طراحی واکنش زنجیره ای پلی مراز(PCR) جهت تشخیص مولکولی باکتری هموفیلوس آنفلوانزا

صدیقه تقی نژاد[۱]، محمد سلیمانی[۲*]، امیرحسین محسنی[۲]، کیوان مجید زاده[۲]

۱) گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم

۲) مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی تسنیم، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی آجا

تاریخ دریافت:۹۰/۵/۱۷ تاریخ پذیرش:۹۱/۳/۱۳

چکیده

مقدمه: هموفیلوس آنفلوانزا مهم ترین عامل بیماری مننژیت در نوزادان و کودکان زیر ۵ سال است. از این رو تشخیص سریع این عامل ضروری است. مطالعات نشان داده است که روش های مولکولی، تست های اختصاصی برای تشخیص سریع این عامل هستند. هدف این مطالعه، طراحی روش PCR جهت تشخیص سریع باکتری هموفیلوس آنفلوانزا بود.

مواد و روش ها: در این مطالعه پرایمر های اختصاصی بر اساس ژن ompp6 طراحی و واکنش PCR راه اندازی شد. جهت ساخت کنترل مثبت استاندارد، محصول PCR در وکتور pTZ57R/T کلون گردید. حضور ژن مورد نظر در T- وکتور به وسیله پروسه های هضم آنزیمی و توالی یابی تایید شد. حساسیـــت واکنش PCR، از طریق تهیه رقت های متوالی ۱ به ۱۰ از پلاسمید کنترل مثبت با غلظت اولیه ۱۱ نانوگرم، تعیین شد. ویژگی واکنش با PCR بر روی DNA ژنومیک طیفی از باکتری ها ارزیابی شد.

یافته های پژوهش: نتایج PCR، باند مورد انتظار با اندازه ۲۸۰ جفت بازی را نشان داد. نتایج حساسیت، مشخص کرد که کمترین حد تشخیصی واکنش ۳۱۷ کپی است. هیچ گونه تکثیری پس از PCR بر روی DNA ژنومیک باکتری های کنترل منفی مشاهده نگردید. این نتیجه ویژگی واکنش PCR را تایید نمود.

بحث و نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که PCR ژن ompp6 باکتری هموفیلوس آنفلوانزا روشی با حساسیت و ویژگی بالا است و می تواند به عنوان ابزاری در تشخیص سریع مننژیت ناشی از این باکتری به ویژه در موارد مصرف آنتی بیوتیک توسط بیمار در آزمایشگاه های تشخیصی باشد.

واژه های کلیدی : هموفیلوس آنفلوانزا، تشخیص سریع، PCR

* **نویسنده مسئول:** مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی تسنیم، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی آجا

Email: soleimanidor@yahoo.com

مقدمه

هموفیلوس آنفلوانزا یک باکتری کوکوباسیل گرم منفی، کوچک، غیر متحرک، فاقد اسپور، هوازی-بی هوازی اختیاری و از خانواده پاستورلاسه است. هموفیلوس آنفلوانزا به شدت با میزبان انسانی سازگاری دارد و در غشاهای مخاطی مجاری تنفسی فوقانی انسان ها یافت می شود. پایداری این ارگانیسم ها در جمعیت انسانی وابسته به انتقال شخص به شخص است که این انتقال از طریق انتشار و پخش شدن قطرات تنفسی، تماس با نمونه های حاوی ارگانیسم و حتی از طریق کانال زایمان اتفاق می افتد،(۱). هموفیلوس آنفلوانزا تقریباً در مجاری تنفسی فوقانی ۷۵ درصد بچه های سالم و بالغین وجود دارد، ولی به ندرت در حفره دهانی دیده می شود. معمولاً فرم های غیر کپسوله به صورت فلور نرمال بدن هستند اما در تعداد بسیار کمی از بالغین سالم(۳ تا ۷ درصد) فرم کپسول دار هموفیلوس آنفلوانزا تیپ b(یعنی Hib) به طور متناوب در ناحیه فوقانی دستگاه تنفسی دیده می شود که مهم ترین و شایع ترین عامل باکترمیا و مننژیت باکتریال حاد در کودکان زیر ۵ سال محسوب می شود و گاهی نیز در کودکان و بالغین ایجاد عفونت مجاری تنفسی می کند.(۲)

تشخیص مننژیت باکتریایی در اکثر مواقع مشکل است چون علایم و نشانه ها خصوصاً در کودکان اغلب غیراختصاصی هستند. از روش های تشخیص انتخابی می توان به رنگ آمیزی گرم از مایع مغزی نخاعی و کشت اشاره کرد. اگر چه رنگ آمیزی گرم از مایع نخاعی روشی سریع است، اما این روش بسیار غیراختصاصی است و از حساسیت پایینی برخوردار است و از طرفی در صورت مصرف آنتی بیوتیک ممکن است نتایج کشت از خون یا مایع مغزی نخاعی هم منفی گزارش شود. از طرف دیگر در صورت انجام کشت حدود ۲۴ تا ۳۶ ساعت زمان نیاز هست تا کلونی ها رشد نمایند. اخیراً از تکنیک های ایمونولوژیکی مثل آگلوتیناسیون ذره ای لاتکس و کانترایمونوالکتروفورزیس که بر اساس تشخیص آنتی ژن های باکتریایی استوار هستند، نیز در تشخیص مننژیت باکتریایی استفاده می شود. اگر چه این تکنیک ها بسیار سریع تر از کشت و رنگ آمیزی گرم هستند ولی از حساسیت و ویژگی پایینی برخوردارند.(۳)

با توجه به ضرورت تشخیص و درمان سریع در مننژیت، دست یابی به آزمونی که بتواند مننژیت باکتریایی را بسیار سریع و اختصاصی شناسایی کند، بسیار مهم می باشد. مطالعات ثابت کرده است که تشخیص عوامل بیماری زا با استفاده از تکنیک های مولکولی همواره سریع تر، اختصاصی تر و حساس تر از روش های کلاسیک است. یکی از مهم ترین این تکنیک ها واکنش زنجیره ای پلی مراز(PCR) است. این روش هم از حساسیت و ویژگی بالاتری برخوردار است و هم درمان های قبلی با آنتی بیوتیک روی نتایج این تست تاثیری ندارد،(۴،۵). از این رو در طی سالیان اخیر مطالعات مختلفی در تشخیص ملکولی این عامل باکتریایی با استفاده از تکنیک PCR انجام شده است. کتل و همکاران(۱۹۹۰) از تکنیک PCR برای تشخیص باکتری هموفیلوس آنفلوانزا در مایع مغزی-نخاعی استفاده کردند،(۶). یاداو و همکاران نیز در سال ۲۰۰۳ برای تشخیص سریع باکتری هموفیلوس آنفلوانزا از تکنیک PCR استفاده کردند،(۷). فایلس و همکاران، جهت تشخیص هم زمان عوامل مننژیت باکتریایی(هموفیلوس آنفلوانزا، نایسریا مننژیتیدیس و استرپتوکوکوس نیومونیه) در سال ۲۰۰۵ تکنیک PCR را به کار بردند،(۸). در ایران در سال ۱۳۸۶، سعادتی و همکاران تکنیک Multiplex PCR را برای تشخیص این باکتری بر اساس ژن lic1 راه اندازی کردند،(۹). عطایی و همکاران نیز در سال ۱۳۸۸ از ژن های 16srRNA و bexA جهت تشخیص باکتری هموفیلوس آنفلوانزا در تکنیک Multiplex PCR استفاده نمودند،(۱۰). ولی با این وجود تاکنون هیچ تکنیک استانداردی برای تشخیص مولکولی این باکتری در ایران راه اندازی نشده است. از این رو در این مطالعه یک تکنیک PCR استاندارد جهت تشخیص سریع و اختصاصی باکتری هموفیلوس آنفلونزا راه اندازی شد.

مواد و روش ها

تهیه ژنوم باکتری

در این مطالعه ژنوم تایید شده باکتری هموفیلوس آنفلوانزا(ATCC-33533) از انیستیتو پاستور ایران تهیه و به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. از سویی جهت تعیین ویژگی واکنش PCR برای ژن ompp6، ژنوم تعددای باکتری با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن ompp6، به عنوان کنترل منفی، مورد تکثیر قرار گرفت. ژنوم این باکتری ها از انستیتو پاستور ایران تهیه و در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت.(جدول شماره ۱)

طراحی پرایمر

ژن هدف گذاری شده جهت تشخیص باکتری هموفیلوس آنفلوانزا، ژن ompp6 بود. جهت طراحی پرایمر، ترادف های ثبت شده این ژن(۳۳ ترادف)، از سایت National Center For Biotechnology Information(NCBI) گرفته شد. تمامی۳۳ سکانس دریافتی وارد نرم افزار CLC Sequence viewer (Version 6.4) گشت. پس از ترازبندی ترادف های اخذ شده، نقاط حفاظت شده مشخص و طراحی پرایمر بر اساس این نقاط با استفاده از نرم افزار Gene Runner (version3.05) انجام شد. جهت اطمینان از اختصاصی بودن پرایمرهای طراحی شده از سرویس های Primer BLAST و Nucleotide BLAST سایت NCBI استفاده شد. جهت بررسی خصوصیات ترمودینامیکی پرایمرها، از نرم افزار Gene Runner (version3.05) استفاده شد. سنتز پرایمرها توسط شرکت سیناژن انجام شد. سکانس پرایمر جلویی به صورت 5´GTGCTGCTCAAACTTTTGGCGG 3´ و سکانس پرایمر عقبی به صورت 5´CCTAATTTACCAGCATCAACACCTT TACC 3´ بود. این پرایمرها قادر به تکثیر یک قطعه ۲۸۰ جفت بازی در ژن ompp6 باکتری هموفیلوس آنفلوانزا بودند.

راه اندازی تکنیک Polymerase Chain Reaction

واکنش PCR برای تکثیر ژن ompp6 با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و ژنوم باکتری هموفیلوس آنفلوانزا انجام شد. برای انجام این واکنش، ابتدا یک مخلوط واکنش دارای ۱/۵ میلی مولار MgCl2، ۰/۲ میلی مولار dNTPs و بافر PCR تهیه شد. واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر با مخلوط واکنش فوق به همراه یک واحد آنزیم Taq DNA Polymerase (شرکت کوثر، ایران)، ۰/۴ میکرومولار از هر یک از پرایمرها و ۸۵ نانوگرم از ژنوم باکتری هموفیلوس آنفلوانزا انجام شد. برنامه PCR شامل مراحل زیر بود: یک مرحله واسرشت اولیه در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، ۴۰ چرخه تکثیر DNA با شرایط واسرشت در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، مرحله اتصال در ۶۶/۶ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه، تکثیر با دمای ۷۲ درجه به مدت یک دقیقه و نهایتا یک مرحله تکثیر نهایی در ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه،(۱۱). پس از اتمام واکنش تکثیر، ۵ میکرولیتر محصول واکنش به همراه یک میکرولیتر بافر لودینگ بر روی ژل آگارز یک درصد تحت تاثیر ولتاژ ۱۰۰ الکتروفورز گردید. هم چنین یک واکنش ۲۵ میکرولیتری با شرایط مشابه و استفاده از آب دیونیزه به جای ژنوم باکتری به عنوان کنترل منفی انجام شد.

کلونینگ ژن ompp6 و تهیه کنترل مثبت

به منظور ساخت کنترل مثبت از کلونینگ محصول PCR ژن ompp6 استفاده شد. پس از تکثیر ژن هدف، محصول آن با استفاده از کیت استخراج از ژل(شرکت Core Bio، کشور کره جنوبی) استخراج و خالص سازی گردید. اتصال قطعه مورد نظر به تی-وکتور pTZ57R/T مطابق با روش پیشنهادی شرکت سازنده(شرکت Fermentas، کشور لیتوانی) انجام شد.

پس از تهیه سلول های پذیرا باکتری E.coli JM107، ترانسفورماسیون انجام و باکتری های ترانسفورم شده روی محیط LB agar (Luria-Bertani agar)(شرکت Merk، کشور آلمان) حاوی ایزوپروپیل بتا دی تیوگالاکتو پیرانوزید (Isopropyl-[beta]-D-Thiogalactopyranoside; IPTG) با غلظت ۳۸/۴ میکروگرم بر میلی لیتر، ۵- برومو ۴- کلرو ۳- ایندولیل بتا دی گالاکتو پیرانوزید(X-Gal) با غلظت ۴۰

میکروگرم بر میلی لیتر، نالیدیکسیک اسید با غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر و آمپی سیلین با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر کشت داده شد. پس از تشکیل کلونی ها، چند کلونی سفید و یک کلونی آبی(به عنوان کنترل منفی) از نظر دریافت وکتور دارای ژن ompp6 با روش کلونی PCR آزمایش شد. استخراج پلاسمید با استفاده از کیت AccuPrep Plasmid Mini Extraction Kit(شرکت Bioneer، کشور کره)، در مورد یک کلون مثبت انجام گرفت. ارزیابی کمی و کیفی پلاسمید استخراج شده با استفاده از تعیین جذب نوری در طول موج های ۲۸۰-۲۶۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر(Picodrop) و الکتروفورز روی ژل آگارز یک درصد انجام شد. از روش هضم آنزیمی برای تائید کلون دریافت کننده محصول PCR ژن ompp6 استفاده شد. به این منظور، ابتدا سکانس ناحیه کلونینگ چندگانه (Multiple Cloning Site; MCS) وکتور ارزیابی شد و بر این اساس دو آنزیم HindIII(شرکت Fermentas، کشور لیتوانی) و SacI(شرکت Fermentas، کشور لیتوانی) انتخاب شد،(۱۲). (این واکنش آنزیمی منجر به خروج ژن هدف از وکتور می شد). برای تایید نهایی پلاسمید نوترکیب(pTZ57R/T-ompp6)، ترادف ژن کلون شده با استفاده از روش Cycle sequencing و به کمک پرایمرهای یونیورسال M13 تعیین توالی گردید.

تعیین حد تشخیص واکنش PCR

ابتدا غلظت پلاسمید تایید شده در مرحله قبل (pTZ57R/T-ompp6) با استفاده از روش تعیین جذب نوری توسط دستگاه اسپکتروفتومتر(Picodrop) مشخص گردید،(۱۲). سپس رقت های متوالی ۸-۱۰ تا ۱-۱۰ در حجم ۱۰۰ میکرولیتر از این پلاسمید با غلظت اولیه ۱۱ نانوگرم تهیه شد. بر روی تمامی این رقت ها واکنش PCR ژن هدف انجام شد و کمترین رقتی از آن که باند واضحی را پس از PCR نشان داد به عنوان حد تشخیص در نظر گرفته شد. تعداد کپی قابل تشخیص طبق روش Chiang محاسبه گردید.(۱۳)

تعیین ویژگی واکنش PCR

جهت تعیین ویژگی واکنش، از ژنوم باکتری های کنترل منفی که اسامی آن ها در جدول شماره ۱ ذکر شده است استفاده شد. واکنش PCR بر روی این ژنوم ها، مطابق شرایط قبل انجام گرفت. از سویی دو واکنش PCR یکی با ژنوم باکتری هموفیلوس آنفلوانزا و دیگری با آب مقطر دو بار تقطیر به ترتیب به عنوان کنترل مثبت و کنترل منفی PCR، تهیه شد. ارزیابی کیفی محصولات بدست آمده، به واسطه الکتروفورز بر روی ژل آگارز یک درصد انجام شد.

یافته های پژوهش

نتیجه واکنش PCR مربوط به ژن ompp6 باند مورد انتظار ۲۸۰ جفت بازی را بر روی ژل آگارز نشان داد.(شکل شماره ۱) پس از تهیه ماتریکس از تعدادی از کلونی های سفید رنگ، نتایج واکنش کلونی PCR تشکیل باند ۲۸۰ جفت بازی ترادف هدف را نشان داد، که تاییدکننده حضور ژن هدف در کلونی های سفید رنگ بود.

در واکنش هضم آنزیمی مطابق انتظار آنزیم SacI در نوکلئوتید ۲۵-۶۲۱ وکتور و آنزیم HindIII در نوکلئوتید ۹۴-۶۹۰ وکتور، در ناحیه کلونینگ چندگانه وکتور، برش ایجاد کرد. الکتروفورز محصول هضم آنزیمی پلاسمید pTZ57R/T-ompp6 بر روی ژل آگارز، مطابق با انتظار باندهای حدوداً ۲۸۰۰ جفت بازی(مربوط به backbone پلازمید pTZ57R/T) و حدودا ۲۸۰ جفت بازی (مربوط به محصول PCR ژن ompp6) را نشان داد.(شکل شماره ۲) این مطلب تاییدکننده حضور محصول PCR ژن ompp6 در وکتور pTZ57R/T بود.

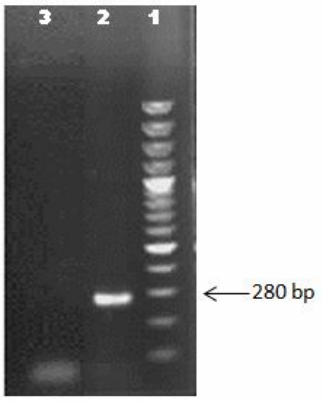
جهت تایید نهایی پلاسمید pTZ57R/T-ompp6، پروسه توالی یابی انجام شد و نتایج حاصل از توالی یابی با توالی ثبت شده از این ژن در Gene bank (AAZE01000002) با استفاده از نرم افزار CLC Sequence viewer (Version 6.4) ترازبندی شد. نتایج نشان داد که سکانس توالی یابی شده کاملاً با توالی های ثبت شده از این ژن در Gene Bank مطابقت دارد. به این ترتیب صحت حضور ژن در وکتور pTZ57R/T-ompp6 تایید شد.

آخرین باند ناشی از تکثیر ژن هدف در پلاسمید pTZ57R/T-ompp6 با غلظت اولیه ۱۱ نانوگرم، در رقت ۴-۱۰(غلظت ۱/۱ پیکوگرم) مشاهده گردید. محاسبه تعداد کپی ژن هدف در این غلظت از پلاسمید، با استفاده از روش Chiang عدد ۳۱۷ را نشان داد. بنا بر این روش طراحی شده در این مطالعه قادر به تشخیص حداقل تعداد ۳۱۷ کپی از ژن ompp6 در یک واکنش ۲۵ مایکرولیتری می باشد.(شکل شماره ۳)

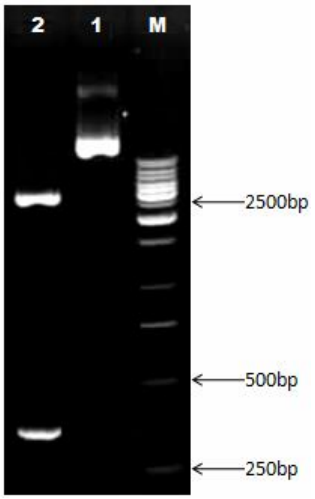
هیچ گونه تکثیری با استفاده از پرایمر های اختصاصی ژن ompp6 بر روی ژنوم های باکتری های کنترل منفی مشاهده نشد. این نتایج بیانگر این بود که پرایمرهای طراحی شده برای ژن ompp6 کاملاً اختصاصی عمل کرده و تنها ژن ompp6 باکتری هموفیلوس آنفلوانزا را تکثیر می دهند.(شکل شماره ۴)

جدول شماره ۱. لیست ژنوم باکتری های کنترل منفی

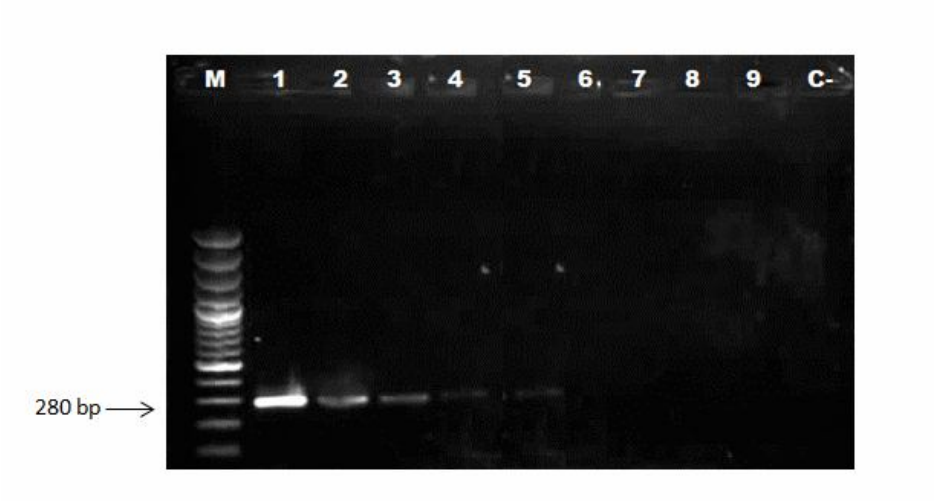
نام ارگانیسم	شماره سویه
Shigella sonnei	ATCC 9290
Klebsiellapneumoniae	ATCC 7881
Escherichia coli	ATCC 25922
Bacillus subtilis	ATCC 6051
Staphylococcus aureus	ATCC 25923
Enterococcus faecalis	ATCC 29212
Salmonella Typhi	ATCC 700931
Streptococcus penumoniea	ATCC 700669
Neisseria meningitides	ATCC13060
Coxiella burnetii	ATCC 13032
E.coli O157H7	ATCC 43895
E.coli EPEC	ATCC 43887
Yersinia enterocolitica	PTCC 1480
Yersinia pseudotuberculosis	ATCC 29833



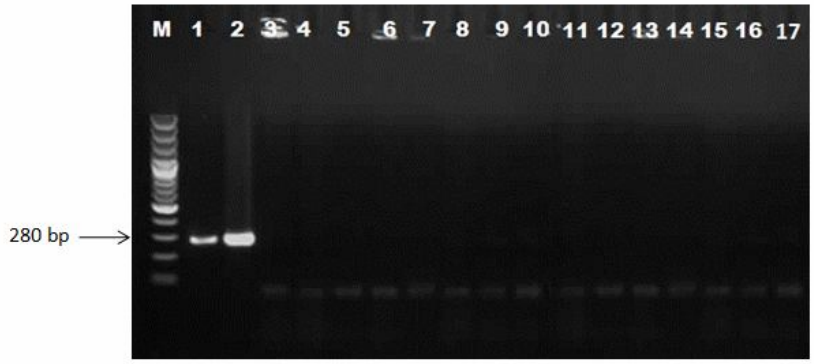
شکل شماره ۱. نتایج واکنش PCR بر روی DNA ژنومیک باکتری هموفیلوس آنفلوانزا. مطابق شکل، پرایمرهای اختصاصی ژن ompp6 قطعه مورد انتظار ۲۸۰ جفت بازی را تکثیر داده اند.
۱: شاخص مولکولی ۱۰۰ جفت بازی؛
۲: باند ۲۸۰ جفت بازی مربوط به تکثیر ژن ompp6؛
۳: کنترل منفی PCR



شکل شماره ۲. نتیجه هضم آنزیمی بر روی وکتور pTZ57R/T-ompp6. **M: شاخص مولکولی ۱۰۰۰ جفت بازی؛**
۱: پلازمید pTZ57R/T-ompp6 **بریده نشده؛**
۲: پلازمید pTZ57R/T-ompp6 **بریده شده با استفاده از آنزیم های** HindIII **و** SacI



شکل شماره ۳. نتایج مربوط به تعیین حساسیت واکنش PCR. **این نتایج نشان داد که کمترین غلظت از پلاسمید** pTZ57R/T-ompp6 **که بعد از** PCR **قابل تکثیر است، غلظت ۱/۱ پیکوگرم است. M: شاخص مولکولی ۱۰۰ جفت بازی؛**
۱: محصول PCR **مربوط به پلاسمید** pTZ57R/T-ompp6 **با غلظت اولیه ۱۱ نانوگرم؛**
۲: محصول PCR **مربوط به پلاسمید با غلظت۱/۱ نانوگرم؛**
۳: محصول PCR **مربوط به پلاسمید با غلظت ۱۱۰ پیکوگرم؛**
٤: محصول PCR **مربوط به پلاسمید با غلظت ۱۱ پیکوگرم؛**
٥: محصول PCR **مربوط به پلاسمید با غلظت ۱/۱ پیکوگرم؛**
٦: محصول PCR **مربوط به پلاسمید با غلظت ۱۱۰ فمتوگرم؛**
۷: محصول PCR **مربوط به پلاسمید با غلظت۱۱ فمتوگرم؛**
۸: محصول PCR **مربوط به پلاسمید با غلظت ۱/۱ فمتوگرم؛**
۹: محصول PCR **مربوط به پلاسمید با غلظت ۰/۱۱ فمتوگرم؛** C- **: کنترل منفی**



شکل شماره ٤. نتایج مربوط به تعیین ویژگی واکنش PCR. مثبت شدن PCR، بر روی DNA ژنومیک باکتری هموفیلوس آنفلوانزا و منفی شدن PCR، بر روی DNA ژنومیک سایر باکتری ها، تایید کننده ویژگی بالای واکنش PCR بود. M: شاخص مولکولی ۱۰۰ جفت بازی؛
۱: محصول PCR مربوط به پلاسمید pTZ57R/T-ompp6 با غلظت اولیه ۱۱ نانوگرم؛
۲: محصول PCR مربوط به DNA ژنومیک باکتری هموفیلوس آنفلوانزا؛
۳: واکنش PCR بر روی ژنوم باکتری شیگلا سونئی؛
٤: واکنش PCR بر روی ژنوم باکتری کلبسیلانیومونیه؛
٥: واکنش PCR بر روی ژنوم باکتری اشرشیاکلای؛
٦: واکنش PCR بر روی ژنوم باکتری باسیلوس سوبتلیس؛
۷: واکنش PCR بر روی ژنوم باکتری استاف اورئوس؛ چاه
۸: واکنش PCR بر روی ژنوم باکتری انتروکوکوس فکالیس؛
۹: واکنش PCR بر روی ژنوم باکتری سالمونلا تیفی؛
۱۰: واکنش PCR بر روی ژنوم باکتری استرپتوکوکوس نیومونیه؛
۱۱: واکنش PCR بر روی ژنوم باکتری نایسریا منتژیتیدیس؛
۱۲: واکنش PCR بر روی ژنوم باکتری کوکسیلا برونتی؛
۱۳: واکنش PCR بر روی ژنوم باکتری اشرشیاکلای سوش O157 H 7؛
۱٤: واکنش PCR بر روی ژنوم باکتری اشرشیاکلای سوش EPEC؛
۱٥: واکنش PCR بر روی ژنوم باکتری یرسینیا انتروکولیتیکا؛
۱٦: واکنش PCR بر روی ژنوم باکتری یرسینیا سودوتوبرکلوزیس؛
۱۷: کنترل منفی

بحث و نتیجه گیری

از ویژگی های مهم استفاده از تکنیک های مولکولی در تشخیص عوامل عفونی، سرعت، حساسیت و ویژگی بالای آن ها است. به همین دلیل استفاده از تکنیک های مولکولی برای تشخیص بیماری ها در دهه گذشته رواج زیادی پیدا کرده است،(۱۴). با توجه به این که مشکلات مختلفی در تشخیص میکروبی باکتری هموفیلوس آنفلوانزا وجود دارد، تشخیص ملکولی آن بسیار حائز اهمیت است،(۳). از این رو در مطالعه حاضر، برای اولین بار در ایران یک تکنیک PCR استاندارد با توسعه کنترل مثبت استاندارد و ارزیابی حساسیت و ویژگی آنالیتیک این روش جهت تشخیص سریع و اختصاصی باکتری هموفیلوس آنفلوانزا راه اندازی گردید.

یکی از مهم ترین اجزای تست های تشخیصی، نمونه کنترل مثبت است. از جمله نمونه های کنترلی که در گذشته به عنوان نمونه کنترل مثبت در تست های تشخیصی جهت تشخیص عامل بیماری زا استفاده می شد، DNA ژنومیک بود. DNA ژنومیک به دلیل سایز بالا، به تغییرات دمای محیط بسیار حساس بوده و ممکن است که قبل از استفاده از

آن به عنوان کنترل مثبت تخریب گردد و در نتیجه پس از انجام PCR منجر به ایجاد نتایج منفی کاذب گردد. در این مطالعه برای غلبه بر این محدودیت و جهت پایداری بیشتر قطعه تشخیصی، پس از تکثیر ژن ompp6 با استفاده از پرایمر های طراحی شده، محصول PCR این ژن در پلاسمید pTZ57R/T کلون گردید و از آن به عنوان کنترل مثبت استاندارد در تست استفاده شد.

یکی از مسائل بسیار مهم در تشخیص مولکولی یک عامل بیماری زا، تعیین حد تشخیص(حساسیت) روش است. محققین از روش های مختلفی برای تعیین حد تشخیص استفاده می کنند. در اکثر مطالعات در مورد باکتری هموفیلوس آنفلوانزا برا ی تعیین حد تشخیص از روش تعیین واحدهای کلونی ساز (Colony Forming Unit) استفاده شده است. سعادتی و همکاران از همین روش جهت تعیین حساسیت واکنش PCR استفاده نمودند. به این صورت که پس از کشت باکتری و اندازه گیری میزان جذب نوری محیط کشت، از محیط مورد نظر تا ۱۰-۱۰ رقت تهیه و برای تمامی رقت ها واکنش PCR انجام شد. سپس جهت محاسبه تعداد باکتری در هر رقت فرایند شمارش کلونی را انجام دادند، که تعداد ۱۵۰۰۰ کلونی باکتری در هر میلی لیتر به عنوان حد تشخیص باکتری هموفیلوس آنفلوانزا تعیین شد،(۹). مهم ترین نقطه ضعف این روش نیازمندی به باکتری زنده است.

در روش دیگر تعیین حساسیت واکنش از DNA ژنومیک استفاده می شود. کتل و همکاران(۱۹۹۰) برای تعیین میزان حساسیت روش PCR، ابتدا از DNA ژنومیک هموفیلوس آنفلوانزا رقت تهیه نمودند و سپس با انجام PCR بر روی این رقت ها، حد تشخیص این روش را ۱۰ پیکوگرم به دست آوردند، این میزان برابر با ۵ کلونی باکتری بود،(۶). از سویی توریگو و همکاران در سال ۲۰۰۷ جهت بررسی حساسیت مطالعه شان مشابه کتل از DNA ژنومیک جهت تعیین حد تشخیص روش شان عمل کردند.(۴)

در سال۲۰۰۷ نیز، بیلال و همکاران حد تشخیص روش multiplex PCR با استفاده از DNA ژنومیک برای شناسایی هموفیلوس آنفلوانزا را ۲ پیکوگرم به دست آوردند،(۱۵). هم چنین آبدلدیم و همکاران(۲۰۰۹) با تهیه رقت سریال از DNA ژنومیک هموفیلوس آنفلوانزا قادر به تشخیص ۳ تا از ۳۰ کپی ژنوم در هر واکنش از PCR شدند،(۱۶). از محدودیت های استفاده از DNA ژنومیک در تعیین LOD واکنش این است که با توجه به ناپایدار و شکننده بودن DNA ژنومیک ممکن است با تهیه رقت سریال از آن کاهش یکنواخت تعداد ژن هدف صورت نگیرد،(۱۷). از این رو در تحقیق حاضر جهت تعیین حساسیت واکنش PCR، از پلازمید کنترل مثبت ساخته شده استفاده گردید و حساسیت واکنش PCR با تهیه سریال از این پلاسمید تعیین گردید. در این مطالعه LOD واکنش PCR برابر با ۳۱۷ کپی در یک واکنش ۲۵ ماکرولیتری PCR به دست آمد. مقایسه و بررسی میزان حساسیت در این روش با روش های مورد استفاده در مطالعات مختلف مشخص نمود که پرایمر های طراحی شده نسبت به پرایمرهای طراحی شده در سایر مطالعات از حساسیت بسیار بالاتری برخوردار هستند.

در این مطالعه برای انتخاب ژن و طراحی پرایمر مقالات متعددی مورد بررسی قرار گرفت. کتل و همکاران برای تشخیص هموفیلوس آنفلوانزا در مایع مغزی نخاعی از روش PCR استفاده کردند. در این پروسه دو جفت پرایمر بر اساس ژن های bexA(ژن کدکننده پلی ساکارید کپسولی) و ompp6(ژن کدکننده پروتئین غشای خارجی P6) طراحی گردید. نتایج حاکی از آن بود که دو جفت پرایمر طراحی شده برای تشخیص این باکتری بسیار مناسب هستند،(۶). بیلال و همکاران در سال ۲۰۰۷ بر روی ژن های ompp6، bexA، ژن کدکننده بتالاکتاماز(tem)، ژن کدکننده کپسول تیپ b هموفیلوس آنفلوانزا(Cpbs) با روش مالتیپلکس PCR کار نمودند و اعلام کردند که روش مالتیپلکس با استفاده از این ۴ ژن، روش بسیار مناسبی جهت تشخیص سریع سویه های غیر قابل طبقه بندی و سروتایپ b هموفیلوس آنفلوانزا در ترشحات مجاری تنفسی فوقانی است،(۱۵). توریگو و همکاران از پرایمرهای ژن ompp6 برای شناسایی قطعی هموفیلوس آنفلوانزا استفاده نمودند،(۴). آبدلدیم و همکاران(۲۰۰۹)، نحوه شناسایی هموفیلوس آنفلوانزا را

در ترشحات تنفسی مورد بررسی قرار دادند. آن ها در مطالعه خود از ۴ ژن ompp6، bexA، 16SrRNA، rnpb استفاده کردند. نتایج این تحقیق و تحقیقات مشابه مشخص نمود که چنانچه PCR بر اساس ژن bexA انجام شود، تنها سروتایپ های کپسول دار این باکتری تشخیص داده می شود، اما ژن ompp6 بسیار اختصاصی تر از ژن های rnpb و 16SrRNA می باشد،(۲۰-۱۸،۱۶). به طوری که این ژن در تمام سویه های کپسول دار و غیر کپسوله هموفیلوس آنفلوانزا به صورت حفاظت شده وجود دارد و قادر به ایجاد تمایز بین سویه های بیماری زا و کومنسال هموفیلوس آنفلوانزا است،(۲۷-۲۱،۶). نتایج آنان نشان داد که از بین ۴ ژن ذکر شده، ژن ompp6 بهترین ژن هدف جهت تشخیص هموفیلوس آنفلوانزا می باشد.(۳۰-۲۸)

در این مطالعه اختصاصیت ژن ompp6 جهت تشخیص اختصاصی باکتری هموفیلوس آنفلوانزا در طی مطالعات بیوانفورماتیکی با استفاده از نرم افزار آنلاین Primer BLAST سایت NCBI مورد ارزیابی قرار گرفت. در این بررسی محصول تکثیری پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه با محصول تکثیری پرایمرهای استفاده شده در سایر مقالات مورد بررسی قرار گرفت و با یکدیگر مقایسه گردید. نتایج این بررسی نشان داد که پرایمرهای طراحی شده در این مقالات علاوه بر تکثیر در باکتری هموفیلوس آنفلوانزا، قادر به تکثیر در ۴ باکتری هموفیلوس همولیتیکوس، هموفیلوس پارا آنفلوانزا، هموفیلوس سومنوس و آوی باکتریوم پاراگالیناروم مشابه با باکتری هموفیلوس آنفلوانزا، بودند،(۴،۶). در حالی که پرایمرهای طراحی شده در این مطالعه علاوه بر تشخیص هموفیلوس آنفلوانزا، تنها قادر به تکثیر یک قطعه ۲۸۰ جفت بازی در باکتری هموفیلوس همولیتیکوس بودند. با توجه به این که این باکتری شاخص ترین باکتری همولیتیک است که به طور طبیعی در مجاری تنفسی فوقانی وجود دارد و با عفونت های نادر با شدت متوسط در مجاری تنفسی فوقانی در سنین کودکی مرتبط است، ورود این ارگانیسم به CSF بسیار نادر است،(۳۱). به عبارتی استفاده از پرایمرهای طراحی شده در این مطالعه جهت تشخیص باکتری هموفیلوس آنفلوانزا، هیچ گونه خللی را در شناسایی این باکتری ایجاد نخواهد کرد. نتایج این بررسی نشان داد که پرایمرهای طراحی شده در مطالعه حاضر نسبت به پرایمرهای سایر مقالات، از ویژگی بسیار بالاتری برای ژن ompp6 باکتری هموفیلوس آنفلوانزا برخوردار است.

در مطالعه حاضر، برای تعیین ویژگی واکنش PCR برای ژن ompp6 باکتری هموفیلوس آنفلوانزا مطابق جدول شماره ۱ از ژنوم دو باکتری مهم دیگر مولد مننژیت در CSF(استرپ نیومونیه و نایسریا مننژیتیدیس) استفاده شد. نتایج این بررسی نشان داد که پرایمرهای طراحی شده برای باکتری هموفیلوس آنفلوانزا کاملاً اختصاصی عمل کرده و قادر به تشخیص و افتراق این باکتری از سایر باکتری های مولد مننژیت در CSF هستند.

این مطالعه نشان داد که PCR ژن ompp6 باکتری هموفیلوس آنفلوانزا روشی با حساسیت و ویژگی آنالیتیک بالا است و ظرفیت بالایی برای استفاده به عنوان ابزاری در تشخیص سریع مننژیت ناشی از این باکتری به ویژه در موارد مصرف آنتی بیوتیک توسط بیمار را دارد، از طرفی با توجه به مز یت های این روش، به کارگیری آن پس از انجام معاینات بالینی لازم برای تشخیص بیماری و تسریع در شناسایی در آزمایشگاه های تشخیصی مفید و سودمند خواهد بود.

سپاسگزاری

مطالعه حاضر حاصل بخشی از طرح تحقیقاتی است که با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی ارتش به انجام رسیده است. بدین وسیله از تمامی مسئولان و همکاران در دانشگاه علوم پزشکی ارتش و مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی تسنیم که در انجام این تحقیق ما را یاری نمودند، تشکر می نماییم.

References

1-Hirschmann J, Everett ED. Haemophilus influenzae infections in adults: report of nine cases and a review of the literature. Medicine(Baltimore) 1979;58:80-94.
2-Maaroufi Y, De Bruyne JM, Heymans C, Crokaert F. Real-time PCR for determining capsular serotypes of Haemophilus influenzae. J Clin Microbiol 2007;45:2305-30.
3-Rafi W, Chandramuki A, Mani R, Satishchandra P, Shankar SK. Rapid diagnosis of acute bacterial meningitis: role of a broad range 16S rRNA polymerase chain reaction. J Emerg Med 2010;38:225-30.
4-Torigoe H, Seki M, Yamashita Y, Sugaya A, Maeno M. Detection of Haemophilus influenzae by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of the outer membrane protein P6 gene. Jpn J Infect Dis 2007;60: 55-8.
5-Uzuka R, Kawashima H, Hasegawa D, Ioi H, Amaha M, Kashiwagi Y, et al. Rapid diagnosis of bacterial meningitis by using multiplex PCR and real time PCR. Pediatr Int 2004;46:551-4.
6-Van Ketel R, De Wever B, Van Alphen L. Detection of Haemophilus influenzae in cerebrospinal fluids by polymerase chain reaction DNA amplification. J Med Microbiol 1990;33:271-6.
7-Yadav M, Chakraborti A, Ray P, Sapru S, Majumdar S, Narang A. Rapid detection of Haemophilus influenzae by hel gene polymerase chain reaction. Lett Appl Microbiol 2003;37:190-5.
8-Failace L, Wagner M, Chesky M, Scalco R, Jobim LF. Simultaneous detection of Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae and Streptococcus sp. by polymerrase chain reaction for the diagnosis of bacterial meningits. Arq Neuropsiquiatr 2005;63:920-4.
9-Saadati M, Nazarian S, Barati B, Mehdizadeh H. Detection of Streptococcus pneumoniae and Haemophilus influenzae by Multiplex polymerase chain reaction(mPCR) assay. Iran biol J 2008;21:83-93.(Persian)
10-Ataee R, Mahrabi Tavana A, Hossaini SMJ, Karami A, Safiri Z, Allahverdi M. Simultaneous detection of common bacterial meningitis: Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae and Streptococcus pneumonia by multiplex PCR. Kowsar Med J 2009;14:119-26.(Persian)
11-Pelt-Verkuil E, Belkum A, Hays JP, editors. Principles and technical aspects of PCR amplification.New Mexico: Springer; 2008.P.19.
12-Sambrook J, Fritsch E.F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Plainview: Cold Spring Harbor Laboratory Press 2001;chapter 1.PP.32,123.
13-Chiang YC, Yang CY, Li C, Ho YC, Lin CK, Tsen HY. Identification of Bacillus spp., Escherichia coli, Salmonella spp., Staphylococcus spp. and Vibrio spp. with 16S ribosomal DNA-based oligonucleotide array hybridization. Int J Food Microbiol 2006;107:131-7.
14-Tzanakaki G, Tsolia M, Vlachou V, Theodoridou M, Pangalis A, Foustoukou M, et al. Evaluation of non culture diagnosis of invasive meningococcal disease by polymerase chain reaction (PCR). FEMS Immunol Med Microbiol 2003;39:31-6.
15-Billal DS, Hotomi M, Suzumoto M, Yamauchi K, Kobayashi I, Fujihara K, et al. Rapid identification of nontypeable and serotype b Haemophilus influenzae from nasopharyngeal secretions by the multiplex PCR. Int J Pediatr Otorhinolaryngol 2007; 71:269-74.
16-Abdeldaim GMK, Strålin K, Kirsebom LA, Olcén P, Blomberg J, Herrmann B. Detection of Haemophilus influenzae in respiratory secretions from pneumonia patients by quantitative real-time polymerase chain reaction. Diagn Microbiol Infect Dis 2009;64:366-73.
17-Soleimani M, Eini F, Raufi MF, Azari F, Farzampour S, Jamshidian E, et al. Design of Multiplex Polymerase Chain Reaction (PCR) Method for Molecular Detection of Yersinia pestis Bacterium. Yakhteh Med J 2010;12:363-70.(Persian)
18-Karlsson E, Melhus A. Nontypeable Haemophilus influenzae strains with the capsule associated insertion element IS1016 may mimic encapsulated strains. Apmis 2006;114:633-40.
19-Sam IC, Smith M. Failure to detect capsule gene bexA in Haemophilus influenzae types e and f by real-time PCR due to sequence variation within probe

binding sites. J Med Microbiol 2005;54: 453-5.
20-Corless CE, Guiver M, Borrow R, Edwards-Jones V, Fox A, Kaczmarski E. Simultaneous detection of Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae, and Streptococcus pneumoniae in suspected cases of meningitis and septicemia using real-time PCR. J Clin Microbiol 2001;39: 1553-8.
21-Strålin K, Bäckman A, Holmberg H, Fredlund H, Olcén P. Design of a multiplex PCR for Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae, Mycoplasma pneumoniae and Chlamydophila pneumoniae to be used on sputum samples. Apmis 2005;113: 99-111.
22-Murphy T, Bartos L, Campagnari A, Nelson M, Apicella M. Antigenic characterization of the P6 protein of nontypable Haemophilus influenzae. Infect Immun 1986;54:774-9.
23-Nelson MB, Munson RS Jr, Apicella MA, Sikkema DJ, Molleston JP, Murphy TF. Molecular conservation of the P6 outer membrane protein among strains of Haemophilus influenzae: analysis of antigenic determinants, gene sequences, and restriction fragment length polymorphisms. Infect Immun 1991;59:2658-63.
24-Hotomi M, Tabata T, Kakiuchi H, Kunimoto M. Detection of Haemophilus influenzae in middle ear of otitis media with effusion by polymerase chain reaction. Int J Pediatr Otorhinolaryngol 1993;27:119-26.
25-Karalus RJ, Murphy TF. Purification and characterization of outer membrane protein P6, a vaccine antigen of non typeable Haemophilus influenzae. FEMS Immunol Med Microbiol 1999;26:159-66.
26-Nelson M, Apicella M, Murphy T, Vankeulen H, Spotila L, Rekosh D. Cloning and sequencing of Haemophilus influenzae outer membrane protein P6. Infect Immun 1988;56:128-34.
27-Ueyama T, Kurono Y, Shirabe K, Takeshita M, Mogi G. High incidence of Haemophilus influenzae in nasopharyngeal secretions and middle ear effusions as detected by PCR. J Clin Microbiol 1995;33: 1835-8.
28-Casin I, Grimont F, Grimont P, editors. Deoxyribonucleic acid relatedness between Haemophilus aegyptius and Haemophilus influenzas. Ann Inst Pasteur Microbiol 1986;137b:155-63.
29-Hedegaard J, Okkels H, Bruun B, Kilian M, Mortensen KK, Nørskov-Lauritsen N. Phylogeny of the genus Haemophilus as determined by comparison of partial infB sequences. Microbiology 2001;147:2599-609.
30-Norskov-Lauritsen N, Overballe MD, Kilian M. Delineation of the species Haemophilus influenzae by phenotype, multilocus sequence phylogeny, and detection of marker genes. J bacterial 2009;191:822-31.
31-Murphy TF, Brauer AL, Sethi S, Kilian M, Cai X, Lesse AJ. Haemophilus haemolyticus: a human respiratory tract commensal to be distinguished from Haemophilus influenzae. J Infect Dis 2007;195:81-9.

Design of Polymerase Chain Reaction (PCR) Assay for Molecular Detection of Haemophilus Influenzae Bacterium

Taghinezhad S[1], Soleimani M[2], Mohseni A.H[2], Majidzadeh K[2]*

(Received: 14 Nov. 2010 Accepted: 16 Oct. 2011)

Abstract

Introduction: Haemophilus influenza (H. influenza) is an important cause of meningitis in infants and children aged less than five years. For this reason the early diagnosis of this bacterium is important. Studies have shown that molecular methods are specific tests for early detection for this agent. The purpose of this study was to design a PCR assay for the rapid detection of H.influenzae bacterium.

Materials & Methods: In this study specific primers were designed based on ompp6 gene and polymerase chain reaction (PCR) assay was setup. To create the standard positive control, the PCR product was cloned in pTZ57R/T vector. The existence of the desired gene in the T-vector was confirmed by digestion and sequencing processes. Sensitivity of the PCR assay was determined by preparing a serial tenfold dilutions of the positive control plasmid with starting concentration of 11ng/µl. The Specificity of the assay was verified by using of PCR on the genomic DNA of a variety of bacteria.

Findings: PCR results showed a band of the expected size 280bp. Sensitivity results indicated that the limit of detection of the assay was 317 copy numbers. No amplify-ication was observed after PCR in negative control bacteria genomic DNA. This outc-ome proved the specificity of the PCR assay.

Discussion & Conclusion: The results of this study showed that the PCR assay is a rapid, highly sensitive and specific test for detection of H.influenzae bacterium.

Keywords: haemophilus influenzae, rapid detection, PCR

1. Dept of Microbilogy, Faculty of science, Islamic Azad University, Qom branch, Qom, Iran
2. Tasnim Biotechnology of Research Center, Faculty of Medicine, AJA University of Medical Science, Tehran, Iran
** (corresponding author)*