

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

محمد مهدی اصلانی¹، مرجان هاشمی پور²، وجیهه سادات نیک بین³، فرشته شاهچراغی⁴، اکرم عیدی⁵، زینب شرفی⁶

- 1- دانشیار میکروبیولوژی 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

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 *oprL* و *oprI* و ژن اگزوتوکسین A (*toxA*) در شناسایی سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از نمونه های تنفسی می باشد.

مواد و روش ها: 120 نمونه سودوموناس آئروژینوزا از عفونتهای تنفسی جمع آوری شدند. DNA باکتری استخراج شده و آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی جنس و گونه (*oprL* و *oprI*) و پرایمرهای ژن اگزوتوکسین A (*toxA*) انجام شد. 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 *oprL* و *oprI* مثبت بودند. همچنین از این تعداد، 100 سویه (83%) حاوی ژن تولید کننده اگزوتوکسین A بودند.

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 *oprL* و *oprI* از حساسیت بیشتر و اختصاصیت کمتری برخوردار است در صورتی که تشخیص این باکتری با استفاده از ژن *toxA* دارای اختصاصیت بیشتری است.

واژه های کلیدی: سودوموناس آئروژینوزا، *oprL*، *oprI*، اگزوتوکسین A، عفونت بیمارستانی

آدرس مکاتبه: تهران، انستیتو پاستور

پست الکترونیک: ASLANI_MM@yahoo.com

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 آئروژینوزا 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 موکوییدی 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 ویژه غشای خارجی از جمله لیپوپروتئین I

(OprI) و لیپوپروتئین غشای خارجی مرتبط با پپتیدوگلیکان (OprL) است که در سیستمهای انتقالی و یا قابلیت نفوذ پذیری سلول باکتری نقش دارند. به ترتیب برای تشخیص جنس و گونه به کار می روند (6). پروتئینهای غشاء خارجی 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 تولید 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 باشد و باعث نکرورز در محل کلنیزاسیون باکتری و به عنوان عامل کمک کننده در کلنیزاسیون باکتری شناخته شده است. سویه های توکسیژنیک نسبت به سویه های غیر توکسیژن ویروانس 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 1384-1385، 110 نمونه سودوموناس آئروژینوزا از عفونتهای تنفسی (خلط و تراشه) بیمارستانهای امام خمینی و مرکز طبی کودکان جمع آوری شد. جهت تایید جنس و گونه سویه های جدا شده به عنوان سودوموناس

صورت که 5/ میکرولیتر از DNA استخراج شده به PCR Master mix با حجم نهایی 25 µl (هر ویال محتوی 0.8 میلی مول Mgcl₂ و 2 میلی مول dNTPs و 5 پیکومول Taq polymerase) از هر پرایمر و یک واحد آنزیم (ATCC 27853 اضافه گردید. از DNA سودوموناس آئروژینوزا ATCC 35218 به عنوان کنترل مثبت و از DNA اشرشیاکلی 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 تأیید وزن ملکولی محصولات تکثیر شده استفاده شد.

آئروژینوزا ابتدا سویه‌ها باروشهای استاندارد بیوشیمیایی (تستهای اکسیداز، کاتالاز، Triple Sugar TSI (Iron)، MRVP (Methyl Red-Voges Proskauer)، سیمون سیترات، SIM (Sulfide Indole Motility)، رشد در ستریماید آگار، رشد در 42°C) 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 56°C انکوبه و پروتئینهای آن با مخلوط فنل-کلروفورم-ایزواامیل الکل حذف گردید. سپس DNA باکتری با اتانول سرد رسوب داده شده و در بافر TE حاوی RNase حل شد. سپس آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی جنس و گونه (*oprL* و *oprI*) و پرایمر اگزوتوکسین A (*toxA*) انجام شد (جدول 1) (12 و 6). به این

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

نام پرایمر	مشخصات	توالی نوکلئوتیدی	وزن مولکولی (bp)	نام ژن
<i>toxA</i>	<i>toxA</i>	GACAACGCCCTCAGCATCACCAGC CGCTGGCCATTCGCTCCAGCGCT	396	<i>toxA</i>
<i>oprL</i>	<i>oprL</i>	ATGGAATGCTGAAATTCGGC CTTCTTCAGCTCGACGCGACG	504	<i>oprL</i>
<i>oprI</i>	<i>oprI</i>	ATGAACAACGTTCTGAAATTCCTGCT CTTGCGGCTGGCTTTTCCAG	249	<i>oprI</i>

جدول شماره 2- برنامه PCR پرایمرهای مورد استفاده

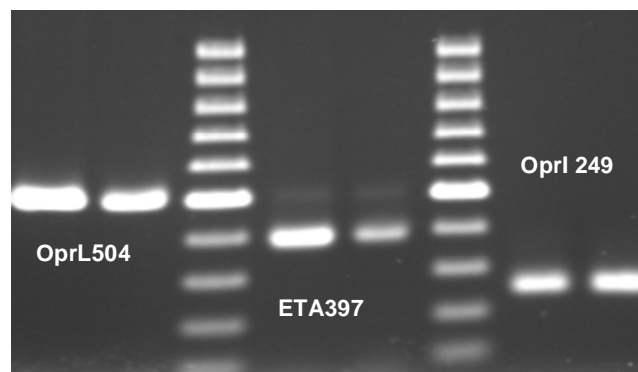
مرحله	فاکتور	دما (°C)	زمان
	ژن	<i>oprI&oprL/toxA</i>	<i>oprI&oprL/toxA</i>
دنا تورا سیون اولیه		94/94	3/1 Min
دنا تورا سیون		94/94	40/30 s
آنلینگ		57/68	50 s / 1 min
طویل شدن		72/72	50 s / 1 min
طویل شدن نهایی		72	5/7 min
تعداد سیکل			25/35

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 *oprL* و *toxA*

ژن	<i>oprI</i>	<i>oprL</i>	<i>toxA</i>
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 فیروز سیستمیک (CF)، بیماری نئوپلاسمی و سوختگیهای شدید است. در دهه های اخیر در پی ابداع درمان آنتی بیوتیکی سودوموناس آئروژینوزا به دلیل مقاومت ذاتی به اکثر آنتی بیوتیکها به عنوان یکی از مهمترین پاتوژن های بیمارستانی شناسایی شد (9).

oprI و *oprL* دو ژن لیپوپروتئین غشای 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 در شناسایی 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 (120 نمونه) 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 2004 Jiru xu و همکاران از PCR اختصاصی ژن *oprL* برای شناسایی سریع این باکتری استفاده کرد و مشاهده نمود که PCR ژن لیپوپروتئین غشای خارجی سودوموناس آئروژینوزا (*oprL*) در نمونه های بیماران مبتلا به فیروز سیستمیک 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). بنابراین یافته های موجود در این بررسی نیز تکنیک PCR برای دو ژن *oprI* و *oprL* روشی بسیار حساس بوده و در کمتر از 2 ساعت انجام می شود. با این وجود به دلیل احتمال حضور پروتئین های 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

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 *oprL* و *oprI* از حساسیت کمتری برخوردار می باشد. ولی از آنجایی که ژن *agz* توکسین A از فاکتورهای ویروالانس اختصاصی سودوموناس آئروژینوزا بوده می توان برای شناسایی سودوموناس آئروژینوزا از آن استفاده کرد. ولی همانگونه که قبلا نیز گفته شد به دلیل نیاز به روش سریع و دقیق برای شناسایی سودوموناس آئروژینوزا و این 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.

استفاده شد که فراوانی ژن *agz* توکسین A به دست آمده 83% (100 سویه) 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 *oprL* و *toxA* صورت گرفت که در صد شناسایی از طریق بررسی حضور ژن *oprL* بیشتر از *toxA* بوده است (14) و

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 *Pseudomonas aeruginosa* in riveryn Ecosystem, *Apple. Environ. Microbial*, 1983; 45: 328-332
5. Ernst RK, Adams KN, Moskowitz SM, Kraig GM, Kawasaki K, 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*. Mosby. 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*

- 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, 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