شناسایی سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از نمونه‌های تنفسی با استفاده ازواکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) اختصاصی ژنهای لیپوپروتئین غشای خارجی oprL و oprI و اگزوتوکسین A

محمد مهدی اصلانی[1]، مرجان هاشمی پور[2]، وجیهه سادات نیک بین[3]، فرشته شاهچراغی[4]، اکرم عیدی[5]، زینب شرفی[6]

1- دانشیارمیکروبیولوژی انستیتو پاستور ایران
2- کارشناس ارشد میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات
3- کارشناس ارشد میکروبیولوژی انستیتو پاستور ایران
4- استادیار میکروبیولوژی انستیتو پاستور ایران
5- استادیار زیست شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات
6- کارشناس ارشد میکروبیولوژی دانشگاه شهید بهشتی

یافته / دوره یازدهم / شماره 2 / تابستان 88 / مسلسل 40

چکیده

دریافت مقاله: 87/11/4، ***پذیرش مقاله***: 88/3/13

Ø **مقدمه:** سودوموناس آئروژینوزا از مهمترین عوامل مرگ و میر ناشی از عفونت های بیمارستانی می باشد. با توجه به اهمیت تشخیص سریع این باکتری و اشکالات موجود در روش های بیوشیمیایی در شناسایی این باکتری، هدف بررسی توانایی آزمون PCR دو ژن اختصاصی جنس و گونه ***oprI*** و ***oprL*** و ژن اگزوتوکسین A (***toxA***) در شناسایی سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از نمونه های تنفسی می باشد.

Ø **مواد و روش ها:** 120 نمونه سودوموناس آئروژینوزا ازعفونتهای تنفسی جمع آوری شدند. DNA باکتری استخراج شده و آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی جنس و گونه (***oprI*** و ***oprL***)و پرایمرهای ژن اگزوتوکسین A (***toxA***) انجام شد.

Ø **یافته ها:** از 120 سویه سودوموناس آئروژینوزا مورد بررسی در این مطالعه که با تستهای بیوشیمیایی جنس و گونه آنها تأیید شد 120 نمونه(100%) باروش ملکولی PCR نسبت به ژنهای اختصاصی ***oprI*** و ***oprL*** مثبت بودند. همچنین از این تعداد، 100 سویه (83%) حاوی ژن تولید کننده اگروتوکسین A بودند.

Ø **بحث و نتیجه گیری:** جهت شناسایی سریع سودوموناس آئروژینوزا از نمونه های بالینی با توجه به نتایج بدست آمده با استفاده از PCR دو ژن ***oprI*** و ***oprL*** از حساسیت بیشتر و اختصاصیت کمتری برخوردار است در صورتی که تشخیص این باکتری با استفاده از ژن ***toxA*** دارای اختصاصیت بیشتری است.

Ø **واژه های کلیدی:** سودوموناس آئروژینوزا، ***oprI*** ، ***oprL*** ، اگزوتوکسینA، عفونت بیمارستانی

آدرس مکاتبه: تهران، انستیتو پاستور
پست الکترونیک: ASLANI_MM@yahoo.com

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2024-04-25]

مقدمه

سودوموناس آئروژینوزا شایعترین عامل بیماریزای انسانی در جنس سودوموناس است.این باکتری عامل شایع عفونتهای بیمارستانی است(1). سودوموناس آئروژینوزا بیماریزای مهم و عامل منتهی به مرگ در مبتلایان به فیبروز سیستیک(CF)، بیماری نئوپلاسمی و سوختگیهای شدید است(2).

بیماران مبتلا به فیبروز سیستیک به طور مشخص مستعد ابتلا به عفونت با سودوموناس آئروژینوزا هستند. عفونتهایی که در دوران کودکی اتفاق می افتد با مرگ و میر شدید همراه است (3).همچنین این باکتری باعث عفونتهای جدی مانند سپتی سمی پنومونی، اندوکاردیت ، اوتیت و کراتیت می شود. باکتری در طیف وسیعی از محیطها که محل فعالیت انسان است زندگی می کند (4).درمان سودوموناس آئروجینوزا زمانی که در راههای هوایی بیماران تشکیل بیوفیلم می دهد بسیار مشکل است (5).

عفونتهای تنفسی که توسط این باکتری ایجاد می شود بیشتر در افراد با سیستم ایمنی تضعیف شده و یا افراد با مجاری تنفسی دارای مشکل رخ می دهد . پنومونی ابتدایی در بیماران با بیماری مزمن ریوی رخ می دهد. پنومونی باکتریایی در بیماران مبتلا به سرطان نوتروپنیک و تحت شیمی درمانی وجود دارد . کلنیزاسیون ضعیف مجاری تنفسی در بیماران مبتلا به فیبروز سیستیک توسط سویه های موکوئیدی سودوموناس آئروژینوزا رایج و درمان آن به سختی امکان پذیر است . فیمبریه سودوموناس آئروژینوزا به سلولهای قسمت بالایی سلولهای اپی تلیال مجاری ادراری متصل شده، منجر به کلنیزاسیون می شود .

مقاومت ذاتی سودوموناس آئروژینوزا نتیجه حضور پروتئین های ویژه‌غشای خارجی ازجمله لیپوپروتئین I (OprI) و لیپوپروتئین غشای خارجی مرتبط با پپتیدوگلیکان (OprL) است که در سیستمهای انتقالی و یا قابلیت نفوذ پذیری سلول باکتزی نقش دارند. به ترتیب برای تشخیص جنس وگونه به کار می روند(6). پروتئینهای غشاءخارجی سودوموناس آئروژینوزا نقش مهمی در واکنش باکتری با محیط دارند (7).

اگزوتوکسین A یک پروتئین توکسیک است که توسط سویه های پاتوژن سودوموناس آئروژینوزا تولید می شود(8).اگزوتوکسین A که توسط ژن toxA کد می شود باعث اختلال در فاکتور طویل کننده EF2 در مرحله بیوسنتز پروتئین می شود (9).به نظر می رسد که اگزوتوکسین A عامل بیماریهای سیستمیک ایجاد شده توسط سودوموناس آئروژینوزا می باشدو باعث نکروز در محل کلنیراسیون باکتری و به عنوان عامل کمک کننده در کلنیراسیون باکتری شناخته شده است ،سویه های توکسیژنیک نسبت به سویه های غیر توکسیژن ویرولانس بیشتری داشته و ایجاد پنومونی می کند.

با توجه به اهمیت سودوموناس آئروژینوزا در عفونتهای بیمارستانی و اینکه تا به حال از روشهای بیوشیمیایی جهت شناسایی این باکتری استفاده شده است، هدف از این مطالعه بررسی توانایی آزمون PCR دو ژن اختصاصی جنس و گونه (oprI و oprL) و ژن اگزوتوکسین A(toxA) در شناسایی سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از نمونه های تنفسی در مقایسه با روشهای بیوشیمیایی می باشد.

مواد و روشها

طی سالهای 1385-1384، 110 نمونه سودوموناس آئروژینوزا ازعفونتهای تنفسی (خلط و تراشه) بیمارستانهای امام خمینی و مرکز طبی کودکان جمع آوری شد. جهت تایید جنس و گونه سویه‌های جدا شده به عنوان سودوموناس

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2024-04-25]

آئروژینوزا ابتدا سویه‌ها باروشهای استاندارد بیوشیمیایی (تستهای اکسیداز، کاتالاز، Triple Suger TSI) (Iron، MRVP (Metthyl Red-Voges Proskauer) ،سیمون سیترات، SIM (Sulfide Indole Motility)، رشد در ستریماید آگار، رشد در C°42) تشخیص داده شدند (11،10). سپس DNA باکتری به روش فنل-کلرفرم استخراج شده; بدین صورت که سوسپانسیون باکتری در بافر لیز حاوی SDS و آنزیم پروتئینازK در دمای C°56 انکوبه و پروتئینهای آن با مخلوط فنل-کلروفورم –ایزوآمیل الکل حذف گردید . سپس DNA باکتری با اتانول سرد رسوب داده شده و در بافر TEحاوی RNase حل شد. سپس آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی جنس و گونه (oprI و oprL)و پرایمر اگزوتوکسین A (toxA) انجام شد (جدول 1)(12 و 6)،به این صورت که 5/ میکرولیتر از DNA استخراج شده به PCR Master mix با حجم نهایی µl 25 (هر ویال محتوی 8/ میلی مول $Mgcl_2$ و 2/ میلی مول dNTPs و 5 پیکومول از هر پرایمر و یک واحد آنزیم(Taq polymerase) اضافه گردید. از DNA سودوموناس آئروژینوزا ATCC 27853 به عنوان کنترل مثبت و از DNA اشرشیاکلی ATCC 35218 به عنوان کنترل منفی استفاده شد. ژنهای مذکور طبق برنامه جدول 2 به روش PCR تکثیر شدند.

الکتروفورز نمونه ها در ژل 1% آگارز انجام شده و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید نتایج با UV مشاهده شد. از مارکر 100bp ladder (Fermentase) جهت تأ ییید وزن ملکولی محصولات تکثیر شده استفاده شد.

جدول شماره 1- پرایمر های مورد استفاده در تایید سویه های سودوموناس آئروژینوزا مورد بررسی

مشخصات نام پرایمر	توالی نوکلئوتیدی	وزن مولکولی (bp)	نام ژن
toxA	GACAACGCCCTCAGCATCACCAGC CGCTGGCCATTCGCTCCAGCGCT	396	toxA
oprL	ATGGAAATGCTGAAATTCGGC CTTCTTCAGCTCGACGCGACG	504	oprL
oprI	ATGAACAACGTTCTGAAATTCTCTGCT CTTGCGGCTGGCTTTTTCCAG	249	oprI

جدول شماره 2- برنامه PCR پرایمرهای مورد استفاده

فاکتور ژن مرحله	دما (°C) *oprI&oprL/toxA*	زمان *oprI&oprL/toxA*
دناتوراسیون اولیه	94/94	3/1 Min
دناتوراسیون	94/94	40/30 s
آنلینگ	57/68	50 s / 1 min
طویل شدن	72/72	50 s / 1 min
طویل شدن نهایی	72	5/7 min
تعداد سیکل	25/35	

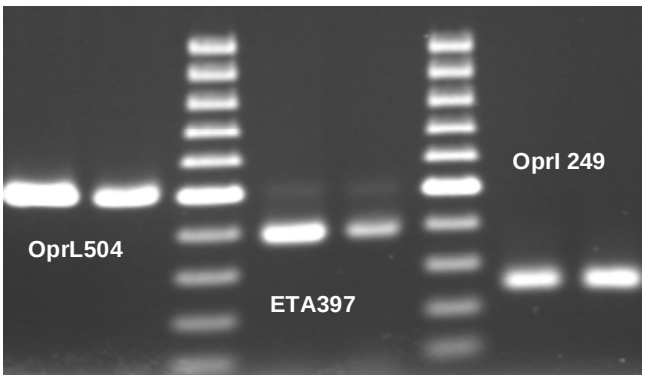
[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2024-04-25]

یافته ها

از 100 سویه سودوموناس آئروژینوزا مورد بررسی در این مطالعه که با تستهای بیوشیمیایی جنس و گونه آنها تأیید شد 100% باروش ملکولی PCR نسبت به ژنهای اختصاصی oprI و oprL مثبت بودند.همچنین از این تعداد سویه 83% حاوی ژن تولید کننده اگزوتوکسین A می باشند(جدول 3) (شکل 1).

جدول شماره 3- فراوانی ژن های *oprI*، *oprL* و *toxA*

ژن	*oprI*	*oprL*	*toxA*
تراشه (n=11)	110(100)	110(100)	93(77)
خلط (n=10)	10(100)	10(100)	6(6)



شکل شماره 1- الکتروفورز ژن های تکثیر شده بر روی ژل آگارز

بحث و نتیجه گیری

سودوموناس آئروژینوزا شایعترین عامل بیماریزای انسانی در جنس سودوموناس است.این باکتری از مهمترین عوامل مرگ و میر در مبتلایان به فیبروز سیستیک (CF)، بیماری نئوپلاسمی و سوختگیهای شدید است . در دهه های اخیر در پی ابداع درمان آنتی بیوتیکی سودوموناس آئروژینوزا به دلیل مقاومت ذاتی به اکثرآنتی بیوتیکها به عنوان یکی از مهمترین پاتوژن های بیمارستانی شناسایی شد (9).

oprI و oprL دو ژن لیپوپروتئین غشائ خارجی در سودوموناس آئروژینوزا می باشند. OprI یک لیپوپروتئین با وزن مولکولی کم است که همیشه در جنس Pseudomonas بیان می شود و تعداد آن در غشای خارجی این جنس زیاد است.OprL پروتئین H2 نیز نامیده می شود و توسط زنجیره های آسیل چرب به صورت کووالان به پپتیدوگلیکان متصل شده است و درشناسایی گونه سودوموناس آئروژینوزا اهمیت دارد (13).

در این بررسی از تکنیک PCR بر اساس جداسازی دو ژن oprI و oprL استفاده شد که آزمون PCR برای 100% سویه ها(120نمونه) که قبلا با تستهای روتین آزمایشگاهی سودوموناس آئروژینوزا تشخیص داده شده بودند، مثبت بود.

اولین بار De Vos و همکاران در سال 1997 از PCR این دو ژن برای شناسایی جنس و گونه سودوموناس آئروژینوزا استفاده کردند که بر طبق نتایج آنها این روش از حساسیت بسیار بالایی برای شناسایی سودوموناس آئروژینوزا برخوردار بود(6).سپس در سال Jiru xu 2004 و همکاران از PCR اختصاصی ژن oprL برای شناسایی سریع این باکتری استفاده کرد و مشاهده نمود که PCR ژن لیپوپروتئین غشائ خارجی سودوموناس آئروژینوزا (oprL) در نمونه های بیماران مبتلا به فیبروز سیستیک منجر به شناسایی سریع این باکتری از ریه بیماران می شود که این روش در مقایسه با روش های کشت معمول 4/5 ماه سریع تر انجام می شود(14).بنابر یافته های موجود در این بررسی نیز تکنیک PCR برای دو ژن oprIو oprL روشی بسیار حساس بوده و در کمتر از 2 ساعت انجام می شود.با این وجود به دلیل احتمال حضور پروتئین هاای مشابه با دو پروتئین غشایی oprI و oprL در سایر باکتری ها این روش از اختصاصیت 100% برخوردار نمی باشد.

علاوه بر PCR دو ژن oprI و oprL در این بررسی از PCR ژن toxA نیز برای شناسایی سودوموناس آئروژینوزا

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2024-04-25]

استفاده شد که فراوانی ژن اگزوتوکسین A به دست آمده 83% (100سویه) می باشد .

در سال 1994 برای اولین بار شناسایی سودوموناس آئروژینوزا از نمونه های کلینیکی و محیطی با استفاده از PCR ژن toxA توسط Khan و دیگران انجام شد که نتایج آن نشان داد که این روش در مقایسه با روشهای بیوشیمیایی دقیق تر و آسان تر می باشد(12).

سپس در سال 2000 توسط Song و همکاران شناسایی نمونه های سودوموناس آئروژینوزا با استفاده از PCR ژن toxA انجام شد که بررسی Khan و همکاران را تایید می کرد(15). همچنین در بررسی که توسط Lanotte و همکاران در سال 2004 انجام شد همه سویه های سودوموناس آئروژینوزا دارای ژن toxA بودند (16). در همین سال در طی بررسی دیگری که توسط Jiru Xu و همکارانش انجام شد شناسایی سودوموناس آئروژینوزا با استفاده از PCR دو ژن oprLو toxA صورت گرفت که در صد شناسایی از طریق بررسی حضور ژن oprL بیشتر از toxA بوده است (14) و این نتیجه با بررسی های صورت گرفته در این تحقیق هم خوانی دارد. زیرا درصد جداسازی ژن toxA در این بررسی 84% است که نسبت به PCR دو ژن oprIو oprL از حساسیت کمتری برخوردار می باشد.ولی از آنجایی که ژن اگزوتوکسین A از فاکتورهای ویرولانس اختصاصی سودوموناس آئروژینوزا بوده می توان برای شناسایی سودوموناس آئروجینوزا از آن استفاده کرد. ولی همانگونه که قبلا نیز گفته شد به دلیل نیاز به روش سریع و دقیق برای شناسایی سودوموناس آئروژینوزا واین مساله که PCR ژن oprI و oprL از اختصاصیت کافی برخوردار نمی باشد لزوم استفاده از یک روش اختصاصی برای شناسایی وجود دارد که می توان PCR ژن toxA را پیشنهاد کرد که مکمل PCR دو ژن oprI و oprL می باشد. بنابراین جهت نتیجه قطعی تر می توان همراه با PCR ژن oprI و oprL از PCR یک ژن اختصاصی دیگر مانند toxA نیز استفاده کرد.

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2024-04-25]

References

1. Van Delden C, Iglewski BH. Cell-to-cell signaling and Pseudomonas aeruginosa infections, Emerg. Infect. Dis 1998; 4: 551-500
2. Senser B, Koseoglu D, Ozcelik U, Kocagoz, T, Gunalp A. Epidemiology of chronic Pseudomonas aeruginosa infections in cystic fibrosis, Int. J. Med. Microbiol, 2001; 291: 387-393
3. Bodey GP, Bolivar R, Stein V, Judeja L. Infections caused by Pseudomonas aeruginosa, Rev. Infect. Dis, 1983; 5: 279-313
4. Pellet S, Bigley DV, Grimes DJ. Distribution of Pseudomoas aeruginosa in riveryn Ecosystem, Apple. Environ. Microbial, 1983; 45: 328-332
5. Ernst RK, Adams KN, Moskowits SM, Kraig GM, KavasakiK, Stead CM. The Pseudomonas aeruginosa lipid A deacylase: selection for expression and loss within the cystic fibrosis airway, J. Bacteriol, 2006; 188: 191-201
6. Daniele Deavos, Ntonio Lim, Jean-Paul Pirnay, Marc Struelens, et al. Direct Detection Of Pseudomonas aeruginosa in Clinical Samples Such as Skin Biopsy specimens and Expectorations by multiplex PCR based on Two outer Membrane Lipoprotein genes, oprI and oprL, J. Clin. Microbiol, 1997; 35: 1295-1299
7. Hancock REW, Siehnel R, Martin N. Outer membrane proteins of pseudomonas. Mol. Microbiol, 1990; 4: 1069-1075
8. Vasil ML, Prince RW, Shortridge VD. Exproduct: Pseudomonas exotoxin A and phospholipase C. In: Fick, R.B.(ed), Pseudomonas aeruginosa: the opportunist-pathogenesis and disease. Boca Raton, FL: CRC Press, 1993: 59-77
9. Hwang J, Fitzgerald DJ, Adhya S, Pastan I. Functional domains of Pseudomonas exotoxin identified by detection analysis of the gene expressed in E. coli, Cell, 1987; 48: 129-136
10. Howard JB, Klaas J, Rubin S, Weissfeld, A, Tilton RC. Clinical and pathogenic Microbiology. Mosboy. Washington D.C. Toronto, 1987: 273-299
11. Lennette EH, Balows A, Hausler WJ, Shadom, HJ. Manual of clinical Microbiology. 4th ed. Washington D.C, 1986
12. Khan AA, Cerniglia CE. Detection of Pseudomonas aeruginosa from clinical and environmental samples by amplification of the exotoxin A gene using PCR, Appli Environ. Microbiol 1994; 60: 3739-3745
13. Bernd HA. Rehm. Pseudomonas. Wiley-VCH, 2008
14. Xu Jiru, Moore John EG, Murphy Philip Millar B, Cherie Elborn J. Early detection of Pseudomonas aeruginosa – comparison of conventional versus molecular (PCR) detection directly from adult patients with cystic fibrosis (CF). Annal of clinic Microbiol & Antimicrobiol, 2004; 3: 21
15. Song KP, Chan TK, Ji LZ, Wong SW. Rapid identification of Pseudomonas

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2024-04-25]

Goudeau A, Quentin R. Genetic features of Pseudomonas aeruginosa isolates from cystic fibrosis patients compared with those of isolates from other origins. J. Med. Microbiol, 2004; 53: 73–81

aeruginosa from ocular isolates by PCR using exotoxin A specific primers, Molecular and Cellular. Probes 2000; 14: 199-204

16. Lanotte Ph, Watt S, Mereghetti L, Dartiguelongue N, Rastegar-Lari A,

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2024-04-25]