژن کد کننده 16s rRNA اغلب این باکتری‌ها تعیین توالی شده‌اند و مشخص شده است که در همه باکتری‌ها این ژن دارای مناطق حفاظت شده‌ای است که با طراحی یک جفت پرایمر عمومی (universal primers) می‌توان این ژن را از باکتری‌های مختلف فراوان‌سازی کرد از آنجائی که محصولات تکثیر شده از باکتری‌های مختلف دارای الگوی برش متفاوت در برابر آنزیم‌های محدودالاثر می‌باشند لذا از این روش جهت شناسایی باکتری‌ها استفاده می‌شود. ما سعی کردیم بعضی از نمونه‌های استاندارد و کلینیکی را توسط این روش (PCR-RFLP) شناسایی و حساسیت آن را با روش کشت مقایسه نمائیم.

روش بررسی: باکتریهای مورد استفاده اغلب از آزمایشگاه رفرانس ایران واقع در بیمارستان بوعلی و یا گروه بیوتکنولوژی دانشکده علوم‌پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تهیه شده‌اند. نمونه‌های کلینیکی مرتبط از بیمارستانهای مختلف تهران جمع‌آوری شده‌اند. آنزیم Taq DNA polymerase و آنزیمهای اندونوکلئاز محدودالاثر از شرکت سیناژن تهیه گردید. با استفاده از یک جفت پرایمر عمومی (Universal primers) ژن کد کننده 16s rRNA را از ۹ باکتری مختلف فراوان‌سازی و سپس با استفاده از الگوی برش بدست آمده از هضم با آنزیمهای محدودالاثر آنها را شناسایی کردیم .

یافته‌ها: نتایج نشان می‌دهد که با این روش می‌توان ۹ باکتری پاتوژن مورد استفاده در این تحقیق را تشخیص و تعیین هویت کرد. حساسیت این روش در مقایسه با روش کشت در ۵۰ نمونه بالینی ۹۲٪ بود.

نتیجه‌گیری: آزمایش تشخیص همزمان چند پاتوژن زمانی اهمیت خود را نشان می‌دهد که شواهد بالینی در تشخیص عامل بیماری کافی یا موثر نباشد روش بکار گرفته در این تحقیق علاوه بر مزیت فوق از سرعت و حساسیت بالایی در مقایسه با روشهای سنتی برخوردار می‌باشد. به نظر می‌رسد PCR-RFLP یک روش آزمایشگاهی مناسب در کنار سایر روشها برای تشخیص عوامل بیماریزای شایع انسانی باشد.

واژه‌های کلیدی: تشخیص سریع، واکنش زنجیره ای پلیمراز همگانی، ژن 16s rRNA، باکتریهای بیماریزای شایع

مقـدمـه

تشخیص سریع بیماری در موارد اضطراری (Emergency Case) از قبیل مننژیت از اهمیت بیشتری برخودار می‌باشد بطوریکه در بعضی موارد ثانیه‌ها نیز مهم جلوه می‌کنند. بنابراین روشهای

دریافت مقاله: ۸۴/۸/۱ ، اصلاح مقاله: ۸۵/۶/۷، پذیرش مقاله: ۸۵/۶/۸

✍ نویسنده مسئول: استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه امام حسین (ع)، تهران ـایران
* گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه تهران ** گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه امام حسین (ع)
آدرس پست الکترونیکی: mmousavi@ihu.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

تشخیص سریع باکتریها از مایعات بدن بخصوص از مایع مغزی نخاعی (CSF) برای نجات بیماران حیاتی می‌باشد. چرا که آمارها نشان می‌دهد که میزان مرگ و میر ناشی از عفونتهای خونی و سیستیم مرکزی عصبی در بیمارستانها بسیار بالا است. (۱-۳،۱۷)

هرچند برای تشخیص باکتریها در آزمایشگاههای کلینیکی از روش کشت بعنوان روش حساس استفاده می‌شود ولی زمان مورد نیاز برای تشخیص از طریق کشت بسیار طولانی است که شامل زمان انکوباسیون و انجام تستهای مورد نیاز بیوشیمیایی و یا ایمونولوژیکی می‌باشد. از طرفی در مواردی که برای نمونه‌های کلینیکی محدودیت حجم وجود دارد (برای مثال نمونه‌های التهابی چشم) امکان استفاده از روشهای سنتی مشکلاتی از قبیل دقت عمل و... را بدنبال خواهد داشت. لذا استفاده از روشهایی که مشکلات فوق را مرتفع نماید بیش از پیش لازم و ضروری می‌باشد. هدف این تحقیق استفاده از یک روش تشخیصی مبتنی بر 16srRNA برای شناسایی باکتریهای بیماریزا شایع در نمونه‌های بالینی می‌باشد.

ژن 16srRNA اغلب باکتریهای بیماریزای شایع تعیین توالی شده‌اند. در اغلب این باکتریها این ژن دارای مناطق حفاظت شده‌ای است که می‌توان با طراحی یک جفت آغازگر عمومی (Universal Primer) برای این مناطق ژن مورد نظر را از باکتریهای متفاوت فراوان‌سازی کرد. (۱۸،۱۱،۴) این قطعات با آنکه دارای اندازه یکسانی می‌باشند (۹۹۶ جفت باز) ولی الگوی برشی آنها بوسیله آنزیمهای محدودگر در باکتریهای مختلف متفاوت است که اساس تشخیص در این روش می‌باشد. آقای Lu و همکاران توانسته‌اند ۱۸ باکتری پاتوژن را با استفاده از این روش از نمونه‌های مغزی نخاعی تشخیص بدهند. (۱۲) آقای Warsen و همکاران با تکیه بر فراوان‌سازی 16srRNA توسط پرایمرهای عمومی و با استفاده از تکنیک DNA میکرو اری ۱۵ پاتوژن رایج در ماهیها را شناسایی کرده‌اند. (۱۸) ما در تحقیقات قبلی و برای شروع کار با 16srRNA توانستیم ۴ باکتری را در نمونه‌های کلینیکی با موفقیت تعیین هویت کنیم که حساسیت روش در مقایسه با سایر روشها بسیار خوب بود. (۱۹) در تحقیق حاضر نیز با استفاده از فراوان‌سازی ژنهای 16srRNA از ۹ سویه استاندارد و نمونه‌های کلینیکی مرتبط و سپس با تکیه بر هضم آنزیمی و الگوی الکتروفورز توانستیم ۹ گونه باکتری که اسامی آنها در بخش مواد و روشها آمده است را در مدت زمان ۴/۵ ساعت از هم تشخیص دهیم. نتایج بدست آمده در این تحقیق بیانگر آن است که این روش در کنار روشهای دیگر می‌تواند بعنوان روش مفید و قابل اتکا جهت تشخیص باکتریهای بیماریزا شایع در نمونه‌های کلینیکی مورد استفاده قرار گیرد.

روش بررســی

سویه‌های مختلف باکتریایی . باکتری‌های ذیل بعنوان کنترل استفاده شدند:

Staphylococcus aureus ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6301, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25668, *Haemophilus influenzae* ATCC 35056

این سوش‌ها از بخش میکروبیولوژی آزمایشگاه رفرانس ایران واقع در بیمارستان بوعلی و همچنین گروه بیوتکنولوژی دانشکدهٔ علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تهیه شده‌اند. ۵۰ نمونه کلینیکی (CSF) در مدت ۷ ماه از بیمارستانهای مختلف تهران جمع‌آوری شده است.

مواد مورد استفاده در تخلیص DNA و الکتروفورز از قبیل SDS , Phenol, Chloroform Tris-HCl , EDTA, Isoamylalchole ,CTAB ,NaCl ,Acrylamide و Bisacrylamide,Agarose ، Isopropanol و Ethanol از شرکت Roche آلمان خریداری شدند. انزیمهای مورد استفاده در این تحقیق شامل HaeIII, Taq DNA polymerase, Bsp119I(AsuII), AluI, MnlI, Proteinase K,RNase A از شرکت سیناژن ایران تهیه شدند.

پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق همان پرایمرهای استفاده شده در تحقیق Lu و همکاران (۱۲) می‌باشد که توسط

www.SID.ir

Archive of SID

شرکت MWG آلمان سنتز شدند.

استخراج DNA ژنومی از باکتری‌های گرم منفی . ۱/۵ میلی لیتر از کشت مایع باکتری به لوله‌های استریل ۱/۵ میلی‌لیتری درپوش‌دار منتقل و به مدت ۵ دقیقه در ۵۰۰۰rpm سانتریفوژ گردید. محلول رویی دور ریخته و رسوب حاصل که شامل باکتری می‌باشد در ۵۶۷ میکرولیتر بافر TE با تکان‌های شدید حل شد. به این مخلوط ۳۰ میکرولیتر از بافر SDS ۱۰٪ ، ۳ میکرولیتر از آنزیم Proteinase K (20 mg/ml) اضافه و پس از به هم زدن به مدت ۳ـ۱ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از توقف گرمادهی، به مخلوط حاصل ۱۰۰ میکرولیتر نمک NaCl۵M اضافه و به آرامی تکان داده شد. به مخلوط حاصل ۸۰ میکرولیتر محلول CTAB/NaCl اضافه و به مدت ۱۵–۱۰ دقیقه در ۶۵ درجه سانتی‌گراد گرمادهی شد. به مخلوط حاصل، به اندازه حجم آن (۷۸۰ میکرولیتر)، مخلوط کلروفرم ـ ایزوآمیل الکل (به نسبت ۲۴ کلروفرم و ۱ ایزوآمیل الکل) اضافه و به آرامی تکان داده شد تا دو فاز با هم ترکیب شوند. سپس مخلوط حاصل در ۴ درجه سانتی‌گراد و در ۲۵۰۰rpm به مدت ۲۵–۲۰ دقیقه سانتریفوژ شد. محلول رویی به لوله دیگری منتقل و عمل فوق یکبار دیگر تکرار گردید. محلول رویی حاصل به آرامی به لوله‌های دیگری منتقل و هم حجم آن (حدود ۵۰۰ میکرو لیتر) ایزوپروپانول سرد اضافه شد. برای اینکه عمل ترسیب DNA به آرامی و با بازده بیشتر صورت گیرد محلول به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۲۰– درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس محلول به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۰۰۰rpm و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد و به رسوب حاصل حدود ۱ میلی لیتر اتانول ۷۰٪ اضافه شده و مجدداً محلول در ۳۰۰۰rpm و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد رسوب حاصل در دمای آزمایشگاه خشک گردید. ۵۰ میکرولیتر بافر TE اضافه و سپس برای حذف RNA احتمالی موجود، ۵–۳ میکرولیتر آنزیم RNase A به محلول اضافه شد و به مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

استخراج DNA ژنومی از باکتری‌های گرم مثبت . از محیط کشت حاوی باکتری رشد یافته ۱/۵ میلی‌لیتر برداشته و در لوله‌های اپندروف ۱/۵ میلی‌لیتری به مدت ۱۵–۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد. محلول رویی را دور ریخته و رسوب سلولها را در ۳۰۰ میکرولیتر بافر THE (SomM Tris, 10mM EDTA) کاملاًحل نمودیم. ۵۰ میکرولیتر لیزوزیم به غلظت 10 mg/ml در بافر TNE (Tris-Hcl, Nacl , EDTA-PH: 8) به محلول اضافه کرده و بعد از بهم‌زدن در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰–۱۵دقیقه انکوبه کردیم. ۴۰ میکرولیتر سارکوزیل ۲٪ در بافر TE به محلول اضافه کرده و آن را بطور آرام بهم زدیم. ۵ میکرولیتر از RNaseA (10mg/ml در بافر TE) اضافه کرده و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد برای ۱۵ دقیقه انکوبه نمودیم. ۳۵ میکرولیتر از پروتئیناز K (20mg/ml در آب مقطر) به مخلوط واکنش اضافه کرده و در حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد.

برای اجتناب از شکسته شدن DNA در کلیه مراحل، بعد از اضافه کردن هر محلول یا معرف مخلوط واکنش بجای ورتکس، از سر و ته کردن آرام لوله‌ها برای مخلوط کردن استفاده شد. به اندازه حجم مساوی نمونه ابتدا فنل سپس مخلوط فنل– کلروفرم و پس از آن کلروفرم اضافه کرده و در هر مرحله بعد از بهم‌زدن، آن را با دور ۱۰۰۰ rpm سانتریفوژ کرده و محلول رویی را جدا کردیم. در مرحله آخر پس از جداسازی محلول رویی آنرا در یک لوله جدید ریخته و به آن ۶۰ میکرولیتر سدیم استات ۳ مولار اضافه گردید و سپس دو برابر حجم نمونه، الکل ۹۷٪ اضافه نمودیم. پس از این مرحله به مدت۳۰ دقیقه در۷۰– درجه سانتی‌گراد (یا ۱۶ ساعت در ۲۰– درجه سانتی‌گراد) قرار داده شد. لوله‌های حاوی DNA کروموزومی را با دور ۳۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ نموده و محلول رویی را دور ریخته و رسوب را با الکل ۷۰٪ شستشو دادیم. رسوب را کاملاً خشک نموده ۵۰ میکرولیتر از بافر TE به آن اضافه کرده و در دمای چهار درجه سانتی‌گراد قرار دادیم تا کاملاً حل شود.

استخراج DNA ژنومی از نمونه‌های کلینیکی . استخراجDNA ژنومی از نمونه‌های کلینیکی (CSF) ابتدا با استفاده از روش جوشاندن (Boiling) صورت گرفت ولی در ادامه

www.SID.ir

Archive of SID

کار به لحاظ کثرت نمونه‌ها واکنش PCR به صورت مستقیم (Direct PCR) و از نمونه CSF بدون استخراج ژنومیک، انجام گرفت.

تکثیر اختصاصی DNA هدف با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) . واکنش PCR در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر در لوله‌های اپندروف بر اساس جدول ۱ تهیه شد. در لوله‌های کنترل منفی بجای DNA الگو همان حجم آب دوبار تقطیر اضافه گردید. مخلوط واکنش به مدت ۳۰ ثانیه سانتریفوژ و لوله‌های واکنش به دستگاه ترمال سایکلر انتقال داده شد. واکنش PCR طبق برنامه زیر انجام شد. چرخه ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه برای جدا شدن دو زنجیره DNA ، ۳۰ چرخه شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و دمای ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه و مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه و مدت زمان ۱۰ دقیقه. با توجه به وزن DNA مورد نظر از ژل آگارز با غلظت ۱٪ جهت تائید قطعات فراوان‌سازی شده استفاده شد. نشانگر مورد استفاده DNA Ladder 100bp می‌باشد.

هضم محصولات PCR توسط آنزیم‌های محدودالاثر . ۵ میکرولیتر از هر یک از محصولات PCR با آنزیم‌های آندونکلئاز محدودالاثر مختلف در بافر مناسب با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر و به مدت ۲ ساعت مورد هضم واقع شدند. DNA هضم شده بر روی ژل پلی آکریل آمید ۱۵٪ الکتروفورز شد و الگوی برش مورد مطالعه قرار گرفت.

یافتـه‌هـا

به منظور ایجاد و بهینه کردن یک واکنش PCR که قادر به تکثیر توالی نوکلئوتیدی خاصی از ژن ۱۶S rRNA اغلب با کتری‌های بیماریزای بدن باشد، یک جفت از پرایمرهای همگانی (Universal Primers) با توالی حفظ شده‌ای در بین تمامی این باکتری‌ها انتخاب شد. توالی پرایمر بالادستی عبارت است از: 5′-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3′ که با نوکلئوتیدهای شماره ۵۱۸ تا ۵۳۷ ژن SrRNA ۱۶ در باکتری *Escherichia coli* مطابقت دارد و توالی پرایمر پایین دستی عبارت است از:

5′- ATCGGTTACCTTGTTACGACTTC -3′ که با نوکلئوتیدهای شماره ۱۵۱۳ تا ۱۴۹۱ همان ژن مطابقت دارد. واکنش PCR که در این تحقیق با این دو پرایمر صورت گرفت، PCR همگانی (Universal PCR) نامیده شد.

ابتدا واکنش PCR همگانی به منظور تنظیم شدن (Set up)، با DNA استخراج شده از سوش‌های استاندارد از کلکسیون کشت میکروبی آمریکا (ATCC) صورت گرفت. تمام محصولات PCR حاصل از همه نمونه‌ها دارای اندازه مورد انتظار بودند (۹۹۶bp). در ضمن یک باند غیر اختصاصی که حدود ۱۵۰ bp بود تقریباً در تمامی نمونه‌ها نیز تولید شده بود. (شکل ۱) سپس تمامی محصولات PCR با آنزیم محدود کننده BsuR I (Hae III) مورد هضم آنزیمی قرار گرفتند تا معلوم شود که آیا تکنیک RFLP برای تعیین هویت این باکتری‌های خاص مفید واقع می‌شود یا نه؟ تمامی محصولات PCR به جز *Staphylococcus aureus* و *Staphylococcus epidermidis* به چندین قطعه برش خوردند. (شکل۲) محصولات PCR از باکتری *Staphylococcus aureus* و*Staphylococcus epidermidis* به هنگامی که با آنزیم محدود کننده MnlI برش می‌خورند دارای الگوی برش متفاوتی از یکدیگر می‌شوند. (شکل ۳) محصولات PCR از باکتری‌های *Escherichia coli* و *Klebsiella pneumoniae* هرگاه که با آنزیم محدود کننده BsuR I برش می‌خورند دارای الگوی برشی یکسانی هستند (قطعات۲۲۰–۲۰۰–۱۸۰–۱۷۰–۱۴۰و۸۰ جفت بازی). (شکل ۲) اما هنگامی که با آنزیم Bsp119I(AsuII) مورد هضم قرار گیرند دارای الگوی برشی متفاوتی می‌شوند (*Escherichia coli* ۹۹۶ جفت باز، *Klebsiella pneumoniae* : قطعات ۸۷۶ و۱۲۰ جفت بازی) (شکل۴). محصولات PCR از باکتری‌های *Streptococcus pneumoniae* و*Enterococcus faecalis* هنگامی که با آنزیم BsuR I برش می‌خورند دارای الگوی برش یکسانی می‌شوند در حالی که الگوی برش آنها با آنزیم AluI از همدیگر کاملا متفاوتند.

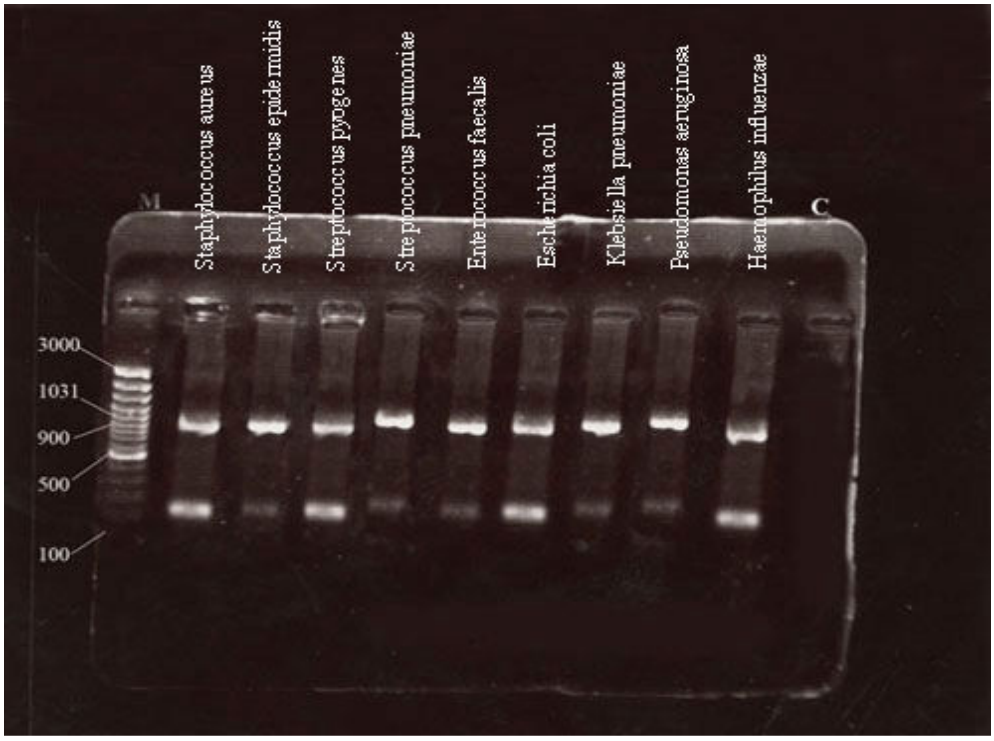
www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱. غلظت نهایی مواد مورد استفاده در واکنش PCR

مواد	مقدار	غلظت نهایی
بافر 10X PCR	۵ میکرو لیتر	1X
dNTPs Mix(10Mm)	۱میکرو لیتر	0.2mM
$MgCl_2$ (50mM)	۲ میکرو لیتر	2mM
پرایمر بالا دست۲۰پیکو مول بر میکرو لیتر	۰/۵ میکرو لیتر	0.2mM
پرایمر پایین دست ۲۰ پیکو مول بر میکرو لیتر	۰/۵ میکرو لیتر	0.2mM
آنزیم Taq DNA پلی مراز	۰/۵ میکرو لیتر	2.5 unit
الگو (DNAژنومیک)	۱ میکرو لیتر	50ng
آب مقطر(آمپولی)	۳۹/۵ میکرو لیتر	---
حجم نهایی	۵۰ میکرو لیتر	

شکل ۱. الکتروفورز محصولات Universal PCR بر روی ژل آگارز ۱٪



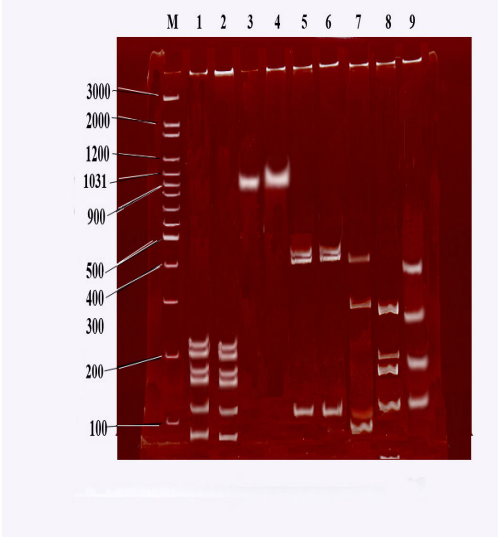
ستون M استانداردهای اندازه مولکولی بر حسب جفت باز می‌باشد. ستون C مربوط به کنترل منفی می‌باشد. ستون‌های ۱ تا ۹ باکتری‌های مورد استفاده در آزمایش

(*Streptococcus pneumoniae* : قطعات ۵۰۰–۲۲۰–۲۱۰ جفت بازی و *Enterococcus faecalis* : قطعات ۳۲۰ –۲۴۰– ۲۱۰ جفت بازی) (شکل ۵).

محصولات PCR از باکتری‌های *Pseudomonas aeruginosa*، *Haemophilus influenzae* و *Streptococcus pyogenes* هنگامی که با آنزیم HaeIII برش می‌خورند دارای الگوی برش متفاوتی با همه باکتری‌های دیگر هستند. لذا برای تعیین هویت آنها نیاز به آنزیم دیگری نمی‌باشد (شکل ۲).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل۲. الگوی برش محصولات PCR همگانی باکتری‌های مختلف با آنزیم محدود کننده HaeIII .

ستون M اندازه مولکولی استاندارد بر حسب جفت باز آلی می باشد که در سمت چپ شکل ، اندازه باندهای مختلف در مقابلشان درج گردیده است.

ستون ۱:Escherichia coli

ستون ۲:Klebsiella pneumoniae

ستون ۳: Staphylococcus aureus

ستون ۴: Staphylococcus epidermidis

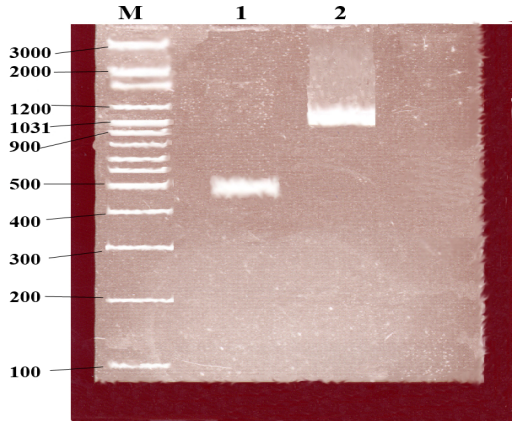
ستون ۵:Streptococcus pneumoniae

ستون ۶: Enterococcus faecalis

ستون۷:Streptococcus pyogenes

ستون ۸: Pseudomonas aeruginosa

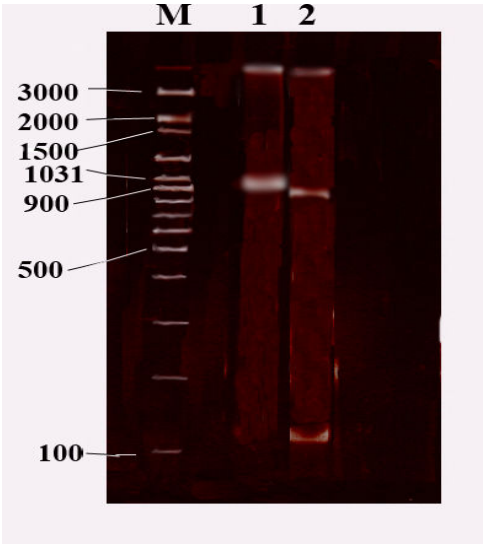
ستون ۹:Haemophilus influenzae



شکل۳. الگوهای برش محصولات PCR همگانی دو باکتری: Staphylococcus aureus و Staphylococcus epidermidis که به وسیله آنزیم محدود کننده MnlI مورد هضم آنزیمی قرار گرفته‌اند.

ستون ۱: Staphylococcus epidermidis

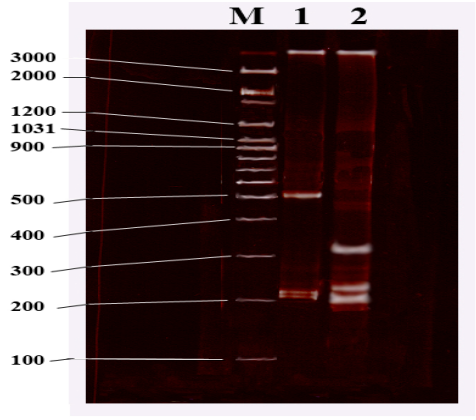
ستون ۲: Staphylococcus aureus



شکل۴. الگو ی برش محصولات PCR همگانی با کتری‌های Escherichia coli و Klebsiella pneumoniae که به وسیله آنزیم محدود کننده (Bsp119I(AsuII مورد هضم آنزیمی قرار گرفته‌اند.

ستون ۱:Escherichia coli

ستون ۲:Klebsiella pneumoniae



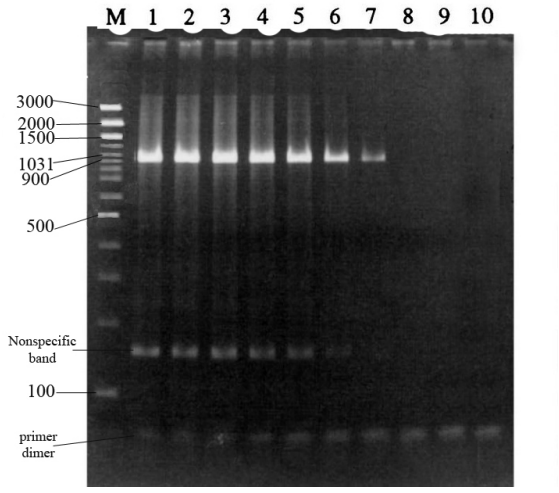
شکل ۵. الگو های برش محصولات PCR همگانی با کتری‌های Streptococcus pneumoniae و Enterococcus faecali که به وسیله آنزیم محدود کننده AluI مورد هضم آنزیمی قرار گرفته‌اند.

ستون ۱:Streptococcus pneumoniae

ستون۲: Enterococcus faecalis

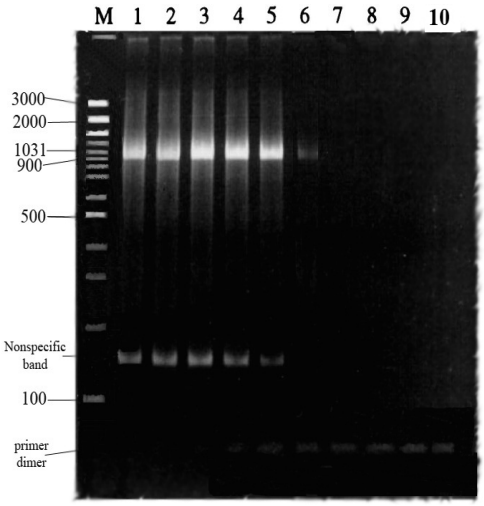
www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۶. تعیین میزان حساسیت PCR همگانی برای باکتری‌های گرم منفی.

ستون M در سمت چپ اندازه مولکولی استاندارد برحسب جفت باز آلی می‌باشد. در زیر باند۹۹۶bp ستون‌های ۱ تا ۷ یک باند حدود ۱۵۰bp نیز دیده می‌شود که احتمالاً نتیجه تکثیر غیراختصاصی می‌باشد. در ضمن باند دیگری که در حدود ۵۰bp می‌باشد نیز در برخی از ستون‌ها مشاهده می‌شود که مربوط به تشکیل دایمر پرایمرها در خلال واکنش PCR می‌باشد.



شکل ۷. تعیین میزان حساسیت PCR همگانی برای باکتری‌های گرم مثبت.

ستون M در سمت چپ اندازه مولکولی استاندارد بر حسب جفت باز آلی می‌باشد. در زیر باند bp ۹۹۶ ستون‌های ۱تا ۶ یک باند حدود bp ۵۰ نیز دیده می‌شود که احتمالاً نتیجه تکثیر غیراختصاصی می‌باشد. در ضمن باند دیگری که در حدود bp ۵۰ می‌باشد نیز در برخی از ستون‌ها مشاهده می‌شود که مربوط به تشکیل دایمر پرایمرها در خلال واکنش PCR می‌باشد.

برای تعیین اینکه آیا محصولات PCR از ایزوله‌های مختلف هر یک از سوش های فوق دارای الگوی RFLP یکسانی هستند بر روی ایزوله‌های متعددی از هر سوش (۱۰ ایزوله از Escherichia coli ، ۴ ایزوله از Haemophilus influenzae، ۶ ایزوله از *Staphylococcus aureus*، ۳ ایزوله از Staphylococcus epidermidis، ۲ ایزوله از *Klebsiella pneumoniae* ، ۵ ایزوله از *Pseudomonas aeruginosa*، ۳ ایزوله از *Streptococcus pyogenes*، ۲ ایزوله از *Streptococcus pneumoniae* و ۲ ایزوله از *Enterococcus faecails*) واکنش هضم آنزیمی با آنزیم محدودالاثر BsuRI انجام گرفت و مشاهده شد که ایزوله‌های مختلف یک سوش باکتریایی دارای الگوی برشی یکسانی هستند. برای تعیین حساسیت PCR ، از محیط کشتLB دو سوش باکتریایی *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 و *Escherichia coli* ATCC 25922 ، سری رقتی (*Serial dilution*) تا حصول نتیجه منفی PCR تهیه شد سپس از هر کدام از نمونه‌های رقیق شده واکنش PCR مستقیم انجام گرفت.

در این تحقیق ما توانستیم تعداد ۱۰۰ باکتری E.coli را مورد شناسایی قرار دهیم. برای این منظور ۱۰ سری رقت از باکتری *Escherichia coli* با PCR همگانی مورد تکثیر قرارگرفت، و محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شدند.

نتایج نشان می‌دهد که *Escherichia coli* تا تعداد ۱۰۰ باکتری (از ستون ۱ تا ستون ۷ شکل ۶) قابل تشخیص و شناسایی است. نتایج مربوط به ستون ۸ برای حدود ۱۰ باکتری و ستون ۹ برای حدود یک باکتری می‌باشد و در ستون دهم هیچ باکتری وجود ندارد. بنابراین چون واکنش PCR برای ستون ۱ تا ۷ مثبت شده آخرین تعداد باکتری قابل تشخیص در این تحقیق (به عنوان حساسیت این روش) ۱۰۰ عدد باکتری برای باکتری‌های گرم منفی (مثل:*Escherichia coli*) می‌باشد. در ضمن ما در این تحقیق توانستیم حدود ۵۰۰ باکتری برای *S.aureus* را تشخیص دهیم (شکل۷). این آزمایشات تا ۳ بار مجدداً تکرار شده و نتایج هر سه بار آزمایش یکسان بود. برای تعیین دقت این PCR همگانی، بر روی ۵۰ نمونه کلینیکی که هر کدام حاوی یکی از ۹ باکتری فوق بودند، واکنش PCR انجام شد که در نهایت ۴۶ نمونه از ۵۰ نمونه فوق با

www.SID.ir

Archive of SID

این روش قابل تشخیص بودند.

بحـــث

این تحقیق با هدف توسعه یک روش سریع و حساس جهت تشخیص و تعیین هویت باکتری‌های بیماریزای شایع در مایعات بدن با استفاده از روش Universal PCR طراحی شد. اساس تشخیص، تکثیر منطقه‌ای از ژن کد کننده ۱۶S rRNA است. هر چند محصول PCR برای تمامی باکتری‌های مورد مطالعه دارای اندازه یکسان است (۹۹۶bP) ولی وجود مناطق کاملاً متفاوت در طول ژن در باکتریهای مختلف باعث می‌شود که الگوی برش آنها توسط یک یا چند آنزیم از هم متفاوت باشند که شناسایی آنها عامل تشخیص دقیق پاتوژن می‌باشد. در سالهای اخیر ، استفاده ازPCR همگانی در تکثیر ناحیه‌ای از توالی خاصی از مولکول DNA در تشخیص باکتری‌های مختلف، گزارش شده است. (۹،۵-۱۱) در اغلب این تحقیقات از یک یا چند جفت پرایمر جهت تکثیر منطقه یا مناطق خاصی از یک DNA و به دنبال آن از تعیین توالی محصول PCR یا استفاده از پروب اختصاصی برای تشخیص و تعیین هویت باکتری‌های مورد نظر استفاده شده است. در تحقیق حاضر ما از یک جفت پرایمر جهت تکثیر ژن ۱۶S rRNA استفاده کردیم و متعاقب آن از آنالیز هضم آنزیمی جهت تعیین هویت باکتری‌ها، سود جستیم. ۴۶ نمونه از ۵۰ نمونه کلینیکی که حاوی هر یک از ۹ باکتری مذکور بودند، با استفاده از این روش PCR همگانی، قابل تشخیص بودند که در مقایسه با روش کشت حساسیت ۹۲٪ را نشان می‌دهد. شایان ذکر است که وجود موتاسیون در مناطقی از ژن که مورد شناسایی آنزیم‌های محدودالاثر هستند احتمالاً دلیل افت ۸٪ در صدی دقت روش حاضر می‌باشند. این روش به طرز مثبتی در تشخیص موتانهای باکتریهای شناخته شده نیز قابل استفاده است. این روش دارای طیف حساسیت ۵۰۰-۱۰۰ باکتری به ترتیب برای باکتریهای گرم منفی مانند Escherichia coli و گرم مثبت مانند Staphylococcus aureus می‌باشد. با وجود این که تشخیص باکتری‌های بیماریزا در سرم یا خون بوسیله روش PCR ، چندین بار تاکنون گزارش شده است (۱۳-۱۵) اما روش PCR همگانی که در این تحقیق به کار گرفته شده است به دو دلیل حساسیت لازم و کافی برای نمونه‌های خون را به طور مستقیم ندارد. دلیل اول اینکه تعداد باکتری در خون معمولاً بسیار پایین است (چه برای باکتری‌های گرم مثبت و چه برای باکتری‌های گرم منفی حتی در حالت باکتریمی شدید، معمولاً تعداد باکتری‌ها کمتر از یک CFU/ml می‌باشد). (۱۶) دلیل دوم اینکه در مایع خون همیشه ممانعت کننده‌های گوناگونی (Inhibitors) وجود دارند که سبب اختلال در کار PCR می‌شود. لذا این روش به بهینه‌سازی بیشتری نیاز دارد تا بتوان از آن برای تشخیص و تعیین هویت نمونه‌های کلینیکی خون به طور مستقیم بهره جست. علت حساسیت کمتر این روش برای باکتری‌های گرم مثبت می‌تواند مربوط به دیواره سخت باکتری‌های گرم مثبت باشد که باعث می‌شود لیز باکتری به طور کامل انجام نگیرد و به تبع آن میزان DNA الگوی تخلیص شده کمتر بوده و در نتیجه نیاز به تعداد باکتری بیشتری جهت تشخیص با این روش می‌با شد.

نتیجه‌گیری. در پایان لازم به ذکر است که هر چند به کار بردن این روش نسبت به روش کشت سنتی هزینه بیشتری دارد، اما به دلیل اینکه سریعتر از روش‌های متداول می‌باشد لذا سبب می‌گردد که استفاده غیر ضروری از درمان با آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف به حداقل ممکن برسد. در نتیجه روش PCR همگانی به همراه آنالیز هضم آنزیمی (PCR-RFLP) به عنوان یک روش سریع جهت تشخیص و تعیین هویت باکتری‌های بیماریزای شایع پیشنهاد می‌گردد.

References

1. Leibovici L, Konisberger H, Pitlik SD, Samra Z, Drucker M. Bacteremia and fungemia of unknown origin in adults. Clin Infect Dis 1992; 14: 436–443.

2. Washington JAII, Ilstrup DM. Blood cultures: issues and controversies. Rev Infect Dis. 1986; 8: 792–802.

3.Weinstein MP, Murphy JR, Reller LB, Lichtenstein KA. The clinical significance of positive blood

www.SID.ir

Archive of SID

cultures: a comprehensive analysis of 500 episodes of bacteremia and fungemia in adults. II.Clinical observations, with emphasis on factors influencing prognosis. Rev Infect Dis 1983; 5: 54–70.

4. Greisen K, Loeffelholz M, Purohit A, Leong D. PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria,including bacteria found in cerebrospinal fluid. J Clin Microbiol 1994; 32: 335–351.

5. Radstrom P, Backman A, Qian N, Kragssbjerg P, Pahlson C, Olcen P. Detection of bacterial DNA in cerebrospinal fluid by an assay for simultaneous detection of Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae,and streptococci using a seminested PCR strategy. J Clin Microbiol 1994; 32: 2738–44.

6. Sambrook J. Moleculor Cloning, A laboratory Manual, edited by. Russell DW. New York, Coldspring Harbor Laboratory Press 2001; chapter 1: 31-34.

7. Rapley R.The nucleic acid protocols Handbook. Totowa NJ. Humana Press 2000; 29-36.

8. Zynkind JW, Bernsrtein S. Rcombinant DNA laboratory manual, protocols. San Diego: Academic Press 1992;12-15.

9. Bottger EC. Rapid determination of bacterial ribosomal RNA sequences by direct sequencing of enzymatically amplified DNA. FEMS Microbiol lett 1989; 65: 171–176.

10. Lane DJ, Pace B, Olsen GJ, Stahl DA, Sogin ML, Pace NR. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. Proc Natl Acad Sci USA 1985; 82: 6955–9.

11. Wilson KH, Blitchington RB, Greene RC. Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1990; 28: 1942–6.

12. 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 Pathogenes in CSF. J Clin Microbiol 2000; 38: 2076-80.

13. Iralu JV, Sritharan VK, Pieciak WS, Wirth DF, Maguire JH, Barker RH. Diagnosis of Mycobacterium avium bacteremia by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1993; 31: 1811–4.

14. Rudolph KM., Parkinson AJ, Black CM, Mayer LW. Evaluation of polymerase chain reaction for diagnosis of pneumococcal pneumonia. J Clin Microbiol 1993; 31: 2661–6.

15. Zhang Y, Isaacman DJ, Wadowsky RM, White JR, Post JC, Ehrlich GD. Detection of Streptococcus pneumoniae in whole blood by PCR. J Clin Microbiol 1995; 33: 596–601.

16. Henry NK, McLimans CA, Wright AJ, Thompson RL, Wilson WR, JA Washington II Microbiological and clinical evaluation of the ISOLATOR lysis-centrifugation blood culture tube. J Clin Microbiol 1983; 17: 864–869.

17. Matto J, Saarela M, Alauusua S. Detection of porphyromonas gingivalis form savila by PCR by using a simple-processing method. J Clin Microbiol 1998; 136: 156-157.

18. Warsen AE, Krug MJ, LaFrentz S, Stanek DR. Loge FJ, Call DR. Simultaneous Discrimination

www.SID.ir

Archive of SID

between 15 Fish Pathogens by Using16S Ribosomal DNA PCR and DNA Microarrays Appl Envir. microbiol 2004; 70: 4216–21.

19. Rahmani S, Forozandeh M, Mousavi ML, Rezaee A. Detection of bacteria by Amplification 16srRNA gene with universal primers and RFLP. Med J IR IRIB 2006; 14: 333-336.

www.SID.ir