Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 13, Number 1 (March - April)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Determination of PCR-ELISA Diagnostic Value in Comparison With Classical Methods and PCR to Detect Resistance to Methacillin

Susan Rezavand[1], Jafar Amani[2*], Neda Akbari[1], Hamid Reza Mohajerani[1], Shahram Nazarian[3], Hamideh Mahmoodzadeh Hosseini[2], Mehrdad Moosazadeh Moghaddam[4]

1. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Arak Branch, Islamic Azad University, Arak, Iran
2. Applied Microbiology Research Center, Systems Biology and Poisonings Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Imam Hussein University, Tehran, Iran
4. Applied Biotechnology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Article Information

Article Subject:
Molecular Microbiology

DOI: 10.30699/ijmm.13.1.22

Corresponding author:
Dr. Jafar Amani
Applied Microbiology Research Center, Systems Biology and Poisonings Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
Email:
jafar.amani@gmail.com

Use your device to scan and read the article online

Abstract

Background and Aims: High prevalence of Methicillin Resistant *Staphylococcus Aureus* isolates (MRSA) as well as the multi-drug resistance in this bacterium causes difficulties in the treatment of infections due to these bacteria. Hence, detection of MRSA isolates by rapid and accurate methods is necessary. PCR-ELISA is an accurate and molecular technique that is used for the detection of several pathogens. The aim of this study is the detection of MRSA using PCR-ELISA.

Materials and Methods: Specific primers for *mecA* gene were designed. Then, dNTP labeled with Digoxigenin was applied for amplifying *mecA* gene. DIG-labeled PCR products were seeded on the well coated streptoavidin and identified by anti-DIG–peroxidase conjugate. Furthermore, Biotin-labeled DNA probe specific for *mecA* gene was used. Sensitivity and specificity of the method was determined. Resistance to methicillin among 70 clinical isolates was determined by the disk diffusion, agar dilution and PCR-ELISA methods.

Results: *MecA* gene of *S. aureus* was amplified using gene specific primers resulted in a fragment with 310 bp length. Findings from the PCR-ELISA technic showed no cross-reactivity with *Klebsiella Pneumoniae*, *Bacillus subtilis* and *Esheriashia coli* as control bacteria and its sensitivity was 0.5 ng. The prevalence of MRSA clinical isolates by the disk diffusion, agar dilution and PCR-ELISA methods was 60%, 58.5% and 60%, respectively.

Conclusion: The PCR-ELISA technique was known as an accurate and rapid test for the detection of infection agents using their specific gene. This technic can applied as an appropriate alternative method for time-consuming, less sensitive and expensive techniques such as Real-time PCR and differential biochemical tests which are currently used in laboratory.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, Antibiotic resistance, PCR-ELISA, *mec*A gene

Received: 2017/12/19 Accepted: 2019/06/22 Available online: 2019/07/01

Copyright © 2019 Iranian Journal of Medical Microbiology. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

How to cite this article:

Rezavand S, Amani J, Akbari N, Mohajerani H R, Nazarian S, Mahmoodzadeh H et al . Determination of PCR-ELISA Diagnostic Value in Comparison With Classical Methods and PCR to Detect Resistance to Methacillin. Iran J Med Microbiol. 2019; 13 (1) :22-31

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۳ – شماره ۱ – فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۸

Journal homepage: www.ijmm.ir

تعیین ارزش تشخیصی PCR-ELISA نسبت به روش‌های کلاسیک و PCR برای شناسایی سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین

سوسن رضاوند[۱]، جعفر امانی[۲*] ، ندا اکبری[۱]، حمیدرضا مهاجرانی[۱]،

شهرام نظریان[۳]، حمیده محمودزاده حسینی[۲]، مهرداد موسی‌زاده مقدم[۴]

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشکدهٔ علوم ژایه، واحد اراک، دانشگاه آزاد اسلامی، اراک، ایران

۲. مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، انستیتو سیستم بیولوژی و مسمومیت‌ها، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران

۳. گروه زیست‌شناسی، دانشکدهٔ علوم پایه، دانشگاه امام حسین(ع)، تهران ، ایران

۴. مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچهٔ مقاله

دریافت: ۱۳۹۶/۰۹/۲۸

پذیرش: ۱۳۹۸/۰۴/۰۱

انتشار آنلاین: ۱۳۹۸/۰۴/۱۰

موضوع:

میکروب‌شناسی مولکولی

IJMM1398;13(1): 22-31

نویسندهٔ مسئول:

دکتر جعفر امانی

مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، انستیتو سیستم بیولوژی و مسمومیت‌ها، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران

پست الکترونیک:

jafar.amani@gmail.com

چکیده

زمینه و هدف: شیوع بالای ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* که به آنتی‌بیوتیک متی‌سیلین مقاوم هستند و همچنین ایجاد مقاومت چند دارویی در این باکتری، درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری را با مشکل مواجه کرده است. به همین خاطر شناسایی سویه‌هایMRSA با روش‌های سریع و دقیق ضروری است. PCR-ELISA روش مولکولی دقیقی است که برای شناسایی باکتری‌های مختلفی استفاده شده است. هدف از این تحقیق شناسایی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین با روش PCR-ELISA است.

مواد و روش کار: ابتدا پرایمرهای اختصاصی مربوط به ژن *mecA* طراحی شد. سپس از dNTP نشان‌دارشده به همراه دیگوکسی ژنین برای تکثیر ژن *mecA* استفاده شد. محصولات نشان‌دارشده به کف چاهک‌های واجد استراپتویدین متصل و با آنتی‌بادی کانژوگه ضدنشان DIG شناسایی شد. همچنین از پروب DNA اختصاصی نشان‌دارشده با بیوتین برای ژن *mecA* استفاده و در نهایت حساسیت و اختصاصیت روش تعیین شد. برای این منظور مقاومت به متی‌سیلین در ۷۰ جدایه بالینی با روش انتشار دیسک، آگار دایلوشن و PCR-ELISA ارزیابی شد.

یافته‌ها: با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، ژن *mecA* باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* تکثیر شد که نتیجه آن یک قطعه به طول ۳۱۰ جفت باز بود. نتایج حاصل از PCR-ELISA نشان داد این تکنیک هیچ واکنش متقاطعی با باکتری‌های *کلبسیلا پنومونیه*، *باسیلوس سوبتلیس* و *اشریشیاکلی* به عنوان کنترل ندارد و همچنین میزان حساسیت آن ۰/۵ نانوگرم ارزیابی شد. فراوانی جدایه‌های بالینی مقاوم به متی‌سیلین با روش انتشار دیسک، آگار دایلوشن و PCR-ELISA به ترتیب ۶۰، ۵۸/۵ و ۶۰ درصد بود.

نتیجه‌گیری: تکنیک PCR-ELISA به عنوان روشی حساس و دقیق به منظور شناسایی عوامل بیماری‌زا با استفاده از ژن اختصاصی آنها شناخته شده است. این روش می‌تواند به عنوان روش جایگزین مناسبی برای تکنیک‌های زمان‌بر، با حساسیت کمتر و هزینه بیشتر همچون Real-time PCR و تست‌های بیوشیمیایی افتراقی که در آزمایشگاه‌ها استفاده می‌شوند، به کار رود.

کلمات کلیدی: *استافیلوکوکوس اورئوس*، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، PCR-ELISA، ژن*mecA*

کپی‌رایت © مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده غیرتجاری با ذکر منبع آزاد است.

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس از جمله مهم‌ترین عوامل ایجادکننده عفونت‌های بیمارستانی و اکتسابی در جامعه است و به دلیل قدرت بیماری‌زایی و مقاومت روز افزون در برابر عوامل ضدباکتریایی به یکی از مشکلات بهداشتی مهم در جهان تبدیل شده است (۱، ۲). این باکتری توانایی ایجاد طیف وسیعی از بیماری‌ها را دارد و از طریق تولید انواع توکسین‌ها، تهاجم مستقیم و تخریب بافت‌ها، تظاهرات بالینی مختلفی را پدید می‌آورد (۳، ۴). سالانه میلیون‌ها مورد عفونت‌های *استافیلوکوکی* در سراسر جهان گزارش می‌شود. با توجه به قدرت بیماری‌زایی و شیوع گستردهٔ این باکتری، روش‌های مؤثر برای شناسایی آن به گونه‌ای که در عین سریع بودن، حساسیت و اختصاصیت بالایی

نیز داشته باشد حائز اهمیت است. یکی از مشکلات اصلی در بیماری زایی باکتری بروز مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی از جمله مقاومت به متی‌سیلین است (۵، ۶).

هر چند در سال‌های اخیر روش‌های متعددی برای شناسایی *استافیلوکوکوس اورئوس* در نمونه‌های بیولوژیکی معرفی شده است، ولی هر کدام محدودیت‌های خاص خود را دارند. روش‌های مرسوم برای تشخیص *استافیلوکوکوس اورئوس* در نمونه‌های بالینی، محیط‌های کشت انتخابی، سنجش‌های بیوشیمیایی و روش آگلوتیناسیون است که روش‌هایی پیچیده و وقت‌گیر هستند. در حال حاضر روش‌های مولکولی همچون روش Multiplex PCR و Real-time PCR برای شناسایی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* استفاده می‌شود (۷-۹).

به کمک این روش‌های مولکولی زمان شناسایی نمونه حاوی باکتری از ۴-۳ روز به حدود ۱/۵ روز تقلیل یافته است. همچنین روش‌های PCR حساسیت کمی دارند و نیازمند کشت نمونه‌های بالینی برای تکثیر باکتری هستند که از نظر زمان و هزینه مقرون به‌صرفه نیست (۱۰).

از دیگر روش‌های تشخیص، کیت‌های مبتنی بر آنتی‌بادی‌های منوکلونال هستند که هر چند اختصاصیت زیادی دارند، اما از لحاظ هزینه چندان مقرون به صرفه نیستند (۱۰، ۱۱). روش PCR-ELISA می‌تواند جایگزینی مناسبی برای موارد یادشده باشد؛ زیرا سرعت و حد تشخیص قابل قبولی را در شناسایی مقادیر اندک توالی‌های اختصاصی ژن بیماری فراهم می‌آورد. استفاده از دیگوکسی ژنین (Digoxigenin) نیز یک روش تشخیص مناسب و غیر رادیواکتیوی برای تشخیص محصولات PCR است. در این روش محصولات نشان‌دارشده توسط دیگوکسی ژنین به کمک آنتی‌بادی ضد DIG کونژوگه با آنزیم پراکسیداز شناسایی می‌شود (۱۲). بر این اساس در تحقیق حاضر روش PCR-ELISA طراحی شد تا با استفاده از یک جفت پرایمر و یک پروب اختصاصی به همراه دیگوکسی‌ژنین محصولات PCR نشان‌دارشده، ژن *mecA* در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* تشخیص داده شود.

مواد و روش‌ها

سویه‌های باکتریایی و محیط‌های کشت

برای این منظور سویه استاندارد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC۳۳۵۹۲) از آزمایشگاه رفرانس تهیه شد و در محیط مایع LB (Luria Bertani) تلقیح و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شد. تست‌های بیوشیمیایی تأییدی مربوط به باکتری نیز انجام شد.

استخراج DNA ژنومی

برای انجام واکنش PCR استخراج DNA ژنومی باکتری با استفاده از روش لیزوزیم انجام گرفت. برای این منظور ۱/۵ میلی لیتر از محیط کشت حاوی باکتری رشدیافته به مدت ۱۰ دقیقه با دور rpm ۳۰۰۰ سانتریفوژ شد. رسوب سلول‌ها در ۳۰۰ میکرولیتر بافر HTE (High Tris-EDTA) یکنواخت شد و ۵۰ میکرولیتر لیزوزیم (۱۰ mg/ml) در بافر TNE (Tris, NaCl, EDTA) (pH:7.4)، به محلول اضافه شد. بعد از به هم زدن در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شد. سپس ۳۰۰ میکرولیتر سارکوزیل ۲ درصد (در بافر TE) و ۵ میکرولیتر از RNase (۱۰ mg/ml) در بافر TE (Tris-EDTA) به آن اضافه و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس برای ۱۵ دقیقه قرار داده شد. در ادامه، ۳۵ میکرولیتر از پروتئین K (۲۰ mg/ml) به مخلوط واکنش اضافه و در ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد. برای حذف پروتئین‌ها و جداسازی محلول حاوی DNA از روش فنل-کلروفرم استفاده شد. در ادامه از استات سدیم ۳ مولار و الکل مطلق برای ترسیب ژنوم استفاده شد. پس از شست وشوی رسوب با الکل ۷۰ درصد، نمونه‌ها در دمای محیط خشک و رسوب ژنومی در ۲۰ میکرولیتر بافر TE حل شد. ژنوم به دست آمده بر روی ژل آگارز ۱ درصد بررسی و پس از تعیین غلظت با روش اسپکتروفوتومتری در ۲۶۰ نانومتر برای مراحل بعدی کار استفاده شد.

واکنش PCR

به منظور تکثیر قطعه ژنی، یک جفت پرایمر اختصاصی طراحی شد. پرایمرهای طراحی شده با نرم افزارهای DNASIS، Oligo ۵ از نظر Tm، ΔG، تشکیل لوپ و پرایمر دایمر بررسی شدند (جدول ۱).

جدول ۱. پرایمرها و پروب طراحی‌شده از ژن *mecA*

پرایمر/پروب	توالی نوکلئوتید	تعداد نوکلئوتید
*mec*F	GAAATGACTGAACGTCCGATA	۲۱ باز
*mec*R	CCAATTCCACATTGTTTCGGTCTAA	۲۵ باز
*mec*P	Biotin-AACATTGATCGCAACGTTCA	۲۰ باز

پس از مطمئن‌شدن از مطلوب‌بودن پرایمرها با نرم‌افزارهای طراحی پرایمر، سفارش ساخت به شرکت سینا کلون (ایران) داده شد. واکنش PCR برای تکثیر ژن *mecA* در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام گرفت. هر واکنش شامل ۰/۴ میکرومول از هر پرایمر، ۰/۵ واحد از آنزیم Taq DNA polymerase (شر کت سیناکلون، ایران)، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR ۱۰X، غلظت ۳ میلی مولار $MgCl_2$ و غلظت‌های متفاوت از DNA ژنومی بود. برنامه دمایی PCR شامل واسرشتگی اولیه (Denaturation) در ۹۵ درجهٔ سلسیوس به مدت ۵ دقیقه، واسرشتگی در ۹۵ درجه به مدت ۱ دقیقه، اتصال (Annealing) در۵۹ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، تکثیر (Extension) در ۷۲ درجه به مدت ۴۰ ثانیه و تکثیر نهایی که در ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه صورت گرفت. همچنین واکنش PCR در ۳۰ سیکل انجام شد.

برای مشاهده محصول PCR، ۵ میکرولیتر از محصول نهایی PCR بر روی ژل آگاروز ۱ درصد تهیه‌شده از بافر TBE، الکتروفورز شد. به منظور تعیین اندازه محصول PCR از نشانگر plus ladder ۱۰۰ bp ساخت شرکت سیناژن (ایران) استفاده شد. برای مشاهده محصول، ژل توسط اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی و تصویر ژل با استفاده از دستگاه Gel document (Omega, Germany) تهیه شد. در این تحقیق به منظور تأیید ژن تکثیریافته و برای شناسایی محصول PCR پروب طراحی شد (جدول ۱). پروب با استفاده از نرم افزارهای Oligo و Primer3- BLAST–DNASIS و به منظور بررسی برخی ویژگی‌ها مانند دمای Tm، درصد GC، و احتمال تشکیل لوپ ارزیابی شد. پس از تأیید نهایی، ساخت پروب به صورت نشان‌دارشده با بیوتین به شرکت سینا کلون سفارش داده شد.

نشان‌دارکردن محصول PCR ژنومی به وسیلهٔ DIG-dUTP

برای نشان‌دارکردن محصول PCR ژن *mecA* از DIG- dUTP استفاده شد. برای این منظور در مخلوط dNTPS قسمتی از dTTP با DIG-dUTP جایگزین شد. در بعضی نقاط آنزیم Taq DNA پلیمر به جایdTTP از DIG-dUTP در مقابل باز آدنین استفاده می‌کند. نسبت dTTP: DIG-dUTP استفاده‌شده ۱:۳ بود. علاوه بر نمونه اصلی، یک لوله به عنوان نمونهٔ کنترل منفی و بدون DIG-dUTP در نظر گرفته شد که در آن مخلوط dNTP بدون DIG-dUTP به کار برده شد. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ µl تهیه و سیکل‌های حرارتی مانند قبل در نظر گرفته شد.

PCR-ELISA

برای این منظور ۵ میکرولیتر استرپتاویدین با ۹۵ میکرولیتر بافر پوششی در چاهک A، ۱۰ میکرولیتر محصول PCR نشان‌دارشده با دیگوکسی ژنین با۹۰ میکرولیتر بافر پوششی در چاهک B، ۱۰ میکرولیتر محصول PCR عادی (غیرنشان‌دار) با ۹۰ میکرولیتر بافر پوششی در چاهک C و D، ۱۰۰ میکرولیتر بافر پوششی (Ag-) در چاهک E، ۵ میکرولیتر محصول PCR عادی با ۹۵ میکرولیتر بافر پوششی ریخته و به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شد. سپس چاهک‌ها ۳ بار بافر PBST (فسفات سالین حاوی ۰/۰۵ درصد توین) شست‌وشو داده شد. در مرحله بعد به هر کدام از چاهک‌ها ۱۰۰ میکرولیتر از بافر بلاکینگ واجد ۳ درصد BSA (Bovine serum albumin) اضافه و ۴۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شد. در ادامه چاهک‌ها همانند مرحله قبلی شست‌وشو داده شد. هم زمان با این مرحله ۲۰ میکرولیتر محصول PCR نشان‌دارشده با DIG را در ۸۰ میکرولیتر بافر دورگه‌سازی SSC (saline-sodium citrate) ریخته و مخلوط به مدت ۵ دقیقه جوشانده شد. سپس به آن یک پیکومول پروب نشان‌دار که انتهای ۵ آن بیوتینیله شده بود اضافه شد و به مدت ۱ ساعت در دمای ۵۵ درجه سلسیوس قرار گرفت. در ادامه این مخلوط در چاهک A ریخته شد و به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفت. بعد از ۳ بار شست‌وشو با بافر PBST مقدار ۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌بادی ضد دیگوکسی ژنین نشان‌دار با پراکسیداز با رقت ۱/۱۰۰۰ به هر کدام از چاهک‌ها اضافه شد و مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شد. پس از شست‌وشوی مجدد، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول سوبسترا شامل ۵ میلی‌گرم OPD در ۴ میلی‌لیتر بافر سیترات فسفات با pH ۵ به همراه ۵ میکرولیتر از آب اکسیژنه ۳۰ درصد به هر چاهک اضافه شد و برای چند دقیقه در اتاقک تاریک نگهداری شد. در ادامه برای توقف واکنش از ۱۰۰ میکرولیتر اسید سولفوریک ۲/۵ مولار استفاده شد. سپس جذب نوری با استفاده از دستگاه (ELISA Reader, Biotek USA) در طول موج ۴۹۲ نانومتر خوانده شد.

تعیین حداقل غلظت ژنومی قابل تشخیص با روش PCR-ELISA با استفاده از محصولات PCR ژن mecA نشان‌دارشده

پس از تعیین غلظت محصول PCR ژن *mecA* نشان‌دارشده، به صورت سریالی رقت‌های مختلف بر حسب نانوگرم مختلف (۵۲۰ نانوگرم تا ۰/۲۵۲ نانوگرم) تهیه شد. یک چاهک به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد و۱۰ ماکرولیتر از آن به هریک از چاهک‌ها اضافه شد و سایر مراحل آشکارسازی انجام و با دستگاه خوانندهٔ الایزا (ELISA reader) اندازه‌گیری شد.

تعیین میزان اختصاصیت روش PCR-ELISA

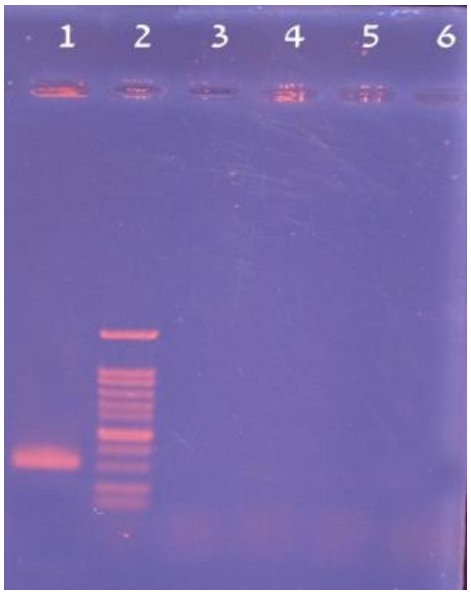
برای بررسی اختصاصیت پرایمرهای طراحی‌شده، از باکتری‌های *کلبسیلا*، *باسیلوس سوبتلیس* و *اشریشیاکلی* استفاده شد و آزمون PCR و سپس PCR-ELISA با آن‌ها ارزیابی شد.

تشخیص نمونه‌های بالینی با استفاده از روش PCR-ELISA

به منظور بررسی کارایی تشخیص تکنیک PCR-ELISA طراحی‌شده، ۷۰ نمونه بالینی استفاده شد که از نظر وجود باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مثبت تشخیص داده شدند. نمونه‌های مذکور از کشت خون، ادرار و زخم مراجعه‌کنندگان به آزمایشگاه‌های تشخیص طبی و بیمارستان‌های شهر اراک طی بازهٔ زمانی اردیبهشت تا شهریور ماه ۱۳۹۵جمع‌آوری شده بودند. پس از کشت مجدد سویه‌های جداشده، هویت باکتری‌ها با روش‌های استاندارد شامل کاتالاز مثبت، DNase مثبت، رشد در مانیتول سالت آگار تعیین و تأیید شد. در مرحله بعد، نمونه‌های حاوی *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین با روش انتشار دیسک غربال شدند. به طور خلاصه پس از کشت ۲۴ ساعته، غلظت ۰/۵ مک فارلند از هر جدایه به صورت چمنی روی محیط agar Müller-Hinton حاوی ۴ درصد کلرید سدیم و در مجاورت دیسک آنتی‌بیوتیک اگزاسیلین تهیه‌شده از شرکت HiMedia به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سلسیوس کشت داده شد. نتایج مقاومت بر اساس برنامه شرکت سازنده دیسک بررسی شد. سپس به منظور تعیین MIC برای نمونه‌های مقاوم به متی‌سیلین، از روش آگار دایلوشن استفاده شد. برای این منظور از محیط کشت محیط Müller-Hinton agar حاوی ۴ درصد کلرید سدیم و ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک اگزاسیلین استفاده شد. به طور خلاصه، پس از کشت ۲۴ ساعته، غلظت ۰/۵ مک فارلند از هر جدایه تهیه شد و تعداد 10^4 باکتری در این محیط Müller-Hinton agar کشت داده شد و نمونه‌ها در دمای ۳۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۸ ساعت نگهداری شدند. در این آزمایش از *استافیلوکوکوس اورئوس* ۳۳۵۹۲ATCC به عنوان کنترل مثبت استفاده شد (۱۳).

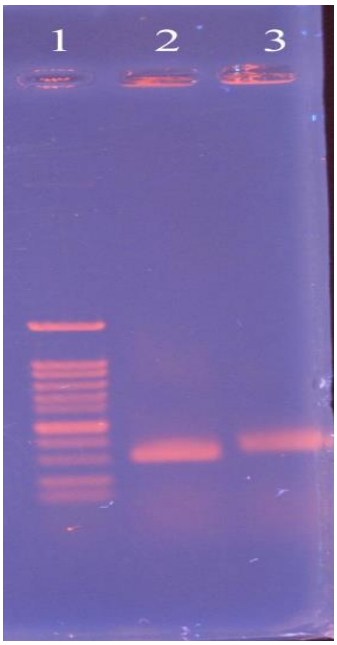
یافته‌ها

DNA ژنومی باکتری استخراج و غلظت آن ۱۲۰۰ نانوگرم در میکرولیتر تعیین شد. به منظور انجام واکنش PCR پرایمرهای اختصاصی برای ژن *mecA* طراحی شد که با بهینه‌کردن واکنش PCR، قطعه اختصاصی جفت بازی تکثیر شد. اختصاصیت پرایمر طراحی‌شده نیز با سایر باکتری‌ها بررسی شد. همان‌طور که در شکل ۱ دیده می‌شود، پرایمرهای طراحی‌شده به طور اختصاصی منجر به تکثیر ژن *mecA* در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* شده است.



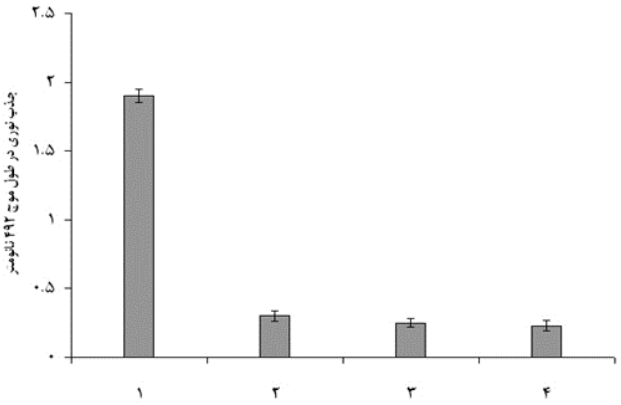
شکل ۱. بررسی اختصاصیت واکنش PCR

ستون ۱: محصولات واکنش PCR با باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* با طول ۳۱۰جفت باز، ستون ۲: نشانگر اندازه DNA (۱۰۰bp DNA ladder)، ستون ۳: کنترل منفی، ستون ۴: محصولات واکنش PCR با باکتری *کلبسیلا*، ستون ۵: محصولات واکنش PCR با باکتری *اشریشیاکلی*، ستون ۶: محصولات واکنش PCR با باکتری *باسیلوس سوبتلیس*



شکل ۲. نشان‌دارکردن محصول PCR با DIG-dUTP

ستون ۱: نشانگر اندازه DAN (۱۰۰bp DNA ladder)، ستون ۲: محصول PCR نشان‌دارنشده، ستون ۳: محصول PCR نشان‌دار شده

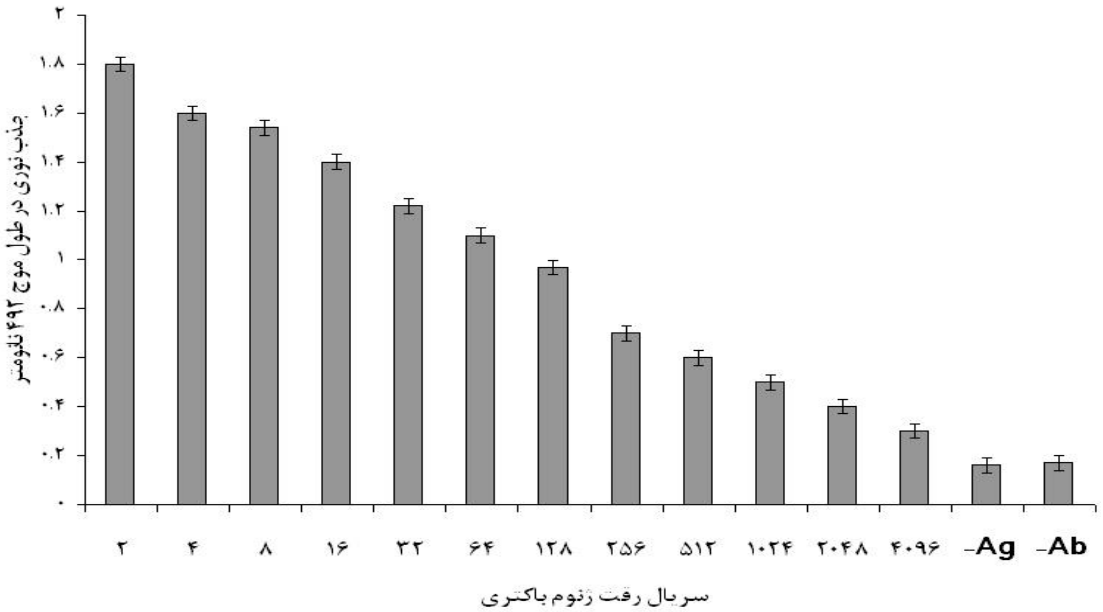


شکل ۳. آشکارسازی پلیت‌های میکروتیترحاوی آویدین. ردیف ۱: محصول PCR نشان‌دارشده با DIG-dUTP، ردیف ۲: محصول PCR نشان‌دارشده، ردیف ۳: کنترل بدون آنتی‌ژن، ردیف ۴: کنترل بدون آنتی‌بادی

در ادامه به منظور نشان‌دارکردن محصول PCR از DIG-dUTP استفاده شد. همان‌طور که در شکل ۲ دیده می‌شود محصول PCR تکثیرشده با دیگوکسی ژنین نیز تک‌باند است و تا حدودی بیشتر از محصول PCR تکثیرشده با dNTPs عادی است. علت این امر وجود دیگوکسی ژنین در محصول PCR نشان‌دارشده است که باعث سنگین‌شدن قطعهٔ مورد نظر شده است. این امر دلیلی بر انجام واکنش PCR در حضور DIG-dUTP است.

پس از نشاندارکردن محصولات PCR، آزمایش الایزا انجام گرفت و جذب نوری در طول موج ۴۹۲ نانومتر با دستگاه ELISA Reader خوانده شد. همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود میزان OD ثبت‌شده محصول PCR نشان‌دارشده ژن برابر ۱/۹ است که این میزان OD در حد قابل قبولی است.

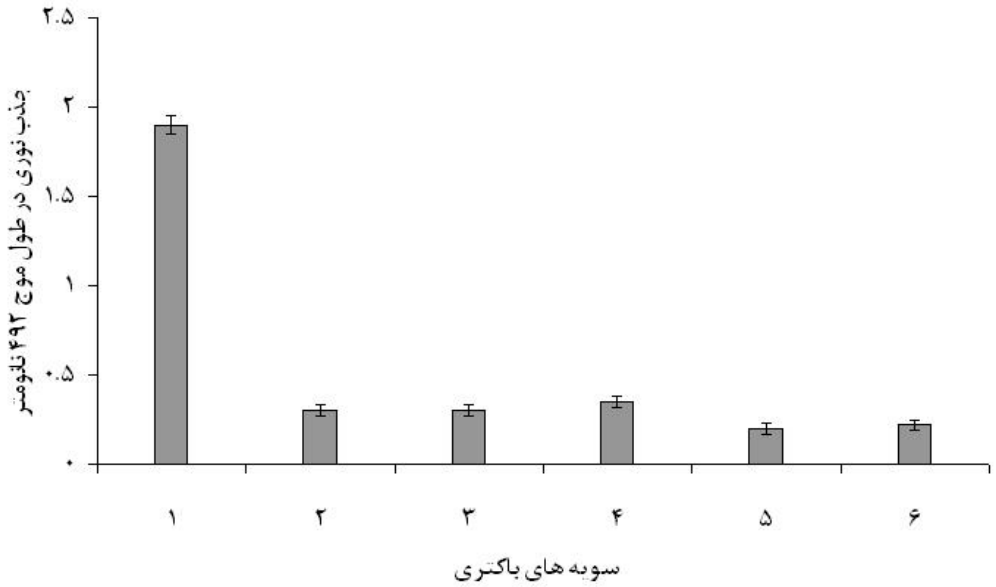
برای بررسی حساسیت و تعیین حداقل غلظت ژنومی قابل تشخیص توسط روش تشخیصی PCR-ELISA ،از ژنوم تخلیص‌شده سریال رقت تهیه شد و پس از تکثیر قطعه مورد نظر با روش PCR به کمک الایزا آشکارسازی صورت گرفت (شکل ۴). نتایج به‌دست‌آمده نشان دهندهٔ معنادار و قابل قبول بودن جواب‌ها در OD=۰/۴ برابر با رقت ۱/۲۰۴۸ (غلظت ۰/۵۰۵ نانوگرم بر میکرولیتر) است.



شکل ۴. تعیین حساسیت PCR-ELISA با سریال رقت ژنوم باکتری

اعداد ۲ تا ۴۰۹۶ نشانگر سریال رقت ژنوم است و به ترتیب واجد ۵۲۰ نانوگرم تا ۰/۲۵۲ نانوگرم بر میکرولیتر از ژنوم تخلیص‌شده است. Ag-: بدون آنتی‌ژن، Ab: بدون آنتی‌بادی

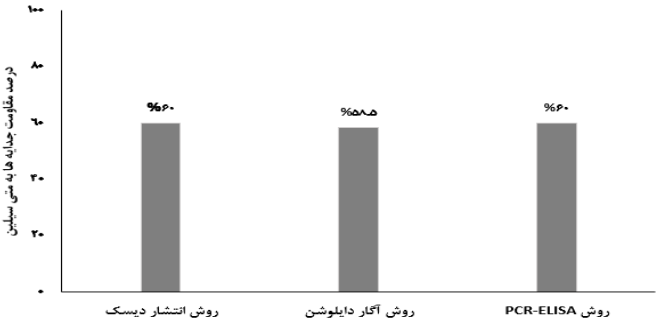
اختصاصیت روش تشخیصی نیز با به‌کارگیری سایر باکتری‌ها ارزیابی شد. نتایج حاصل نشان‌دهندهٔ اختصاصی‌بودن پرایمرهای طراحی‌شده بود؛ به طوری که برای سایر باکتری‌ها هیچ باندی بر روی ژل آگارز مشاهده نشد. سپس نتایج به‌دست‌آمده با روش PCR-ELISA مطابق اطلاعات ارائه شده در شکل ۵ ارزیابی و ثبت شد. جذب نوری نمونه مربوط به *استافیلوکوکوس اورئوس* بیش از حد مقادیر کنترل‌های واکنش بود، در حالی که جذب نوری برای باکتری‌های دیگر کمتر از کنترل واکنش بود.



شکل ۵. تعیین اختصاصیت PCR-ELISA با استفاده از سایر باکتری‌ها

۱. *استافیلوکوکوس اورئوس*، ۲. *اشرشیا کلی*، ۳. *کلبسیلا*، ۴. *باسیلوس سرئوس*، ۵. بدون آنتی‌ژن، ۶. بدون آنتی‌بادی

بر ا ساس یافته‌های روش انت شار دی سک در ح ضور دی سک اگزاسیلین، ۶۰ درصد از سویه‌های مطالعه‌شده به متی‌سیلین مقاوم بودند. بر ا ساس برنامه CLSI، ر شد در ح ضور غلظت ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر از آنتی‌بیوتیک اگزاسیلین به روش آگار دایلوشن به عنوان مقاومت به متی‌سیلین در نظر گرفته می‌شود. از این‌رو، با روش آگار دایلو شن نیز ۵۸/۵ در صد از سویه‌های مطالعه شده به متی سیلین مقاوم تشخیص داده شدند. همچنین در روش PCR – ELISA ۶۰ درصد از سویه‌ها واجد ژن مقاومت بودند (شکل ۶). تفاوت جزئی که بین سه روش وجود داشت نیز از لحاظ آماری معنی‌دار نبود.



شکل ۶. تعیین مقاومت به متی‌سیلین در جدایه‌های بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس*

بحث و نتیجه‌گیری

امروزه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به عنوان عامل مهم بیماری‌زا در بیمار ستان شناخته می شود. در ۵۰ سال گذ شته این باکتری تغییرات ژنتیکی زیادی را متحمل شده است. از آنجایی که این باکتری ژنوم انعطاف‌پذیری دارد، سویه‌های بیماری‌زا و مقاوم به داروی آن گسترش یافته است. در سال‌های اخیر نقش مهم *استافیلوکوکوس اورئوس* در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی و نیز جامعه منجر به افزایش تحقیقات بسیاری بر روی این باکتری شده است (۱۴). از جمله روش‌های تشخیص این باکتری می‌توان به روش‌های سنتی بر مبنای کشت باکتری، روش ردیابی بر پایه تکثیر اسید نوکلئیک، روش‌های ایمنی اگلوتیناسیون، و لاتکس اشاره کرد که هر کدام مزایا و معایبی دارند. روش PCR با وجود متداول‌بودن، معایبی نیز دارد؛ از جمله ا ستفاده از ژل الکتروفورز و رنگ‌آمیزی با مواد سمی همچون اتیدیوم بروماید برای آشکارسازی محصولات تکثیرشده. همچنین همهٔ این روش‌ها معایب خاص خود را دارند؛ از قبیل صرف زمان و محدودیت در تعداد نمونه‌های تشخیص. ایمونواسی‌ها بر اساس آنتی‌بادی برای تشخیص باکتری‌ها به‌خوبی جاافتاده‌اند و سال‌هاست که استفاده می‌شوند. یکی از مهم ترین عوامل شنا سایی یک هدف، ا ستفاده از مولکول شنا ساگری با اختصاصیت و تمایل زیاد است. یکی از رایج‌ترین این عوامل، آنتی‌بادی‌ها ه ستند که در ب سیاری از روش‌های ت شخیص ایمنی و زیست حسگرها استفاده می‌شوند (۱۱).

در این تحقیق روش PCR-ELISA برای شناسایی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین به کار گرفته شده است. PCR-ELISA بسیاری از معایب و محدودیت‌های موجود در

روش‌های دیگر، از جمله PCR را بر طرف کرده ا ست، زیرا سرعت و اختصاصیت قابل قبولی را در تشخیص مقادیر اندک توالی‌های اخت صا صی ژن بیماری فراهم می‌آورد؛ به طوری که حد ت شخیص آن ۰/۰۱ ng/µl اســـت. این میزان در روش PCR معمولی ۱۰-۱ ng/µl اســـت. همچنین برخلاف نتایج کیفی حاصـــل از PCR، یافته‌های روش PCR-ELISA به صـــورت نیمه‌کمّی اســت. اگرچه نتایج حاصـــل از روش qPCR به صـــورت کمّی و با حد تشـــخیص کمتر (۰/۲۵ pg/µl) است، اما نیاز به دستگاه مجهز به فلورسانس و هزینه زیاد از معایب آن محسوب می‌شود.

از ویژگی‌های بارز روش PCR-ELISA تشـــخیصـــی امکان آنالیز هم‌زمان تعداد زیادی نمونه با اســتفاده از میکروپلیت‌های ۹۶ خانه اســت. نیازنداشــتن به دســتگاه ژل داکت، اتاق تاریک ، امکان آلودگی کم نسبت به روش‌های لکه‌گذاری ساترن و ا ستفاده‌نکردن از مواد گران‌قیمت که در روش Real-time PCR به کار می‌رود، از دیگر محاسـن این روش محسـوب می‌شـود. در این روش ریسـک آلودگی کارکنان آزمایشگاه بسیار کم است. همچنین خطر استفاده از اتیدیوم بروماید که در روش PCR برای رنگ‌آمیزی به کار می رود، وجود ندارد.

در تحقیقاتی که در زمینهٔ باکتری‌هایی خانواده *استافیلوکوک* به روش PCR-ELISA صورت گرفته ا ست، تاکنون گزار شی مبنی بر تشـــخیص مقاومت آنتی‌بیوتیکی *اســـتافیلوکوکوس اورئوس* به روش PCR-ELISA ارائه نشـــده اســـت و به نظر می‌رســـد چنین پژوهشی برای اولین بار انجام می شود. Zhang و همکاران (۲۰۰۵) از روش Multiplex PCR برای تشخیص *استافیلوکوکوس* مقاوم به پنی‌ســـیلین اســـتفاده کرد ند (۱۵). Wolk و همکاران (۲۰۰۹) تر کیبی از روش‌هـای PCR و ESI-MS را برای تشـــخیص *اســـتافیلوکوکوس اورئوس* به کار بردند (۱۶). همچنین Graveland و همکاران (۲۰۱۰) (۱۷) و Ružauskas و همکاران (۲۰۱۴) (۱۸) آزمای شاتی روی نمونه‌های گو ساله با روش PCR برای شنا سایی این باکتری انجام دادند. روش PCR ا ستفاده شده تو سط محققان اگر چه روشـــی ارزان اســـت و می‌تواند به‌آســـانی در برخی از آزمایشـــگاه‌های تشـــخیص طبی مورد اســـتفاده قرار گیرد، ولی کمّی‌نبودن نتایج و نیز پایین‌بودن نسـبی میزان حسـاسـیت آن در مقایسه با سایر روش‌های مولکولی از معایب آن محسوب می‌شود.

در این تحقیق از ژن کدکنندهٔ *mecA* به عنوان ژن شـــاخص برای شناسایی سویه‌های بیماری‌زای *استافیلوکوکوس اورئوس* واجد مقاومت به آنتی‌بیوتیک متی‌سیلین استفاده شد. استفاده از این ژن به عنوان هدف می‌تواند نشـــان‌دهندهٔ بروز مقاومت آنتی‌بیوتکی در جدایه‌ها باشـد و به پزشـک در انتخاب آنتی‌بیوتیک مناسـب برای درمان بیمار کمک کند. درصد فراوانی جدایه‌های دارای مقاومت به متی سیلین را با روش‌هایی از قبیل انتشار دیسک ارزیابی می‌کنند. نتایج تحقیقات ن شان داده ا ست ا ستفاده از روش‌های مولکولی در مقای سه با روش‌های آنتی‌بیوگرام می‌تواند سبب بهبود ح سا سیت تشـخیص سـویه‌های مقاوم شـود. در تحقیق حاضـر نیز تفاوتی در تعداد نمونه‌های مقاوم به متی سیلین با روش PCR-ELISA و آگار دایلو شن م شاهد شد؛ هرچند این تفاوت از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. Najar (۲۰۰۹) نیز در تحقیقی نشـــان داد فراوانی ایزوله‌های مقاوم به متی‌ســـیلین در جدایه‌های بالینی به روش PCR و آگار دایلوشن بیشتر از روش انتشار دیسک است. هرچند این تفاوت نیز در تحقیق آن‌ها از لحاظ آماری معنی‌دار نبود (۱۹).

همان‌طور که اشاره شد روش PCR-ELISA منجر به افزایش میزان ح سا سیت ت شخیص می شود. میزان ح سا سیت روش این تحقیق به گونه‌ای بود که امکان تأیید حضـــور ۰/۵ نانوگرم از ژنوم باکتری در نمونه را میسر ساخت. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد حسـاسـیت روش تشـخیص PCR-ELISA برای شـناسـایی *اســـتافیلوکوکوس اورئوس* در مقایســـه با نتایج ارائه‌شـده مبتنی بر روش PCR، ۱۰۰ برابر بی شتر ا ست. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت اســـتفاده از PCR-ELISA می‌تواند ســـبب بهبود قابل توجهی در ح سا سیت ت شخیص سویه‌های واجد مقاومت آنتی‌بیوتیکی شود. نتایج ح سا سیت تحقیق حا ضر با نتایج تحقیق Gilligan (۲۰۰۰) همخوانی داشـت. Gilligan نشـان داد حسـاسـیت روش PCR-ELISA برای شنا سایی ایزوله‌های *ا ستافیلوکوکوس اورئوس* واجد ژن کدکننده انتروتوک سین B ۱۰۰ در صد ا ست (۲۰). با این حال حساسیت روش تشخیص PCR-ELISA ارائه‌شده در تحقیق حاضر ۱۰ برابر کمتر از ح سا سیت تعریف شده در تحقیق Gilligan بود. میزان اختصاصیت روش در هر دو تحقیق مشابه بود و تأییدکننده دقت روش تشخیصی PCR-ELISA است.

ویژگی و اختصاصیت این روش در تشخیص باکتری‌های نیز برر سی شد. همان‌گونه که نتایج حا صل از برر سی‌ها در بانک ژنی نشـــان داد پرایمرهـا و پروب در این تحقیق برای بـاکتری *اســـتافیلوکوکوس اورئوس* اختصـاصـی اسـت. برای اثبات اینکه در عمل نیز چنین ا ست، DNA ژنومی باکتری‌های *کلبسیلا پنومونیه*، باکتری *ا شریشیاکلی* و *با سیلوس سوبتلیس* با روش PCR-ELISA بررسی و نتایج منفی حاصل شد.

در مقایســـه با ســـایر روش‌های تشـــخیصـــی متداول برای تشخیص جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین،

روش این تحقیق حساسیت بیشتری دارد و می‌تواند تعداد نسخه‌های اندکی از ژن باکتری را تشخیص دهد. استفاده از ژن *mecA* و طراحی پرایمرهای اختصاصی سبب بالا رفتن ویژگی تشخیصی این روش شد؛ به طوری که گونه‌های دیگر در تحقیق با پرایمرها واکنش ندادند. همچنین استفاده از پروب اختصاصیت روش طراحی شده را به میزان زیادی بالا برد. به نظر می‌رسد روش PCR-ELISA برای تشخیص ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین روش مناسب و قابل اعتمادی باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان از تمامی کسانی که در انجام این تحقیق آنها را یاری کردند کمال تشکر و قدردانی را به عمل می‌آورند.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. Nazari MR, Sekawi Z, Sadeghifard N, Raftari M, Ghafourian S. Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus: A Systematic Review. Rev Med Microbiol. 2015; 26(1):1-7.
2. Laupland KB, Lyytikäinen O, Søgaard M, Kennedy KJ, Knudsen JD, Ostergaard C, et al .The Changing Epidemiology of Staphylococcus Aureus Bloodstream Infection: A Multinational Population-Based Surveillance Study. Clin Microbiol Infect. 2013; 19:465-471.
3. Tong SY, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG Jr. Staphylococcus Aureus Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. Clin Microbiol Rev. 2015; 28:603-661.
4. Chen CJ, Huang YC. New Epidemiology of Staphylococcus Aureus Infection in Asia. Clin Microbiol Infect. 2014; 20(7):605-623.
5. Hiramatsu K, Ito T ,Tsubakishita S, Sasaki T, Takeuchi F, Morimoto Y, et al. Genomic Basis for Methicillin Resistance in Staphylococcus Aureus. Infect Chemother. 2013; 45:117-136.
6. Purrello SM, Garau J, Giamarellos E, Mazzei T, Pea F, Soriano A, et al. Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus Infections: A Review of the Currently Available Treatment Options. J Glob Antimicrob Resist. 2016; 7:178-186.
7. Tan TY, Corden S, Barnes R, Cookson B. Rapid Identification of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus from Positive Blood Cultures by Real-Time Fluorescence PCR. J Clin Microbiol. 2001; 39(12):4529-4531.
8. Martineau F, Picard FJ, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG. Species-Specific and Ubiquitous-DNA-Based Assays for Rapid Identification of Staphylococcus Aureus. J Clin Microbiol. 1998; 36: 618-623.
9. Chapin K , Musgnug M. Evaluation of Three Rapid Methods for the Direct Identification of Staphylococcus Aureus From Positive Blood Cultures. J Clin Microbiol. 2003; 41: 4324-4327.
10. Hamula CL, Zhang H, Li F, Wang Z, Le XC, Li XF. Selection and Analytical Applications of Aptamers Binding Microbial Pathogens. Trends Analyt Chem. 2011; 30: 1587-1597.
11. Lee JO, So HM, Jeon EK, Chang H, Won K, Kim YH. Aptamers as Molecular Recognition Elements for Electrical Nanobiosensors. Anal Bioanal Chem. 2008; 390: 1023-1032.
12. Sue MJ, Yeap SK, Omar AR, Tan SW. Application of PCR-ELISA in Molecular Diagnosis. BioMed Res Int. 2014; 2014.
13. Havaei SA, Halaji M, Vidovic S, Dillon Jo-AR, Karbalaei M, Ghanbari F, et al. Prevalence and Genotyping of Methicillin-Resistant and-Susceptible Staphylococcus Aureus Strains Isolated From Patients in a University Hospital, Isfahan, Iran. Jundishapur J Microbiol. 2017; 10: e13571.
14. Hamdan-Partida A, Sainz-Espuñes T, Bustos-MartínezJ. Characterization and Persistence of Staphylococcus Aureus Strains Isolated From the Anterior Nares and Throats of Healthy Carriers in a Mexican Community. J Clin Microbiol. 2010; 48: 1701-1705.
15. Zhang K, McClure JA, Elsayed S, LouieT, Conly JM. Novel Multiplex PCR Assay for Characterization and Concomitant Subtyping of Staphylococcal Cassette Chromosome Mec Types I to V in Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus. J Clin Microbiol. 2005; 43: 5026-33.
16. Wolk DM, Blyn LB, Hall TA, Sampath R, Ranken R, Ivy C,et al. Pathogen Profiling: Rapid Molecular Characterization of Staphylococcus Aureus by PCR/Electrospray Ionization-Mass Spectrometry and Correlation With Phenotype. J Clin Microbiol. 2009; 4737-3129.
17. Graveland H, Wagenaar JA, Heesterbeek H, Mevius D, Van Duijkeren E, Heederik D. Methicillin Resistant Staphylococcus Aureus ST398 in Veal Calf Farming: Human MRSA Carriage Related With Animal

Antimicrobial Usage and Farm Hygiene. PLoS One. 2010; 5(6): e10990.

18. Ružauskas M, Couto N, Šiugždinienė R, Belas A, Klimienė I, Virgailis M, et al. Occurrence and Characterization of Livestock-Associated Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus. Veterinarija ir Zootechnika. 2014; 66.

19. Najar PS, Azimian A, Mostafaei M, Siadat SD. Identification of Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus by Disk Diffusion Method, Determination of MIC and PCR for MecA Gene. Pathobiol Res. 2009; 12:61-69.

20. Gilligan K, Shipley M, Stiles B, Hadfield TL, Ibrahim MS. Identification of Staphylococcus Aureus Enterotoxins A and B Genes by PCR-ELISA. Mol Cell Probes. 2000; 14:71-78.

.