مقاله تحقیقی

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره نوزدهم، شماره ۲، بهمن ۱۳۹۵، صفحه ۳۳-۲۶

ارزیابی روش ذوب DNA مبتنی بر Real-time PCR جهت تشخیص انتروکوک فکالیس و انتروکوک فاسیوم در ایزوله های بالینی

بهروز زینی (MSc)[۱]، محمدرضا عربستانی (PhD)[۱]، رسول یوسفی مشعوف (PhD)[۱*]، حامد طهماسبی (MSc)[۲]

۱-گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان
۲-گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان

دریافت: ۹۵/۷/۲۸، اصلاح: ۹۵/۹/۶، پذیرش: ۹۵/۱۰/۲۶

خلاصه

سابقه و هدف: کندی و خطای انسانی در روش های معمول جهت تشخیص دوگونه *انتروکوک فکالیس* و *انتروکوک فاسیوم* که جزء مهمترین گونه های بیماریزا در انسان می باشند، وجود روشهای دقیقتر را ضروری کرده است. هدف از این مطالعه طراحی روشی دقیق و سریع با استفاده از تکنیک ذوب DNA با روش Real Time PCR جهت شناسایی و تفکیک این دو گونه از یکدیگر در ایزوله های بالینی می باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی از ایزوله های موجود در بانک باکتریایی گروه میکروب شناسی دانشگاه علوم پزشکی همدان استفاده شد. طراحی پرایمرها با استفاده از نرم افزارهای اختصاصی و انتخاب ژن های *divIVA* برای تشخیص *انتروکوک فکالیس* و*Alanine racemase* برای تشخیص *انتروکوک فاسیوم* انجام شد. تشخیص ایزوله ها، با بکارگیری روش Real Time PCR و معیار قراردادن دمای ذوب DNA، مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته ها: حساسیت پرایمرهای طراحی شده برای ژنهای *divIVA* (اختصاصی *انتروکوک فکالیس*) و *Alanine racemase* (اختصاصی *انتروکوک فاسیوم*) ۱۵ CFU/ml باکتری بودند. اختصاصیت پرایمرهای طراحی شده با استفاده از آنالیز منحنی ذوب دمایی جهت شناسایی *انتروکوک فکالیس* ۶/۷۶ درجه سانتی گراد و جهت شناسایی *انتروکوک فاسیوم* ۹۳/۸۰ درجه سانتی گراد بود که در مقایسه با ارگانیسم های دیگر اختلاف قابل توجهی را نشان داد.

نتیجه‌گیری: بر اساس این مطالعه، پرایمرهای طراحی شده دارای حساسیت و اختصاصیت مناسبی جهت تشخیص و افتراق گونه های انتروکوک فاسیوم و انتروکوک فکالیس بودند.

کلمات کلیدی: انتروکوک فکالیس، انتروکوک فاسیوم، Real-Time PCR.

مقدمه

انتروکوک ها کوکسی های گرم مثبتی می باشند که قادرند عفونتهای اندوکاردیت، ادراری، عفونت های خونی، مننژیت، عفونت های وابسته به نوزادان و عفونت‌های داخل شکمی و لگنی را ایجاد کنند (۱). در خانواده *انتروکوک* ها حداقل۱۲گونه باکتری وجود دارد که شیوع دو گونه بیماری زای *انتروکوک فکالیس با* بیش از ۷۰ درصد و *انتروکوک فاسیوم* با بیش از ۱۵درصد، *انتروکوک* های جدا شده از انسان را تشکیل می دهند (۲). *انتروکوک فکالیس* یکی از مهمترین عوامل ایجاد کننده عفونت های بیمارستانی در سراسر جهان می باشد که دخالت اصلی این باکتری در بروز *انتروکوک*، اهمیت بالایی به این باکتری بخشیده است(۳). *انتروکوک فاسیوم* گرچه سهم کمتری را نسبت به *انتروکوک فکالیس* در بیماری زایی به خود اختصاص داده است (۴و۳). در عفونت های *انتروکوکی* به ویژه در بیماران با کاتترهای ادراری یا داخل وریدی و دربیمارانی که برای مدت طولانی دربیمارستان بستری شده اند وآنتی بیوتیک وسیع الطیف دریافت کرده اند شایع می باشد(۶و۵). توانایی بالقوه این باکتری ها در انتقال مقاومت های آنتی بیوتیکی از طریق جهش یا دریافت عوامل ژنتیکی خارجی مثل پلاسمید یا ترانسپوزون، انتروکوک ها را به یک عامل جدی در بروز عفونت های مقاوم در سایر گونه های باکتریایی تبدیل کرده است(۹-۷). از رایج ترین روش ها جهت تشخیص گونه های مختلف *انتروکوک* می توان به تست های بیوشیمیایی مبتنی بر مصرف قندها، کشت در محیط کشت های اختصاصی مانند Skim Milk Agar و یا استفاده از سیستم های تشخیص تجاری اشاره کرد(۳). چنین روش هایی از نظر زمان، پیچیدگی و همچنین بروز خطا در تشخیص اختصاصی سویه ها دچار مشکل هستند(۳) لذا تلاش برای تشخیص این باکتری بر مبنای روش های PCR برای توالی اختصاصی باکتری معطوف شده است(۱۰). در روش های مولکولی با هدف قرار دادن ژن‌های خاصی از باکتری بعنوان سایت هدف و طراحی پرایمرهای اختصاصی جهت شناسایی این ژن‌ها، می توان با حساسیت و اختصاصیت مناسبی گونه های باکتریایی را تشخیص داد(۱۱). یکی از این تست ها که از حساس ترین روش ها برای تشخیص سریع این باکتری هست، آنالیز نمودار ذوب DNA یا Melting Curve Analysis بواسطه تکنیک Real Time PCR می‌باشد (۱۲). در این تست تشخیص دقیق بر مبنای رابطه بین دما و محدوده دناتوره شدن DNA، استوار شده است. دناتوره شدن DNA با افزایش دما، منحنی ذوب را که معمولا به شکل سیگموئید است، مشخص می کند(۱۳). برای ردیابی گونه های *انتروکوک فکالیس* و *انتروکوک فاسیوم* می توان با استفاده از ژن‌های اختصاصی که در مسیرهای ویژه ای فعالیت

▣ این مقاله حاصل بخشی از پایان نامه بهروز زینی دانشجو کارشناسی ارشد میکروب شناسی و طرح تحقیقاتی با شماره ۹۳۱۲۲۶۱۹ دانشگاه علوم پزشکی همدان می باشد.
* مسئول مقاله: دکتر رسول یوسفی مشعوف
آدرس: همدان، خیابان مهدیه، دانشگاه علوم پزشکی، گروه میکروب شناسی. تلفن:۰۸۱-۳۵۲۵۰۱۸۲
E-mail: yousefimash@yahoo.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.19.2.4.3]
[DOI: 10.22088/jbums.19.2.26]

دارند، این گونه ها را شناسایی کرد. ژن *divIVA* یک ژن اختصاصی در *انتروکوک فکالیس* می باشد که در تقسیمات سلولی و جداسازی کروموزوم می باشد(۱۴). ژن *Alanine racemase* هم در *انتروکوک فاسیوم* در بیوسنتز پپتید و گلیکان و تبادلات L و D آلانین نقش مهمی دارد (۱۵). تمامی موارد ذکر شده در بالا سبب شده است که تشخیص این باکتری در عفونت های اولیه بیمارستانی از اهمیت ویژه ای برخوردار شود. طراحی یک روش دقیق، سریع و مقرون به صرفه می تواند در کنار شناسایی جنس باکتریایی، گونه هایی که از نظر هومولوژی قرابت بالایی دارند را نیز مشخص کند.

هدف از انجام این مطالعه، طراحی روشی پایه ای مبتنی بر آنالیز نمودارهای مربوط به ذوب DNA برای تشخیص سریع و دقیق *انتروکوک فکالیس و انتروکوک فاسیوم* در جدایه های بالینی می باشد.

مواد و روش ها

طراحی پرایمرها: سایت های هدف انتخاب شده برای پرایمرهای *انتروکوک فکالیس* ژن *divIVA* (ژن مسئول در تقسیم دیواره سلولی) و برای *انتروکوک فاسیوم* ژن)(*alr*) *Alanine racemase* (ژن مسئول در سنتز اسید آمینه آلانین) تعیین شد. پس از انتخاب سایت هدف جهت طراحی پرایمر بانکهای اطلاعاتی مربوط به هر باکتری از سایت NCBI جستجو و تهیه گردید. جهت ارزیابی دمای Anneling و Tm پرایمرهای طراحی شده از نرم افزار ۶ Oligo، Oligoanalyzer و Gene Runner استفاده شد (جدول۱). بعد از طراحی پرایمرهای ذکر شده به منظور اطمینان ازاختصاصی بودن عملکرد آنها، دربانک اطلاعاتی NCBI عمل Blast کردن با نمونه های انسانی، قارچی، ویروسها و میکروارگانیسم های دیگر صورت پذیرفت.

جدول۱. پرایمرهای طراحی شده جهت شناسایی انترکوک فکالیس و انتروکوک فاسیوم

باکتری	ژن	طول توالی	اندازه (bp)
انتروکوک فکالیس	F.*divIVA*	F: ACGTGTCTTCCATCAACGCT	۱۲۳
	R.*divIVA*	R:ACTGCTGTATGTTTGTCTCCGA	
انتروکوک فاسیوم	F.*Alanine racemase*	F: ATCCCTCTGGGCACGCAC	۲۴۸
	R. *Alanine racemase*	R:ACATACACGCCCAATCGTTTC	

میکروارگانیسم ها برای کنترل کیفی: جهت انجام آزمون های آنالیتیکی از سویه‌های استاندارد و کلینیکی باکتریهای *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 و سویه *Enterococcus faecium* (تایید شده توسط تعیین توالی) بعنوان کنترل مثبت و از DNA *Escherichia coli ATCC* 25922 و *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 *A.baumannii* (ATCC 19606), *P. aeruginosa* (ATCC 27853), *K. pneumonia* (ATCC 13882) بعنوان کنترل منفی تهیه شده از مرکز کلکسیون میکروبی دانشگاه علوم پزشکی همدان، استفاده گردید.

استخراج DNA ژنومی: استخراج DNA با استفاده از روش Boiling انجام گرفت. بدین ترتیب که یک کلنی از هر سویه باکتری در ۱۰۰ میکرولیترمحلول PBS استریل ورتکس شده به مدت ۱۵دقیقه جوشانده شد. پس از سانتریفوژ نهایی، مایع رویی بعنوان DNA مورد استفاده قرار گرفت. غلظت و چگالی نوری DNA تخلیص شده در طول موجهای ۲۶۰ و۲۸۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ ND-1000 (USA,BioRad) تعیین گردید(۱۵).

واکنش PCR: برای انجام واکنش PCR برای هر نمونه ۱۲ لاندا از مستر میکس قرمز (Ampliqon آلمان) (شامل Tris-Hcl PH8.5,(NH4)SO4, unit Ampliqon 2/0.4/ mMdNTP 4.3mMMgcl2,0/2%Tween20 (Insert red dye and stabilizer، polymeras با ۱ لاندا از DNA استخراج شده و ۱ لاندا از هر پرایمر به غلظت ۱۰پیکومولار داخل میکروتیوبهای RNAas/DNAas Free۰/۲ BioFil) کره جنوبی) ریخته شد و برای رساندن حجم نهایی به۲۵ لاندا به آن آب مقطر اضافه گردید. برای تکثیر ژنهای مورد نظر از دستگاه ترموسایکلر Eppendorf(آلمان) با تنظیمات سیکل دمایی بصورت شوک حرارتی ۹۴°C ۶۰ ثانیه و تعداد ۲۵ سیکل بصورت ۹۴ °C ۳۰ ثانیه و ۷۲ °C، ۳۰ ثانیه اعمال شد، دمای انلینگ برای ژن *Alanine racemase* ۵۷°C و برای ژن *divIVA* ۵۹ °C هر دو بمدت ۶۰ ثانیه تعیین شد. طویل شدن نهایی هم در ۷۲ °C بمدت ۷ دقیقه در نظر گرفته شد.

الکتروفورز روی ژل اگارز۱/۵درصد: محصولات PCR توسط الکتروفورز با استفاده از ژل۱/۵ درصد آگارز از یکدیگر جدا شدند به این صورت که ۵ میکرولیتر از محصول نهایی PCR در ژل اگارز ۱/۵درصد در بافر X ۰/۵ الکتروفورز گردید. برای رنگ دهی به ژل، به آن ۲میکرولیتر محلول Gel Red (Biotium آمریکا) اضافه و خوب هم زده شد.

برای تعیین اندازه محصولات از نشانگر (Marker) مولکولی فرمنتاز (Thermofisher دانمارک) با توالی ۱۰۰جفت بازی استفاده شد. در نهایت از ژل حاصل توسط دستگاه ژل داک عکسبرداری شد.

تعیین توالی محصولات ژنهای *divIVA* و *alanine racemase*: بعد از طراحی پرایمرهای مورد نظر در این مطالعه، جهت اطمینان از صحت توالی های تعیین شده توسط پرایمرها، محصولات بدست آمده از PCR برای تعیین توالی توسط شرکت تکاپوزیست به شرکت کره ایی ارسال شد. نتایج بدست آمده از تعیین توالی برای Alligment کردن و بررسی میزان هومولوژی پرایمرهای مورد نظر در گونه های باکتریایی استفاده شد. همچنین نتایج بدست آمده از تعیین توالی پرایمرهای طراحی شده، بعنوان روش گلد استاندارد جهت تعیین اختصاصیت پرایمرها در نظر گرفته شد.

انجام واکنش Real time PCR : در این مطالعه از دستگاه Real ABI Onestep time (آمریکا) استفاده شد. برنامه دمایی دستگاه در سه مرحله انجام شد. مرحله اول که منجر به دناتوره شدن DNA الگو و فعال شدن آنزیم پلیمراز میگردد، در دمای ۹۵ °C و به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت. در مرحله دوم، واکنش تکثیری DNA در ۳۰ سیکل و با دمای ۹۵ °C به مدت ۱۵ ثانیه و دمای ۵۸°C به مدت ۴۵ ثانیه ادامه یافت. مرحله پایانی جهت ترسیم منحنی تفکیک یا منحنی ذوب به صورت ۹۵ °C به مدت ۱۵ ثانیه، ۵۵ °C به مدت ۱ دقیقه و ۹۵ °C به مدت ۱۵ ثانیه انجام شد. واکنش های Real time PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر به صورت دوتایی در پلیتهای۹۶ چاهکی انجام شدند. مخلوط

[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.19.2.4.3]
[DOI: 10.22088/jbums.19.2.26]

واکنش شامل Mix Master PCR SYBR Green (TaKaRa,Japan) به میزان ۱۰میکرولیتر، ۱ میکرولیتر (غلظت ۱۰پیکومولار) از پرایمرهای مستقیم و معکوس، ۵ میکرولیتر DNA الگو، ۰/۴ میکرولیتر رنگ Rox و بقیه آن آب مقطر تا حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر اضافه شد.

تعیین حساسیت پرایمرهای طراحی شده: برای انجام آزمون حساسیت پرایمرهای طراحی شده با استفاده از تهیه استاندارد باکتریایی با غلظت نیم مک فارلند (۵/۱×۱۰^۸ CFU/ml)، اقدام به تهیه رقت از ۱۰^۱ تا ۱۰^۷ باکتری شد. سپس از هر یک از رقت های بدست آمده بصورت مجزا استخراج DNA صورت گرفت و بصورت سه تایی (Triplicate) در سه روز متوالی برای رقت های تهیه شده آزمون Real Time PCR انجام شد و با استفاده از تکرار پذیری تست انجام شده، حساسیت آزمون طراحی شده به دست آمد.

تعیین اختصاصیت پرایمرهای طراحی شده: به منظور انجام آزمون اختصاصیت پرایمرهای تهیه شده از سویه DNA سویه استاندارد Enterococcus faecalis ATCC 29212 بعنوان کنترل مثبت و از Escherichia coli ATCC 25922 و Staphylococcus aureus ATCC 29213، A. baumannii (ATCC 19606)، P. aeruginosa (ATCC 27853) و K. pneumonia (ATCC 13882) به عنوان کنترل منفی استفاده شد. همچنین برای تایید نهایی آزمون اختصاصیت از DNA انتروکوک فاسیوم و پرایمر انتروکوک فکالیس و از DNA انتروکوک فکالیس برای انتروکوک فاسیوم استفاده شد. برای جداسازی گونه های مختلف انتروک از یکدیگر در آنالیز Melting curve مورد استفاده قرار گرفت. در پایان واکنش، منحنی استاندارد براساس لگاریتم غلظت DNA محور افقی(و سیکل آستانه) محور عمودی (ترسیم شد. از شیب منحنی استاندارد برای محاسبه راندمان واکنش تکثیری استفاده شد.

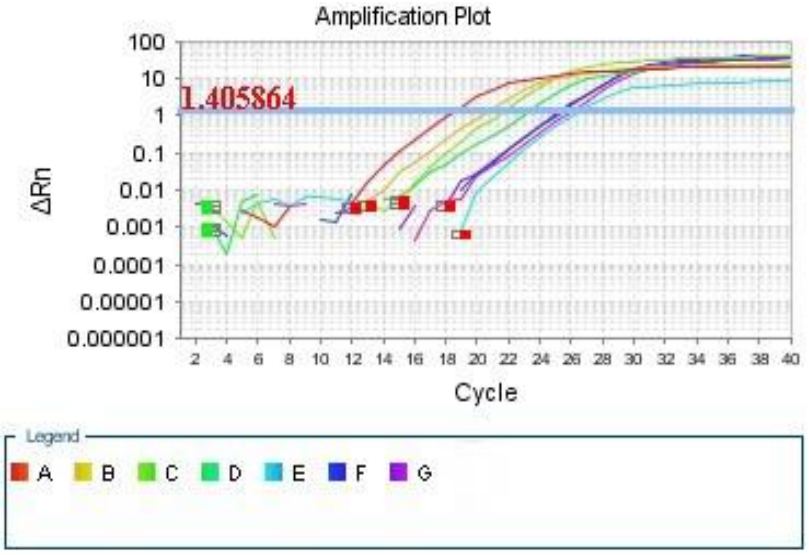
آنالیز و بررسی داده ها: داده های بدست آمده، با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۹ مورد بررسی، تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای این منظور از روش های آماری توصیفی (تعیین فراوانی و میانگین) استفاده شد. همچنین از نرم افزار Chromas نسخه ۵۱/۲ برای آنالیز نتایج حاصل از تعیین توالی پرایمرهای طراحی شده استفاده شد.

یافته ها

نتایج مربوط به تعیین حساسیت پرایمرها: با بدست آوردن غلظت در رقت های ۱۰^۱ تا ۱۰^۷ (نمودار۱و۲) مشخص شد که پرایمر طراحی شده برای انتروکوک فاسیوم قدرت شناسایی ۱۵CFU باکتری و پرایمر طراحی شده برای انتروکوک فکالیس قدرت شناسایی ۱۵CFU باکتری را دارا می باشد(شکل۱).

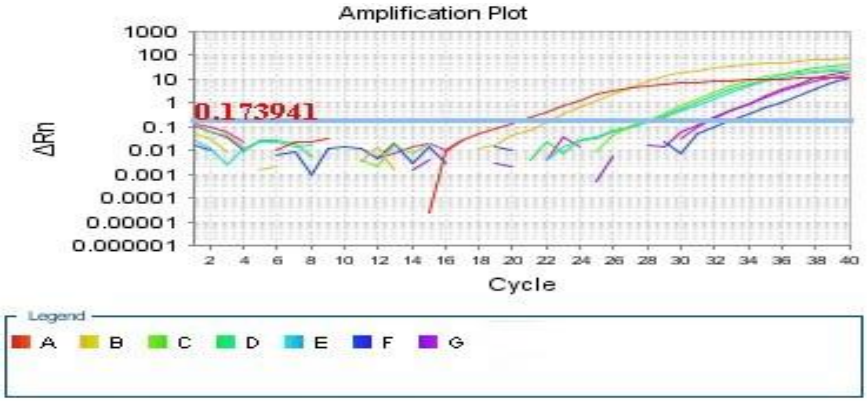
نتایج مربوط به اختصاصیت پرایمرهای طراحی شده: منحنی حاصل از تکثیر ژن divIVA درانتروکوک فکالیس در همه رقت ها دمای ۷۶/۶ °C را نشان داد و منحنی های حاصل از تکثیر ژن Alanine racemase در انتروکوک فاسیوم دمای ۸۰/۹۳ °C را نشان داد. نتایج حاصل از بلست دمای پرایمرها که در پایگاه NCBI انجام گرفت، با نتایج دمایی که در پایان واکنش از منحنی های ذوب بدست آمد کاملا برابری داشت. (نمودار۳). برای کنترل منفی(نمودار استاندارد) از نمودار ذوب باکتری های استافیلوکوک اورئوس و اشرشیا کلی برای دو گونه مورد مطالعه استفاده شد. دماهای بدست آمده در پایان واکنش و منحنی های ایجاد شده، نشان دهنده عدم شناسایی پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه برای سایر باکتری بود(جدول۲).

نتایج ژل الکتروفورز: جهت بررسی کیفیت قطعات ژنومی تکثیر شده در واکنش Real time PCR، محصولات واکنش در ژل الکتروفورز ۱ درصد بارگذاری شدند. از مارکر مولکولی با اندازه ۱۰۰ جفت بازی در واکنش فوق، استفاده شد و باندهایی به طول ۱۲۳ جفت مربوط به تکثیر موفیت آمیز ژن divIVA انتروکوک فکالیس و طول ۲۴۸ جفت باز مربوط به تکثیر موفقیت آمیز ژن Alanine racemase انتروکوک فاسیوم به دست آمد)(شکلA۱و B۱).

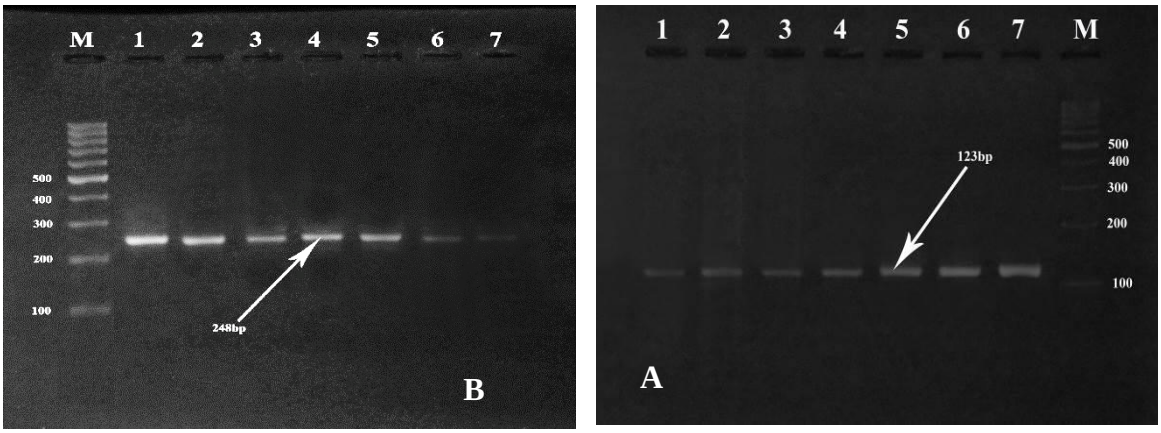


نمودار۱. منحنی آستانه(ترشولدر) در رقت های مختلف برای تعیین حساسیت پرایمرهای مربوط به انتروکوک فکالیس. تعداد سیکلهای آستانه روی محور افقی و تغییر فلورسانس دریافتی (ΔRn)روی محور عمودی نشان داده شده است. نمودار A مربوط دمای حساسیت پرایمرهای طراحی شده در رقت۱۰^۷ می باشد. B مربوط به رقت۱۰^۶، C مربوط به رقت ۱۰^۵ ، D مربوط به رقت ۱۰^۴ ، E مربوط به رقت ۱۰^۳، F مربوط به رقت ۱۰^۲، G مربوط به رقت ۱۰^۱ باشد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.19.2.4.3]
[DOI: 10.22088/jbums.19.2.26]



نمودار۲. منحنی آستانه(ترشولدر) در رقت های مختلف برای تعیین حساسیت پرایمرهای مربوط به انتروکوک فاسیوم. تعداد سیکلهای آستانه روی محور افقی و تغییر فلورسانس دریافتی (ΔRn)روی محور عمودی نشان داده شده است. نمودار A مربوط دمای حساسیت پرایمرهای طراحی شده در رقت$^{۱۰^{۷}}$ می باشد. B مربوط به رقت$^{۱۰^{۶}}$، C مربوط به رقت $^{۱۰^{۵}}$ ، D مربوط به رقت $^{۱۰^{۴}}$ ، E مربوط به رقت $^{۱۰^{۳}}$، F مربوط به رقت $^{۱۰^{۲}}$، G مربوط به رقت $^{۱۰^{۱}}$ باشد.



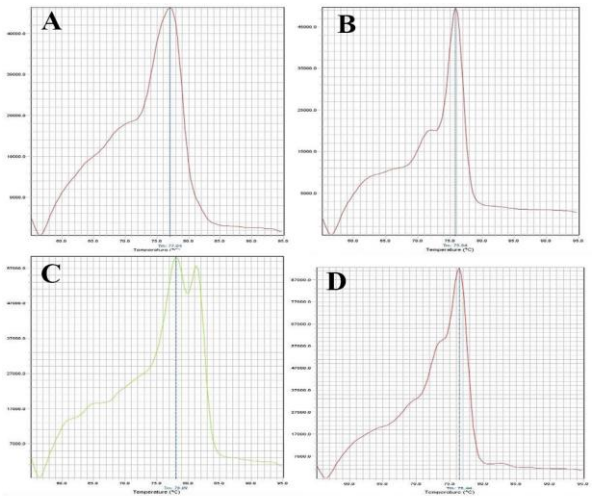
شکل ۱. A- تصویر ژل الکتروفورز ۱درصد مربوط به تکثیر ژن divIVA در باکتری Enterococcus faecalis با طول ۱۲۳ جفت باز. چاهک ۱ رقت $^{۱۰^{۷}}$. چاهک ۲ رقت $^{۱۰^{۶}}$. چاهک۳ رقت $^{۱۰^{۵}}$. چاهک۴ رقت $^{۱۰^{۴}}$. چاهک۵ رقت $^{۱۰^{۳}}$. چاهک۶رقت $^{۱۰^{۲}}$. چاهک ۷ رقت $^{۱۰^{۱}}$. چاهک M مارکر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی. B- تصویر ژل الکتروفورز ۱درصد مربوط به تکثیر ژن Alanine racemase در باکتری Enterococcus faecium با طول ۲۴۸ جفت باز. چاهک ۱ رقت $^{۱۰^{۷}}$. چاهک ۲ رقت $^{۱۰^{۶}}$. چاهک۳ رقت $^{۱۰^{۵}}$. چاهک۴ رقت $^{۱۰^{۴}}$. چاهک۵ رقت $^{۱۰^{۳}}$. چاهک۶رقت $^{۱۰^{۲}}$. چاهک ۷ رقت $^{۱۰^{۱}}$. چاهک M مارکر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی

جدول۲. نتایج حاصل از بررسی تعیین غلظت و OD در رقت های مختلفDNA باکتری های انتروکوک فاسیوم و انتروکوک فکالیس با استفاده از دستگاه نانودراپ

انتروکوک فکالیس				انتروکوک فاسیوم			
کنترل منفی		کنترل مثبت		کنترل منفی		کنترل مثبت	
اشریشیاکلی		انتروکوک فکالیس		استافیلوکوک اورئوس		انتروکوک فاسیوم	
CT	Melt	CT	Melt	CT	Melt	CT	Melt
۲۸/۳	۷۲/۴۴	۱۶/۱۴	۷۶/۶	۲۸/۳۴	۷۳/۰۹	۲۰/۳	۸۰/۹۳

نتایج حاصل از بلست محصولات ژن divIVA در باکتری Enterococcus faecalis و تکثیر ژن Alanine racemase در باکتری Enterococcus faecium: در یک آزمون Real time برای تعیین اختصاصیت پرایمرهای، DNA باکتری‌های انتروکوک فکالیس و انتروکوک فاسیوم به همراه دو پرایمرهای طراحی شده بصورت جدا مورد استفاده قرار گرفت تا اختصاصیت پرایمرها برای گونه‌ها نیز بدست آید. در این مورد هم پرایمر انتروکوک فکالیس قادر به شناسایی انتروکوک فکالیس نبوده و پرایمر انتروکوک فکالیس قادر به شناسایی انتروکوک فاسیوم نبودند. در نهایت نتایج بصورت منحنی های ذوب با دماهای متفاوت بدست آمد بطوریکه در زمان استفاده از DNA انتروکوک فکالیس و پرایمر انتروکوک فاسیوم دمای غیر اختصاصی ۷۷/۰۴°C بدست آمد و هنکامیکه از DNA انتروکوک فاسیوم و پرایمر انتروکوک فکالیس استفاده شد دمای غیر اختصاصی ۷۵/۸۴ °C بدست آمد. با توجه به دماهای بدست آمده از پرایمرهای انتروکوک فاسیوم(۸۰/۹۳) و انتروکوک فکالیس(۷۶/۶) که اختصاصیت پرایمرها تعیین شد (نمودار۳).

[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.19.2.4.3]
[DOI: 10.22088/jbums.19.2.26]



نمودار۳. منحنی ذوب DNA حاصل از واکنش Real Time PCR جهت تعیین اختصاصیت پرایمرهای طراحی شده.A: اشریشیاکلی جهت ارائه کنترل منفی برای اختصاصیت پرایمر انتروکوک فکالیس.B: استافیلوکوک اورئوس جهت ارائه کنترل منفی برای اختصاصیت پرایمر انتروکوک فاسیوم.C: انتروکوک فکالیس و پرایمر انتروکوک فاسیوم.D: انتروکوک فاسیوم و پرایمر انتروکوک فکالیس.

بحث و نتیجه گیری

با آنالیز نتایج بدست آمده از منحنی های ذوب مربوط به DNA های باکتری‌های انتروکوک فکالیس و انتروکوک فاسیوم بهترین دماها برای این دو باکتری به ترتیب ۷۶/۶°C و برای انتروکوک فاسیوم ۸۰/۸°C بدست آمد. همچنین این دما در پرایمرهای بلست شده کاملا مطابقت داشت. در مطالعات مشابهی که صورت گرفته است، روش Melting-Curve Analysis مبتنی بر Real time یکی از حساس ترین و دقیق ترین روش های مورد استفاده در زمینه تشخیص می باشد(۱۶). اهمیت تشخیص انتروکوک ها به عنوان پاتوژن های مهم اکتسابی از جامعه و بیمارستانی (دومین عامل رایج عفونت بیمارستانی) بویژه در بخش های مراقبت ویژه، یکی از چالش های جدید به حساب می آید، این باکتری‌ها موجب عفونت هایی نظیر عفونت مجرای ادراری و زخم، باکتریمی، سپسیس و اندوکاردیت می گردند(۱۸-۱۶).

روش رایج تشخیص این باکتری تستهای بیوشیمیایی شامل تشخیص اولیه با انواع محیط کشت و یا استفاده از سیستم های تشخیص تجاری می باشد. چنین روش هایی از نظر زمان، پیچیدگی و از نظر تشخیص اختصاصی سویه ها دچار مشکل هستند.

بنابراین برای غلبه بر این مشکل تلاش ها به سوی تشخیص این باکتری بر مبنای روش های PCR برای توالی اختصاصی باکتری معطوف شده است(۱۹). در بررسی های انجام شده توسط Woksepp و همکاران که از روش آنالیز منحنی ذوب DNA های باکتری های مختلف استفاده شد، دسته بندی باکتری مطابق با این روش با بالاترین حساسیت صورت گرفت. همچنین در این مطالعه با بهینه سازی روش MCA نتایج حاصل با روش MLST مقایسه شد که نتایج نسبتا قابل قبولی را در برداشت (۱۹).

با توجه به نتایج بدست آمده از روش های فنوتیپی در تعیین گونه های انتروکوک فکالیس و انتروکوک فاسیوم، در کنار هزینه بالا، می توان خطای بالایی را مشاهده کرد(۱۶). این امر زمانی بیشتر خود را نشان می دهد که در برخی موارد بروز هموولوژی های بین گونه ای در این خانواده تشخیص با استفاده از قندهای متعدد را نیز غیر ممکن می‌کند و می تواند نتایج منفی کاذب و مثبت کاذب فراوانی را در بر داشته باشد. در مطالعه حاضر حساسیت های پرایمرهای طراحی شده برای شناسایی هر دو گونه انتروکوک فکالیس و انتروکوک فاسیوم ۱۵CFU/ml بدست آمد. در مطالعاتی که Cha و همکاران جهت شناسایی سویه های انتروکوک های مقاوم به ونکومایسین با استفاده از آنالیز منحنی ذوب DNA انجام دادند، مشخص شده که با توجه به حساسیت این روش می توان از آن برای گروه بندی سویه های مقاوم در یک جنس و حتی در یک گونه استفاده کرد(۲۰).

ارزش تشخیصی روش آنالیز ذوب مبتنی بر Real time PCR در مواقعی که هموولوژی های نزدیک بین گونه ایی وجود داشته باشد می تواند با تکیه بر حساسیت بالای خود، گونه هایی که دارای هموولوژی نزدیک هستند را نیز از یکدیگر تفریق کند. این مورد در مطالعات Choong-Hwan Cha و همکاران بخوبی مشاهده شد که در نهایت موفق به شناسایی گونه های انتروکوک فاسیوم و فکالیس از یکدیگر شدند.

نتایج حاصل از این بررسی با نتایج حاصل از مطالعه حاضر کاملا همخوانی داشت و نتایج مشابهی را می توان در هر دو مطالعه مشاهده کرد. البته این نکته را باید مد نظر قرار داد که در روش MCA مبتنی بر Real time باید به طراحی پرایمرها به دقت توجه داشت. در مطالعاتی که توسط Krawczyk و همکاران انجام گرفت طراحی پروفایل ذوب را در کنار روش PFGE مورد استفاده قرار گرفت تا حساسیت آن را افزایش دهد(۱۱).

با توجه به نتایج بدست آمده از تعیین توالی پرایمرهای طراحی شده در مطالعه حاضر، می توان اذعان داشت که این پرایمرها از حساسیت و ویژگی قابل قبولی برخوردار هستند و به راحتی می توانند نمونه های DNA خالص شده گونه های مختلف انتروکوک را که دارای خصوصیات کشت و بیوشیمیایی بسیار نزدیک به هم هستند را نیز شناسایی کند.

در مطالعه ایی که Martín و همکاران بر روی گونه های مختلف انتروکوک داشتند با استفاده از روش آنالیز منحنی ذوب مبتنی بر آنزیم های محدود کننده سایت های ۱۶S و ۲۳S را به عنوان هدف قرار دادند که در برخی موارد بروز هموولوژی های مشابه منجر به گزارش های منفی کاذب و مثبت کاذب شد(۱۲). در صورتیکه استفاده از تکنیکهای حساستر نظیر Real time PCR می تواند نتایج مثبت و منفی کاذب را بهبود بخشد(۲۱).

بر اساس نتایج بدست آمده در این مطالعه، میزان حساسیت پرایمرهای طراحی شده برای تشخیص گونه های مختلف انتروکوک که فرآیند خالص سازی DNA بر روی آنها صورت گرفته است، ارزش اطمینان نسبتا قابل قبولی را کسب کردند. البته نباید از این نتیجه گیری چشم پوشی کرد که انتخاب یک سایت هدف مناسب در برآیند حاصل از این مطالعه نقش بسیار مهمی داشت.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی همدان جهت حمایت مالی از این تحقیق، تشکر و قدردانی می گردد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.19.2.4.3]
[DOI: 10.22088/jbums.19.2.26]

Evaluation of Real-time PCR-based DNA melting method for detection of Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium in clinical isolates

B. Zeyni (MSc)[1], M.R. Arabestani (PhD)[1], R.Yousefi Mashuf (PhD)*[1], H.Tahmasebi(MSc)[2]

1. Department of Microbiology, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, I.R.Iran
2. Department of Microbiology, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 19(2); Feb 2017; PP: 26-33
Received: Oct 19th 2016, Revised: Nov 26th 2016, Accepted: Jan 15th 2017.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Human error and timeless in conventional techniques to identify species *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* are two species of the pathogenic species in humans, more accurate techniques is essential. The aim of this study is to design a method of quickly and accurately using DNA melting by Real Time PCR technique to identify and separate the two species in clinical isolates.

METHODS: In this experimental study, the bacterial isolates in the Department of Microbiology Bank of Hamadan University of Medical Sciences was used. Design of primers was done by proprietary software and selecting *DivIVA* gene for *Enterococcus faecalis* and *alanine racemase* for *Enterococcus faecium* was performed. Isolates identification was evaluated by using Real Time PCR test and melting curve temperature of DNA.

FINDINGS: Susceptibility of primers designed in *divIVA* gene (specific for *E. faecalis*) and alanine-*racemase* gene (specific for *E. faecium*) was 15CFU/ml per reaction. Specificity of designed primers by using DNA melting curve analysis was 76.6 for *E. faecalis* and 80.93 for *E. faecium* which showed considerable different in comparison with another microorganism.

CONCLUSION: Using the results obtained in this study, primers designed were sensitivity and specificity for diagnosis and differentiation of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* species in clinical isolates.

KEY WORDS: *Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium, Real Time PCR*

Please cite this article as follows:

Zeyni B, Arabestani MR, Yousefi Mashuf R, Tahmasebi H. Evaluation of Real-time PCR-based DNA melting method for detection of Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium in clinical isolates. J Babol Univ Med Sci. 2017;19(2):26-33.

*** Corresponding author: R. YousefiMashuf (PhD)**
Address: Department of Microbiology, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, I.R.IRan
Tel: +98 81 35250182
E-mail: yousefimash@yahoo.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.19.2.4.3]
[DOI: 10.22088/jbums.19.2.26]

References

1.Ryu H, Henson M, Elk M, Toledo-Hernandez C, Griffith J, Blackwood D, et al. Development of quantitative PCR assays targeting the 16S rRNA genes of Enterococcus spp. and their application to the identification of enterococcus species in environmental samples. App Environmental Microbiol. 2013;79(1):196-204.

2.Ferguson DM, Talavera GN, Hernandez LA, Weisberg SB, Ambrose RF, Jay JA. Virulence genes among enterococcus faecalis and enterococcus faeciumisolated from coastal beaches and human and nonhuman sources in southern california and puertorico. J Pathog. 2016;201(6):3437214.

3.Rafati M. Farhadi R, Nemati-Hevelai E, Chabra A. Determination of frequency and antibiotic resistance of common bacteria in late onset sepsis at the neonatal ward in Boo Ali-Sinahospital of Sari, Iran. J BabolUniv Med Sci. 2014:16(6):64-71.[In Persian].

4.Owens CD, Stoessel K. Surgical site infections: epidemiology, microbiology and prevention. J Hosp Infect. 2008;70(2):3-10.

5.Diederich AK, Wobser D, Spiess M, Sava IG, Huebner J, Sakiotanc T. Role of glycolipids in the pathogenesis of Enterococcus faecalis urinary tract infection. PLoS One. 2014;9(5):96295.

6.Hill DM, Wood GC, Hickerson WL. Linezolid bladder irrigation as adjunctive treatment for a vancomycin-resistant Enterococcus faecium catheter-associated urinary tract infection. Ann Pharmacother. 2015;49(2):250-3.

7.Kazemeini F, Amini K. Evaluation of the frequency of virulence genes in enterococcus faecalisisolates from fecal samples by multiplex PCR method. J BabolUniv Med Sci. 2016:18(3):62-8.[In Persian].

8.Shakouie S, Salem Milani A, Eskandarnejad M, Rahimi S, Froughreyhani M, Galedar S, et al. Antimicrobial activity of tetraacetylethylenediamine-sodium perborate versus sodium hypochlorite against Enterococcus faecalis. J Dent Res Dent Clin Dent Prospects. 2016;10(1):43-7.

9.El-Kersh TA, Marie MA, Al-Sheikh YA, Al-Agamy MH, Al Bloushy AA. Prevalence and risk factors of early fecal carriage of Enterococcus faecalis and Staphylococcus spp and their antimicrobial resistant patterns among healthy neonates born in a hospital setting in central Saudi Arabia. Saudi Med J. 2016;37(3):280-7.

10.Mahmoudpour A, Rahimi S, Sina M, Soroush MH, Shahi S, Asl-Aminabadi N. Isolation and identification of Enterococcus faecalis from necrotic root canals using multiplex PCR. J Oral Sci. 2007;49(3):221-7.

11.Krawczyk B, Leibner J, Stojowska K, Bronk M, Samet A, Kur J. PCR melting profile method for genotyping analysis of vancomycin-resistant enterococcus faecium isolates from hematological unit patients. Polish J MicrobiolPolskieTowarzystwoMikrobiologow Polish SocMicrobiol. 2007;56(2):65-70.

12.Martin B, Garriga M, Aymerich T. Identification of Enterococcus species by melting curve analysis of restriction fragments. J Microbiol Method. 2008;75(1):145-7.

13.Tong SY, Giffard PM. Microbiological applications of high-resolution melting analysis. J clin microbiol. 2012;50(11):3418-21.

14.Ramirez-Arcos S, Liao M, Marthaler S, Rigden M, Dillon JA. Enterococcus faecalisdivIVA: an essential gene involved in cell division, cell growth and chromosome segregation. Microbiol. 2005;151(5):1381-93.

15.Priyadarshi A, Lee EH, Sung MW, Nam KH, Lee WH, Kim EE, et al. Structural insights into the alanine racemase from Enterococcus faecalis. Biochimica et Biophysica Acta. 2009;1794(7):1030-40.

16.Jung WK, Lim JY, Kwon NH, Kim JM, Hong SK, Koo HC, et al. Vancomycin-resistant enterococci from animal sources in Korea. Int J Food Microbiol. 2007;113(1):102-7.

17.Seo KS, Lim JY, Yoo HS, Bae WK, Park YH. Comparison of vancomycin-resistant enterococci isolates from human, poultry and pigs in Korea. Vet Microbiol. 2005;106(3):225-33.

18.Arabestani MR, Fazzeli H, Nasr Esfahani B. Identifiation of the most common pathogenic bacteria in patients with suspected sepsis by multiplex PCR. J Infect Dev Ctries. 2014;8(4):461-8.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.19.2.4.3]
[DOI: 10.22088/jbums.19.2.26]

19.Woksepp H, Ryberg A, Billstrom H, Hallgren A, Nilsson LE, Marklund BI, et al. Evaluation of high-resolution melting curve analysis of ligation-mediated real-time PCR, a rapid method for epidemiological typing of ESKAPE Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiellapneumoniae, Acinetobacterbaumannii, Pseudomonas aeruginosa, and Enterobacter Species pathogens. J Clin Microbiol. 2014;52(12):4339-42.

20.Cha C-H, An HK, Kim JU. Detection of vancomycin-resistant enterococci using Multiplex Real-time PCR Assay and Melting Curve Analysis. Korean J Lab Med. 2010;30(2):138-46.

21.Alonso M, Marin M, Iglesias C, Cercenado E, Bouza E, Garcia de Viedma D. Rapid identification of linezolid resistance in Enterococcus spp. based on high-resolution melting analysis. J Microbiol Methods. 2014;98(11):41-3.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.19.2.4.3]
[DOI: 10.22088/jbums.19.2.26]