مقاله تحقیقاتی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ارتش جمهوری اسلامی ایران

سال دهم ● شماره ۱ ● صفحات ۱۰ تا ۱۶ ● بهار ۱۳۹۱

طراحی آزمون زنجیره‌ای پلی مراز (PCR) جهت تشخیص مولکولی سریع *Neisseria meningitidis*

زکیه قدیمی[۱]، محمد سلیمانی[۲]، امیر حسین محسنی[۳]، *کیوان مجیدزاده[۴]

تاریخ اعلام وصول: ۹۰/۷/۱۱ تاریخ اعلام قبولی مقاله: ۹۰/۱۰/۱۲

چکیده

سابقه و هدف: نایسریا منتژیتیدیس پاتوژن اختصاصی انسان و دومین عامل شایع منتژیت در جهان است. جهت شناسایی این باکتری از آزمون‌های سنتی مانند کشت مایع نخاعی استفاده می‌شود ولی از معایب این روش‌ها وقت گیر بودن است. هدف این مطالعه، تشخیص سریع این باکتری به روش واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (PCR) با استفاده از ژن CrgA است.

مواد و روش‌ها: ژن اختصاصی، حفاظت شده و دارای ارزش تشخیصی *CrgA* جهت طراحی پرایمر انتخاب گردید. پرایمرهای اختصاصی برای این ژن طراحی شد. واکنش PCR توسط این پرایمرها بر روی DNA ژنومیک نایسریا منتژیتیدیس راه اندازی شد. جهت ساخت کنترل مثبت، محصول PCR در وکتورpTZ5VR/T کلون گردید. جهت تایید حضور ژن هدف در وکتور، روش هضم آنزیمی و توالی یابی انجام شد. به منظور تعیین حساسیت واکنش، از پلاسمید کنترل مثبت فوق با غلظت اولیه ۷۰ نانوگرم رقت 10^{-1} – 10^{-5} تهیه گردید و واکنش PCR ژن هدف بر روی همه رقت‌های پلاسمید انجام گرفت. تعیین ویژگی واکنش، بر روی ۱۱ ژنوم از باکتری‌های مختلف انجام شد.

یافته‌ها: نتایج PCR ژن *CrgA* باند مورد انتظار ۵۰۰ جفت باز را نشان داد. نتایج حاصل از هضم آنزیمی و توالی یابی، حضور ژن هدف را در وکتور تایید کرد. حد نهایی تشخیص این روش برای ژن *CrgA*، ۷۰ پیکوگرم به دست آمد. نتایج تعیین ویژگی مشخص نمود که پرایمر طراحی شده با هیچ یک از باکتری‌های دیگر واکنش تکثیر غیر اختصاصی ندارد.

بحث و نتیجه‌گیری: روش PCR طراحی شده در این تحقیق از دقت و حساسیت لازم برخوردار است به طوری که از این روش می‌توان به عنوان یک آزمون قابل اعتماد، جهت تشخیص سریع باکتری نایسریا منتژیتیدیس استفاده نمود.

کلمات کلیدی: نایسریا منتژیتیدیس، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، تشخیص سریع مولکولی

مقدمه

نایسریا منتژیتیدیس یک باکتری دیپلوکوک گرم منفی، چرک زا، هتروتروف و فاقد اسپور است (۱). این باکتری پاتوژن اختصاصی انسان در سرتاسر جهان می‌باشد و به خاطر نقشش در ایجاد منتژیت معروف شده است (۱، ۲). عامل منتژیت از طریق ترشح‌های حلق بینی از یک بیمار یا حامل منتقل می‌شود و انتقال اغلب به تماس نزدیک و مستقیم احتیاج دارد (۱، ۳). نایسریا منتژیتیدیس عامل مهم ابتلا و مرگ در دوران کودکی در کشورهای توسعه یافته و مسئول همه گیری‌ها در آفریقا و آسیا می‌باشد و بیشترین شیوع در میان افراد ارتشی در گروه‌های آموزشی و در خوابگاه‌ها دیده

۱ـ پژوهشگر، ایران، قم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، گروه میکروبیولوژی

۲ـ استادیار، ایران، قم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، گروه میکروبیولوژی

۳ـ پژوهشگر، ایران، تهران، دانشگاه علوم پزشکی آجا، مرکز تحقیقات زیست فناوری تسنیم

۴ـ استادیار، ایران، تهران، دانشگاه علوم پزشکی آجا، مرکز تحقیقات زیست فناوری تسنیم (*نویسنده مسئول)

تلفن: ۰۲۱-۸۸۳۳۷۹۲۸ آدرس الکترونیک: k-majidZadeh@armyums.ac.ir

www.SID.ir

شده است. همچنین این بیماری در ایران به خصوص در سربازانی که واکسن دریافت ننموده‌اند مشاهده شده است و هر ساله حدود ۲۰۰۰ مورد جدید مبتلا به منتژیت از طریق مراکز بهداشتی و بیمارستان‌های سطح کشور گزارش می‌شود که حدود ۱۰٪ آن، منتژیت منگوکوکی است (۴، ۵).

مهم‌ترین روش سنتی آزمایشگاهی در تشخیص منتژیت در فرد مبتلا آنالیز بیوشیمیایی، سلول شناسی و کشت مایع نخاعی می‌باشد (۶، ۷). افزایش گلبول‌های سفید و پروتئین مایع نخاعی و کاهش قند آن از جمله دلایل اولیه وجود منتژیت چرکی است که تأیید نهایی آن پس از کشت و جداسازی باکتری صورت می‌گیرد (۱، ۸). این باکتری بسیار حساس بوده و در صورت تجویز آنتی بیوتیک قبل از نمونه‌گیری، ویژگی کشت به شدت کاهش می‌یابد (۷)، به علاوه تشخیص با این روش حداقل ۳۶ ساعت طول می‌کشد، در حالی که عدم تشخیص و درمان به موقع در مدت ۱۲ ساعت موجب مرگ بیمار می‌شود (۱). بسیاری از محققین تلاش نموده‌اند تا روش‌های سریع و دقیقی را برای تشخیص عوامل ایجاد کننده منتژیت با استفاده از روش‌های ایمونولوژی ارائه دهند، اما این روش‌ها به تنهایی یا با هم به طور کامل رضایت بخش نبوده است (۹). در سال‌های اخیر، نظر به ضرورت تشخیص سریع این بیماری، استفاده از فناوری‌های ژنی و تکنیک‌های تشخیص مولکولی امیدهایی در تشخیص سریع آن به وجود آمده است. یکی از مزایای این روش این است که تحت تاثیر درمان آنتی بیوتیکی قرار نمی‌گیرد (۱۰). از این رو هدف این مطالعه، طراحی تکنیک PCR جهت تشخیص سریع باکتری نایسریا منتژیتیدیس تعیین گردید.

مواد و روش‌ها

تهیه ژنوم باکتری: ژنوم سویه باکتری نایسریا منتژیتیدیس (ATCC ۱۳۰۶۰) از موسسه واکسن و سرم سازی رازی تهیه و از آن به عنوان کنترل مثبت در این تحقیق استفاده شد. جهت ارزیابی ویژگی واکنش، از ژنوم باکتری‌های دیگر به عنوان کنترل منفی استفاده گردید. مشخصات این عوامل در جدول ۱ آورده شده است.

طراحی پرایمر: ژن *CrgA* به عنوان ژن هدف در این مطالعه انتخاب و طراحی پرایمر بر اساس آن انجام گرفت. جهت طراحی پرایمر ابتدا با استفاده از سایت NCBI (National Center for Biotechnology Information)، توالی‌های ثبت شده ژن CrgA دریافت شد و ترازبندی آنها با استفاده از نرم افزار CLC sequence viewer (version ۶/۴) انجام شد. بر اساس ناحیه حفاظت شده در این توالی‌ها، پرایمرهای جلویی و عقبی طراحی شدند. ویژگی‌های ترمودینامیکی پرایمرهای طراحی شده با استفاده از نرم افزار Gene runner (version ۳/۰۵) مورد بررسی قرار گرفت. به منظور اطمینان از اختصاصی بودن پرایمرهای طراحی شده از سرویس BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) سایت NCBI استفاده شد. توالی پرایمر جلویی به صورت ۵´CGTGGATTCCGCGATGCCG ۳´ و توالی پرایمر عقبی به صورت ۵´CGGAGGTTTGTTCGGCGA GC ۳´ بود.

جدول ۱- نام باکتری‌های کنترل منفی مورد استفاده جهت تعیین ویژگی واکنش

نام ارگانیسم	شماره سویه
Shigella sonnei	ATCC ۹۲۹۰
Klebsiella pneumoniae	ATCC ۷۸۸۱
Escherichia coli	ATCC ۲۵۹۲۲
Bacillus subtilis	ATCC ۶۰۵۱
Staphylococcus aureus	ATCC ۲۵۹۲۳
Enterococcus faecalis	ATCC ۲۹۲۱۲
Salmonella typhi	ATCC ۷۰۰۹۳۱
Streptococcus penumoniea	ATCC ۷۰۰۶۶۹
Neisseria meningitidis	ATCC۱۳۰۶۰
Haemophilus influenzae	ATCC ۱۳۰۳۲
Yersinia enterocolitica	PTCC ۱۴۸۰

راه اندازی واکنش زنجیره‌ای پلی مراز: واکنش PCR جهت تشخیص ژن *Crg A* در حجم استاندارد ۲۵ میکرولیتر انجام شد. برای انجام واکنش PCR در این حجم، از ۱/۵ میلی مولار یون کلرید منیزیم، ۰/۲ میلی مولار dNTPs، ۱ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase، ۰/۴ میکرومولار از هر یک از پرایمرها و ۷۰ نانوگرم ژنوم باکتری نایسریا منتژیتیدیس، استفاده شد. PCR مطابق شرایط زیر انجام شد: واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴ دقیقه، ۳۰ سیکل شامل واسرشت سازی در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۷۱/۶ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ ثانیه، مرحله تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه. همچنین یک واکنش ۲۵ میکرولیتری با شرایط مشابه و استفاده از آب دیونیزه به جای ژنوم باکتری، به عنوان کنترل منفی

Archive of SID
www.SID.ir

استفاده شد. جهت بررسی تکثیر قطعه مورد نظر، نمونه به همراه بافر لود کننده بر روی ژل آگارز ۱ درصد حاوی اتیدیوم بروماید، به همراه مارکر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی (Fermentas) در ولتاژ ۱۰۰ ولت، الکتروفورز گردید.

کلونینگ ژن *CrgA* و تهیه کنترل مثبت: جهت ساخت کنترل مثبت، کلونینگ محصول PCR ژن *CrgA* در وکتور pTZ۵۷R/T انجام شد. برای این منظور ابتدا محصول PCR با استفاده از دستور العمل کیت ACCU Prep PCR Purification Kit (BIONEER, Korea) خالص سازی شد. سپس واکنش اتصال میان محصول PCR خالص شده ژن *CrgA* و وکتور pTZ۵۷R/T مطابق با دستورالعمل کیت (Fermentas, Litwani) InsTAclone PCR cloning kit انجام گرفت. محصول واکنش اتصال به باکتری *Ecoli* JM۱۰۷ که از قبل بوسیله $CaCl_2$، پذیرا شده بود انتقال داده شد. در نهایت باکتری‌های ترانسفورم شده در محیط LB آگار حاوی آمپی سیلین (۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر)، نالیدیکسیک اسید (۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر) و ۵- برومو ۴- کلرو ۳- ایندولیل بتا دی گالاکتوپیرانوزید (X-Gal) (۴۰ میکروگرم بر میلی لیتر)، ایزوپروپیل بتا دی تیو گالاکتو پیرانوزید (IPTG) (۳۸/۴ میکروگرم بر میلی لیتر) منتقل شد. در ادامه از تعدادی کلون‌های سفید و آبی که بر روی محیط رشد کرده بود ماتریکس تهیه گردید. جهت ردیابی کلون‌های حاوی ژن هدف بر روی ۴ کلونی سفید و یک کلونی آبی، کلنی PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *CrgA* انجام شد. از یکی از کلونی‌های سفید تایید شده در مرحله قبل، استخراج پلاسمید مطابق با استفاده از کیت ACCU Prep Plasmid Mini Extraction Kit (BIONEER ,Korea) انجام گردید. غلظت پلاسمید استخراج شده با استفاده از جذب نوری در طول موج‌های ۲۸۰-۲۶۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (شرکت پیکودراپ) مشخص گردید. پلاسمید حاصل pTZ۵۷R/T-*CrgA* نامگذاری شد. جهت تایید حضور ژن *CrgA* در وکتور pTZ۵۷R/T-Crg A، روش هضم آنزیمی با استفاده از ۲ آنزیم (Fermentas,Litwani) Hind III و kpnI (TaKaR , Litwani) انجام شد. آنزیم Kpn I در ناحیه جفت بازی ۶۳۱- ۶۲۷ و آنزیم HindIII در ناحیه جفت بازی ۶۹۴- ۶۹۰ باعث ایجاد برش در ناحیه کلونینگ چند گانه (Multiple cloning site) وکتور می‌شود و در نهایت سبب خروج ژن هدف از وکتور می‌شود. جهت تایید نهایی حضور ژن *CrgA* در وکتور pTZ۵۷R/T-*CrgA*، این وکتور با استفاده از پرایمرهای یونیورسال M۱۳ با روش Cycle sequencing توالی یابی شد.

تعیین حساسیت روش: جهت تعیین حساسیت، ابتدا غلظت پلاسمید کنترل مثبت (pTZ۵۷R/T-*Crg A*) با استفاده از دستگاه پیکودراپ مشخص گردید. سپس رقت‌های متوالی 10^{-1} - 10^{-5} در حجم ۱۰۰ ماکرولیتر از نمونه کنترل مثبت که دارای غلظت اولیه ۷۰ نانوگرم بود، تهیه شد و تست PCR تشخیصی مطابق شرایط ذکر شده بر روی آنها انجام شد. در نهایت کمترین غلظت از آن که باند واضح و مشخصی را در الکتروفورز روی ژل آگارز نشان داد به عنوان حد تشخیص آزمون تعیین شد.

تعیین ویژگی واکنش: جهت بررسی ویژگی واکنش، از ژنوم تعداد ۱۱ باکتری گرم منفی و گرم مثبت مختلف استفاده شد. (جدول ۱) واکنش PCR بر روی این ژنوم‌ها با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *CrgA*، مطابق با شرایط قبلی انجام و نتایج آن بر روی ژل آگارز ۱٪ بررسی شد.

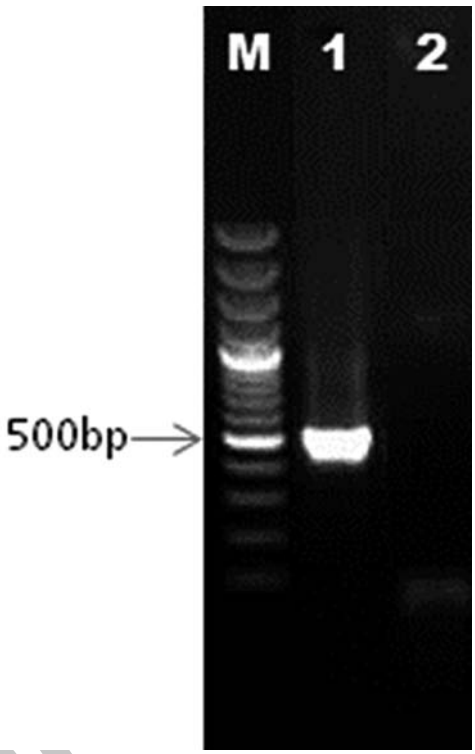
یافته‌ها

تکثیر ژن *CrgA*: نتایج الکتروفورز مربوط به واکنش PCR ژن *CrgA* باند مورد انتظار ۵۰۰ جفت باز را نشان داد. در واکنش PCR مربوط به نمونه کنترل منفی هیچ باندی در ژل آگارز مشاهده نشد. این نتیجه صحت واکنش PCR را تایید نمود. (شکل ۱)

کلونینگ و تهیه کنترل مثبت: نتایج الکتروفورز واکنش کلونی PCR بر روی کلنی‌های سفید به دست آمده، کلونینگ ژن *Crg A* را در وکتور pTZ۵۷R/T را نشان داد. پس از استخراج پلاسمید از یکی از کلونی‌های سفید تایید شده در مرحله قبل، واکنش هضم آنزیمی پلاسمید PTZ۵۷R/T-*Crg A* به وسیله آنزیم‌های KpnI و HindIII، خروج یک قطعه در حدود ۵۰۰ جفت بازی را بر روی ژل آگارز نشان داد. این نتیجه تایید کننده حضور ژن Crg A در وکتور بود. بررسی نتایج توالی یابی ترادف ژن CrgA در وکتور pTZ۵۷R/T-Crg A و مقایسه آن با ترادف‌های ثبت شده این ژن در Gene bank با استفاده از سرویس BLAST سایت NCBI، تشابه کامل این توالی را با ژن هدف نشان داد. (نتایج تعیین ترادف نشان داده نشده است)

بررسی حساسیت واکنش: غلظت اولیه پلاسمید pTZ۵۷R/T-*CrgA* در آزمایشات تعیین حساسیت، ۷۰ نانوگرم بود که با تهیه رقت از

Archive of SID
www.SID.ir



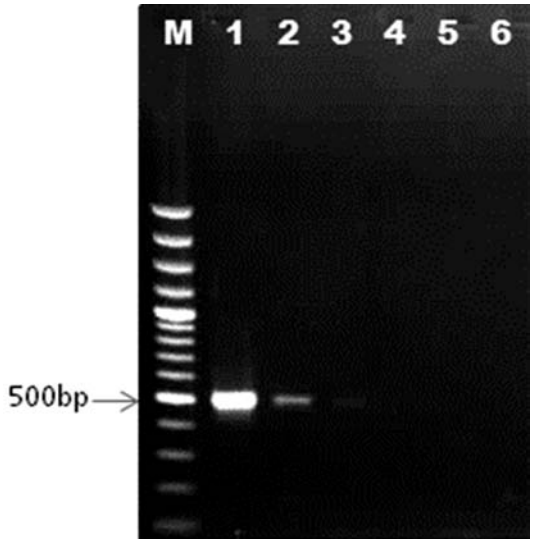
شکل ۱- نتایج واکنش PCR بر روی ژن *CrgA* باکتری نایسریا منتژیتیدیس. این نتایج نشان داد که پرایمرهای اختصاصی این ژن توانسته‌اند قطعه مورد انتظار ۵۰۰ جفت باز را تکثیر دهند. M: شاخص مولکولی ۱۰۰ جفت بازی؛ چاهک ۱: نتایج PCR بر روی ژنوم باکتری نایسریا منتژیتیدیس با غلظت ۷۰ نانوگرم؛ چاهک ۲: کنترل منفی PCR.

آن و انجام واکنش PCR، آخرین رقتی از آن که باند واضحی را بر روی ژل آگارز ایجاد نمود، 10^{-3} بود. (شکل ۲) بنابراین حد تشخیص این آزمون، ۷۰ پیکوگرم به دست آمد.

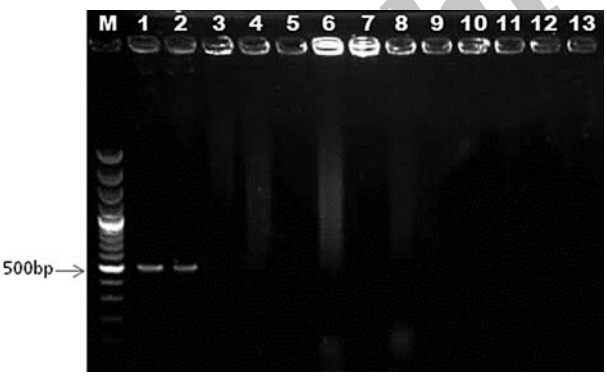
بررسی ویژگی واکنش: نتایج تعیین ویژگی واکنش، هیچ گونه تکثیری را در PCR بر روی ژنوم باکتری‌های کنترل منفی نشان نداد. این آزمایش تایید کننده ویژگی واکنش PCR فوق بود. (شکل ۳)

بحث

باکتری نایسریا منتژیتیدیس یک بیماری مهم و خطرناک سیستم عصبی- مرکزی است و در اثر عفونی شدن لایه‌های سه گانه منتژ ایجاد می‌شود (۱، ۲). منتژیت باکتریایی به خصوص منتگوکوکی یکی از عفونت‌های تهدید کننده حیات انسان در تمام سنین است و دومین عامل شایع منتژیت در جهان می‌باشد (۱، ۳). میزان انتقال این بیماری در افراد ۴۰-۹۰ درصد گزارش شده است (۱). در ایران با وجود واکسیناسیون الزامی علیه منتژیت منتگوکوکی، گزارش‌های



شکل۲- نتایج مربوط به تعیین حساسیت واکنش، با توجه به شکل، حد تشخیص واکنش ۷۰۰ پیکوگرم به دست آمد. M: شاخص مولکولی ۱۰۰ جفت باز؛ چاهک ۱: محصول واکنش PCR بر روی غلظت ۷ نانوگرم از پلاسمید *pTZ۵۷R/T- CrgA*؛ چاهک ۲: محصول واکنش PCR بر روی غلظت ۷۰۰ پیکوگرم؛ چاهک ۳: محصول واکنش PCR بر روی غلظت ۷۰ پیکوگرم؛ چاهک ۴: محصول واکنش PCR بر روی غلظت ۷ پیکوگرم؛ چاهک ۵: محصول واکنش PCR بر روی غلظت ۰/۷ پیکوگرم؛ چاهک ۶: کنترل منفی.



شکل ۳- نتایج مربوط به تعیین ویژگی واکنش PCR. M: شاخص مولکولی ۱۰۰ جفت بازی؛ چاهک ۱: واکنش PCR مربوط به ژنوم باکتری نایسریا منتژیتیدیس؛ چاهک ۲: واکنش PCR مربوط به پلاسمید *pTZ۵۷R/T- CrgA*؛ چاهک ۳: واکنش PCR مربوط به ژنوم باکتری کلبسیلا پنومونیه؛ چاهک ۴: واکنش PCR مربوط به ژنوم باکتری اشرشیا کولی؛ چاهک ۵: واکنش PCR مربوط به ژنوم باکتری باسیلوس سوبتیلیس؛ چاهک ۶: واکنش PCR مربوط به ژنوم باکتری استافیلوکوکوس اورئوس؛ چاهک ۷: واکنش PCR مربوط به ژنوم باکتری انتروکوکوس فکالیس؛ چاهک ۸: واکنش PCR مربوط به ژنوم باکتری شیگلا سونئی؛ چاهک ۹: واکنش PCR مربوط به ژنوم باکتری سالمونلا تیفی؛ چاهک ۱۰: واکنش PCR مربوط به ژنوم باکتری استرپتوکوکوس پنومونیه؛ چاهک ۱۱: واکنش PCR مربوط به ژنوم باکتری هموفیلوس آنفولانزا؛ چاهک ۱۲: واکنش PCR مربوط به ژنوم باکتری یرسینا انتروکولیتیکا؛ چاهک ۱۳: کنترل منفی.

www.SID.ir

پراکنده‌ای از بروز این بیماری در بین سربازان وظیفه گزارش شده است و نیز به علت عدم وجود واکسن موثر برای سروگروه B، این سروگروه عامل مهم ابتلا به این بیماری محسوب می‌شود (۴).

روش‌های مختلفی مانند کشت و آنالیز مایع نخاعی برای تشخیص این باکتری استفاده می‌شود که هر کدام دارای معایبی به شرح زیر می‌باشد: زمان طولانی مورد نیاز، حساسیت و ویژگی کم، واکنش‌های مثبت یا منفی کاذب و نیاز به افراد مجرب، با این که روش‌هایی از جمله استفاده از رنگ آمیزی گرم برای تشخیص این باکتری در نمونه‌های مغزی نخاعی به طور مستقیم یک روش ساده، ارزان و سریع برای تشخیص است و در ۷۵ تا ۹۰ درصد موارد جواب مثبت است اما در مواردی که قبل از نمونه برداری، درمان آنتی‌بیوتیکی شروع شده باشد، این میزان تا ۴۰ درصد کاهش می‌یابد. بنابراین این روش‌ها اغلب روش اطمینان بخشی برای تشخیص این باکتری نیستند (۱۷).

امروزه روش‌های متداول مانند PCR به طور وسیعی در تشخیص طیف گسترده‌ای از عوامل بیولوژیک استفاده می‌شود (۲۳). زیرا این روش‌ها نسبت به روش‌های سنتی از سرعت، دقت، اختصاصیت و حساسیت بالایی برخوردار است. از آنجایی که در کشور ایران شیوع بیماری منژیت منگوکوکال در افراد نظامی و کودکان به نسبت بالا است (۴، ۵) و با توجه به نقاط ضعف روش‌های سنتی، در این مطالعه روش PCR به منظور تشخیص سریع و دقیق نایسریا منژیتیدیس راه اندازی شد.

در تحقیقاتی که توسط نی و همکارانش در سال ۱۹۹۲ با استفاده از روش PCR بر روی ژن *porA* انجام دادند، حساسیت PCR برای تشخیص این باکتری را ۹۱ درصد اعلام نمودند (۱۱)، این در حالی است که رادستروم و همکارانش در سال ۱۹۹۴ با انجام PCR بر روی ژن *۱۶srRNA*، میزان حساسیت را ۹۱ درصد و میزان اختصاصیت را ۹۶ درصد گزارش نموده‌اند (۱۲) هر چند آنها با نتایج مثبت کاذب هم مواجه بوده‌اند (۲۳). همچنین ژن *۱۶SrRNA* به دلیل آن که تحت تاثیر موتاسیون در طی تکامل قرار گرفته است ژنی مناسب جهت شناسایی این باکتری نمی‌باشد (۸).

دیویس و همکارانش در سال ۱۹۹۹ با استفاده از روش PCR، ژن‌های *por B*، *por A* و *sia D* را جهت شناسایی باکتری نایسریا منژیتیدیس بررسی کردند. آن‌ها به این نتیجه رسیدند که ژن *siaD* کد کننده کپسول پلی سیالیل ترنسفراز) در شناسایی گروه بندی ژنی و سروگروه‌های حاوی سیالیک اسید (B، C، Y، W۱۳۵) نقش دارد (۱۴). تکثیر ژن *porA* (کد کننده پروتئین غشای خارجی کلاس ۱) توسط این روش باعث تشخیص سروساب تایپ‌های نایسریا منژیتیدیس می‌شود. ژن *por B* نیز در تشخیص ساب تایپ‌های نایسریا منژیتیدیس کاربرد دارد (۸). دزیره و همکارانش در سال ۲۰۰۴ با انجام PCR بر روی ژن *ctr A* کد کننده پروتئین غشای خارجی است و در انتقال کپسول دخالت دارد)، از آن در تشخیص نایسریا منژیتیدیس استفاده کردند زیرا این ژن در مقایسه با ژن *sia D* قادر به تشخیص سروگروه‌های بیشتری است (۱۰). با این حال ژن ctr A فقط باعث تشخیص سروگروه‌های خاصی مانند A، B، C، W۱۳۵، X، Z، E۲۹ می‌شود و تشخیص همه سروگروه‌ها را موجب نمی‌شود (۱۵). در مطالعه‌ای که جوردنس و همکارانش در سال ۲۰۰۵ انجام دادند با مقایسه ژن *ctr A* و *por A* نشان دادند که ژن *ctr A* قادر به تشخیص کل سویه‌های نایسریا منژیتیدیس نمی‌باشد (۱۶). این ژن دارای انتهای ′۵ متغیر و همچنین دارای توالی‌های متفاوت در سروگروه‌های مختلف منگوکوک است که نشان دهنده نقطه ضعف در تشخیص دقیق نایسریا منژیتیدیس می‌باشد (۱۳). درتحقیقی که توسط بیرتلس و همکارانش درسال ۲۰۰۵ انجام شد، نشان دادند که در بیش از ۴۰ درصد عفونت‌های ناشی از نایسریا منژیتیدیس که با استفاده از PCR مورد تأیید قرار گرفته، میکروارگانیسم‌های دیگری از این نمونه‌ها جدا نشده است که دلالت برحساسیت این روش دارد (۱۴). در سال ۲۰۰۵ دانشمندان به امکان استفاده از ژن *Crg A* جهت تشخیص نایسریا منژیتیدیس پی بردند و متوجه شدند که این ژن دارای مزایای مناسبی از جمله ناحیه ثابت و پایدار در همه سویه‌های این باکتری است که نسبت به ژن‌های دیگر جهت تشخیص این گونه مناسب‌تر می‌باشد (۱۵). کزانوپولوس و همکارانش نیز در سال ۲۰۰۵ با انجام PCR بر روی ژن *Crg A*، متوجه شدند که این ژن دارای ویژگی‌های مطلوب تری نسبت به سایر ژن‌ها جهت تشخیص نایسریا منژیتیدیس است، زیرا این ژن دارای ناحیه ثابت در کل سویه‌های نایسریا منژیتیدیس است و طراحی پرایمر بر اساس آن ایده آل است (۱۶). این ژن دارای اندازه ۲۳۰ جفت بازی و مربوط به خانواده lys R است. این خانواده از بزرگترین خانواده‌های تنظیم کننده باکتریایی است که

Archive of SID
www.SID.ir

نقش مهارکننده و فعال کننده خودکار را بر روی پروموتورهای هدف و همچنین کنترل اپرون‌ها را در رنج وسیعی از روش‌های سلولی دارد (۱۸). نقش ژن Crg A اتصال باکتری به سلول‌های اپیتلیال انسان است. در نتیجه حساسیت و اختصاصیت روش با استفاده از این ژن در تشخیص نایسریا منتژیتیدیس بسیار بالا است (۱۶، ۱۷). خیر طاها و همکارانش در سال ۲۰۰۷ از ژن *Crg A* در واکنش PCR استفاده کردند و نشان دادند که این ژن به عنوان یک پروتکل استاندارد جهت تشخیص نایسریا منتژیتیدیس می‌تواند استفاده شود (۱۷).

نگی و همکارانش در سال ۲۰۱۰ مطالعاتی را بر روی ژن *mynB/sac C* با کمک روش PCR انجام دادند (این ژن باعث پلی مریزاسیون N استیل D مانوز آمین فسفات می‌شود) و متوجه شدند که این ژن فقط باعث شناسایی سروگروه A می‌شود (۱۷). همچنین می‌توان از این ژن برای گروه بندی ژنی استفاده کرد (۲).

در نتیجه ژن‌هایی نظیر *por B*، *por A*، *sia D*، *myn B/sac C*، *ctr A*، *srRNA*۱۶ قادر به تشخیص کل سویه‌های نایسریا منتژیتیدیس نیستند. بنابراین با توجه به این نکات، در این مطالعه از تکثیر ژن Crg A به منظور تشخیص سریع نایسریا منتژیتیدس با استفاده از روش PCR استفاده گردید. در این مطالعه، ترازبندی توالی‌های ثبت شده از ژن *Crg A* به منظور یافتن نواحی ثابت جهت طراحی پرایمر انجام شد و قابلیت جفت پرایمرها جهت تشخیص انواع سویه‌های دارای این ژن تضمین شد.

در مطالعات مختلف جهت تعیین حساسیت از روش‌های متفاوتی استفاده می‌شود. یکی از این روش‌ها استفاده از باکتری زنده جهت تعیین حساسیت و دیگری استفاده از DNA ژنومیک باکتری موردنظر است. سعادتی و همکاران در سال ۱۳۸۷ برای تعیین حساسیت روش خود در تشخیص باکتری نایسریا منتژیتیدیس، از رقیق سازی باکتری زنده و کشت آن در محیط استفاده کردند و میزان حساسیت به دست آمده $۴/۵ \times ۱۰^{-۳}$ واحد تشکیل دهنده کلونی بر میلی لیتر (CFU/ml) بود (۲۳). همچنین عطایی و همکاران در سال ۱۳۸۸ جهت تعیین حساسیت واکنش، از رقت‌های متوالی از باکتری زنده و کشت آن در محیط استفاده کردند به‌طوری‌که نتایج آنها نشان داد، حد نهایی تشخیص $۳/۹ \times ۱۰^{۶}$ CFU/ml است (۲۲). از محدودیت‌های این روش علاوه بر وقت گیر بودن خطر آلودگی با با باکتری زنده نیز می‌باشد. در تحقیق حاضر جهت فائق آمدن بر این محدودیت‌ها محصول PCR ژن هدف در پلاسمید pTZ۵۷R/T کلون گردید و یک کنترل مثبت استاندارد ساخته شد و در ادامه از این پلاسمید، جهت تعیین حد نهایی تشخیص (LOD) استفاده گردید. نتایج حساسیت مطالعه حاضر نشان داد که کمترین غلظت از ژن هدف که به واسطه این پرایمرها قادر به تکثیر است، غلظت ۷۰ پیکوگرم می‌باشد. نتایج تعیین ویژگی واکنش نشان داد که پرایمرها با هیچ یک از باکتری‌های کنترل منفی دیگر واکنش متقاطع نمی‌دهند و کاملا در تشخیص ژن *Crg A* نایسریا منتژیتیدیس اختصاصی هستند. در تحقیق حاضر جهت تعیین ویژگی از ژنوم سایر باکتری‌های مولد منتژیت که می‌توانند در مایع مغزی نخاعی حضور داشته باشند و سبب منتژیت باکتریال شوند استفاده شد مانند استرپتوکوکوس نمونیه و هموفیلوس آنفولانزا که هیچ تکثیری در مورد آنها مشاهده نشد. از این رو می‌توان از روش طراحی شده در این مطالعه به عنوان یک روش تشخیص مولکولی قابل اعتماد جهت تشخیص سریع باکتری نایسریا منتژیتیدیس استفاده نمود.

نتیجه‌گیری

روش PCR طراحی شده در این تحقیق تشخیص سریع و اختصاصی این عامل را امکان پذیر کرده است. این روش نسبت به روش‌های سنتی، روشی اختصاصی، حساس و دقیق در تشخیص نایسریا منتژیتیدیس است. نتایج این مطالعه نشان داد که ژن انتخاب شده در این تحقیق بسیار اختصاصی و حساس است. البته پیشنهاد می‌گردد که با استفاده از نمونه‌های کلینیکی، روش‌های شبیه سازی یا آلوده سازی مصنوعی کارایی این روش بیشتر مورد بررسی قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله نویسندگان این مقاله مراتب قدردانی و تشکر خود را از تمامی مسئولان و همکاران در دانشگاه علوم پزشکی آجا و مرکز تحقیقات زیست فن‌آوری تسنیم که در انجام این تحقیق همکاری نموده‌اند، ابراز می‌نمایند.

Archive of SID
www.SID.ir

References

1- Joklik WK, Willett HP, Amos D. Zinsser microbiology. Appleton and Lange; 1988.
2- Negi S, Grover S, Rautela S, Rawat D, Gupta S, Khare S, et al. Direct detection and serogroup characterization of Neisseria meningitides from outbreak of meningococcal meningitis in Delhi. IJm 2010; 2 (2): 73-79.
3- Caugant DA. Genetics and evolution of Neisseria meningitidis: importance for the epidemiology of meningococcal disease. Infection, Infect Genet Evol 2008; 8 (5): 558-65.
4- Tavana AM, Ataee R. Meningococcal meningitis control in Iran: five year comparative study 2000-2004. J Med Sci 2009; 9 (1): 51-4.
5- Esmaili M, Saiid-Adeli N, Iranmanesh Z, Honarvar S, Phanii M. Neisseria meningitidis carrier rate among military recruits in Kerman, south-east of Iran. Arch Iran Med 2005; 8 (4): 304-10.
6- Dalton H, Allison M. Modification of laboratory results by partial treatment of bacterial meningitis. Am J Clin Pathol 1968; 49 (3): 410.
7- Tunkel AR, Hartman BJ, Kaplan SL, Kaufman BA, Roos KL, Scheld WM, et al. Practice guidelines for the management of bacterial meningitis. Clin Infect Dis 2004; 39 (9): 1267.
8- Yakubu DE, Abadi JR F, Pennington T. Molecular typing methods for Neisseria meningitidis. J Med Microbiol 1999; 48 (12): 1055-1064.
9- Salih M, Armed H, Hofvander Y, Danielsson D, Olcén P. Rapid diagnosis of bacterial meningitis by an enzyme immunoassay of cerebrospinal fluid. EEpidemiol Infect 1989; 103 (02): 301-10.
10- Bennett DE, Mulhall RM, Cafferkey MT. PCR-based assay for detection of Neisseria meningitidis capsular serogroups 29E, X, and Z. J Clin Microbiol 2004; 42 (4): 1764-5.
11- Birtles A, Hardy K, Gray SJ, Handford S, Kaczmarski EB, Edwards-Jones V, et al. Multilocus sequence typing of Neisseria meningitidis directly from clinical samples and application of the method to the investigation of meningococcal disease case clusters. J Clin Microbiol 2005; 43(12): 6007-14.
12- Ni H, Knight AI, McFadden J, Cartwright K, Palmer W. Polymerase chain reaction for diagnosis of meningococcal meningitis. The Lancet. 1992; 340 (8833): 1432-4.
13- Rådström P, Bäckman A, Qian N, Kragsbjerg P, Påhlson C, Olcén 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 (11): 2738–44.
14- Taha MK, Fox A. Quality assessed nonculture techniques for detection and typing of meningococci. FEMS Microbiol Rev 2007; 31 (1): 37-42.
15- Sultlana S, Kumar CSV, Rathod V, Basavarajappa K, Kalappanavar K. Utility of Real time PCR in the rapid diagnosis of pyogenic meningitis. Int J Biotech Biochem 2010; 6 (2): 175-86.
16- Taha MK, Alonso JM, Cafferkey M, Caugant DA, Clarke SC, Diggle MA, et al. Interlaboratory comparison of PCR-based identification and genogrouping of Neisseria meningitidis. J Clin Microbiol 2005; 43 (1): 144-149.
17- Jordens JZ, Heckels JE. A novel porA-based real-time PCR for detection of meningococcal carriage. J Med Microbiol 2005; 54 (5): 463-466.
18- Rebelo MC, Boente R, A Matos FJ, Hofer CB, Barroso DE. Assessment of a two-step nucleic acid amplification assay for detection of Neisseria meningitidis followed by capsular genogrouping. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 2006; 101 (7): 809-13.
19- Ieva R, Alaimo C, Delany I, Spohn G, Rappuoli R, Scarlato V. CrgA is an inducible LysR-type regulator of Neisseria meningitidis, acting both as a repressor and as an activator of gene transcription. J Bacteriol 2005; 187 (10): 3421.
20- Kesanopoulos K, Tzanakaki G, Levidiotou S, Blackwell C, Kremastinou J. Evaluation of touch down real time PCR based on SYBR Green I fluorescent dye for the detection of Neisseria meningitidis in clinical samples. FEMS Immunol Med Microbiol 2005; 43 (3): 419-24.
21- Maddocks SE, Oyston PCF. Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. Microbiology. 2008; 154 (12): 3609.
22- Ataee R, karami A, Mehrabi tavana A, Safiri Z, Hossaini S.M.J. Simultaneous detection of common bacterial meningitis: Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae and Streptococcus pneumonia by multiplex PCR. Kowsar Medical Journal 2009; 14 (3): 119-126.
23- Saadati M, Nazerian S, Barati B, Mehdizadeh H, Shirzad H, Sadeghi zadeh M, Mosapour A. Shenasae molecular hamzaman Neisseria meningitidis va Heamophilus influenzae. Majaleh Olom Pezeshki Modares 1387; 11 (1-2): 73-80.

Archive of SID

www.SID.ir

J Army Univ Med Sci. 2012 Mar; 10 (1) : 10-16

Design of a PCR method for rapid detection of *Neisseria Meningitidis* bacterium

Ghadimi Z; MSc[1], Soleimani M; PhD[2], Mohseni AH; MSc[3], *Majidzadeh-A; K PhD[4]

Received: 5 Oct 2011 Accepted: 2 Jan 2012

Abstract

Background: *Neisseria Meningitidis* is a causative agent of the bacterial meningitis, a life-threatening disease in children and adults. There are several classic methods for the diagnosis of this bacterium but these are time consuming and unreliable. The goal of this present study was to establish a PCR based rapid detection for *Neisseria meningitidis*.

Materials and methods: In this study the target gene was crgA so the specific primers were designed for it. The PCR reaction was set up on the DNA genomic of N meningitidis. To create a positive control, the PCR product was cloned in the pTZ57R/T vector. The presence of crgA gene in the T-vector was confirmed by the digestion and sequencing. The sensitivity of this assay was tested by a serial dilution of the positive control plasmid with starting concentration of 70ng/µl. The test specificity was checked by performing the PCR on the other bacterial genomes.

Results: This test amplified a DNA fragment with expected size of 500bp. The results of the digestion and sequencing proved the presence of crgA gene in the T-vector. The result of the sensitivity study showed that 70pg was the lowest concentration of the positive control plasmid during PCR. The specificity results indicated no cross reaction with the genomic DNA of the other bacteria.

Conclusions: Results of this study showed a high specificity and sensitivity of PCR method for the rapid and precise detection of N. meningitidis. This assay as an important supplement would be substituted the previous molecular and time consuming phenotypic assays used in our laboratory and work. in contrast of.

Keywords: *Neisseria Meningitidis*, Molecular, Diagnosis, PCR

Archive of SID

1- Researcher, Islamic Azad University, Qom Branch, Department of Microbiology, Tehran, Iran.
2- Assistant Professor, Islamic Azad University, Qom Branch, Department of Microbiology, Tehran, Iran.
3- Researcher, AJA University of Medical Sciences, Tasnim Biotechnology of Research Center (TBRC), Tehran, Iran
4- (*Corresponding Author) Assistant Professor, AJA University of Medical Sciences, Tasnim Biotechnology of Research Center (TBRC), Tehran, Iran. Tel: +98 21 88337928 E-mail: k-majidZadeh@armyums.ac.ir

www.SID.ir