



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

Susan Rezavand¹, Jafar Amani^{2*}, Neda Akbari¹, Hamid Reza Mohajerani¹,
Shahram Nazarian³, Hamideh Mahmoodzadeh Hosseini², Mehrdad Moosazadeh Moghaddam⁴

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 streptavidin 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, *mecA* 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



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، دانشکده علوم زایه، 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، دانشکده علوم پایه، دانشگاه امام حسین (ع)، تهران، ایران
۴. مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

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 سویه‌های MRSA 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 نشان‌دار شده به همراه دیگوکسی ژنین برای تکثیر ژن *mecA* استفاده شد. محصولات نشان‌دار شده به کف چاهک‌های واجد استراتیویدین متصل و با آنتی‌بادی کانژوگه ضد نشان DIG شناسایی شد. همچنین از پروب DNA اختصاصی نشان‌دار شده 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 دایلووشن 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 متقاطع با باکتری‌های کلسیلا 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 دایلووشن 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 میکروبی شناسی پزشکی ایران: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده غیرتجاری با ذکر منبع آزاد است.

تاریخچه مقاله
دریافت: ۱۳۹۶/۰۹/۲۸
پذیرش: ۱۳۹۸/۰۴/۰۱
انتشار آنلاین: ۱۳۹۸/۰۴/۱۰
موضوع:
میکروبی شناسی مولکولی
IJMM1398;13(1): 22-31
نویسنده 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

مقدمه

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 گسترده این باکتری، روش‌های مؤثر برای شناسایی آن به گونه‌ای که در عین سریع بودن، حساسیت و اختصاصیت بالایی

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

مواد و روش‌ها

سویه‌های باکتریایی و محیط‌های کشت

برای این منظور سویه استاندارد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC 33592) 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 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 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 و شوی 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 T_m ، ΔG ، تشکیل لوپ و پرایمر دایمر بررسی شدند (جدول ۱).

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 ۳-۴ 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 به صرفه 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 نشان‌دار شده 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 دیگوکسی ژنین محصولات PCR نشان‌دار شده، ژن *mecA* در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* تشخیص داده شود.

جدول ۱. پرایمرها و پروب طراحی شده از ژن *mecA*

پرایمر / پروب	توالی نوکلئوتید	تعداد نوکلئوتید
<i>mecF</i>	GAAATGACTGAACGTCCGATA	۲۱ باز
<i>mecR</i>	CCAATTCACATTGTTTCGGTCTAA	۲۵ باز
<i>mecP</i>	Biotin-AACATTGATCGCAACGTTCA	۲۰ باز

با دیگوکسی ژنین با ۹۰ 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 ۰/۵ درصد توپین) 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. هم‌زمان با این مرحله ۲۰ میکرولیتر محصول PCR نشان‌دار شده 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 آن بیوتینیل 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 سترات 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* نشان‌دار شده

پس از تعیین غلظت محصول PCR ژن *mecA* نشان‌دار شده، 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 و ۱۰ ماکرولیتر از آن به هر یک از چاهک‌ها اضافه شد و سایر مراحل آشکارسازی انجام و با دستگاه خواننده الایزا (ELISA reader) اندازه‌گیری شد.

پس از مطمئن شدن از مطلوب بودن 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 (شرکت سیناکلون، ایران)، ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰X PCR، غلظت ۳ میلی‌مولار ۲MgCl و غلظت‌های متفاوت از DNA ژنومی بود. برنامه دمایی PCR شامل واسرشتگی اولیه (Denaturation) در ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه، واسرشتگی در ۹۵ درجه به مدت ۱ دقیقه، اتصال (Annealing) در ۵۹ 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 تکثیر یافته 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 نشان‌دار شده با بیوتین به شرکت سینا کلون سفارش داده شد.

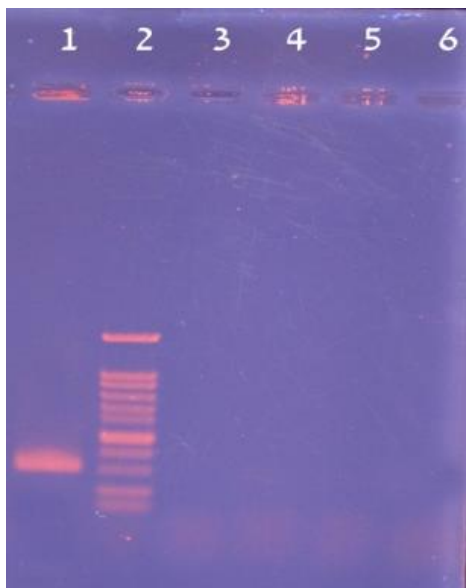
نشان‌دار کردن محصول PCR ژنومی به وسیله DIG-dUTP

برای نشان‌دار کردن 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 پلیمرز به جای dTTP از DIG-dUTP در مقابل باز آدنین استفاده می‌کند. نسبت DIG-dUTP: dTTP استفاده شده ۱:۳ بود. علاوه بر نمونه اصلی، یک لوله به عنوان نمونه 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 μ l تهیه و سیکل‌های حرارتی مانند قبل در نظر گرفته شد.

PCR-ELISA

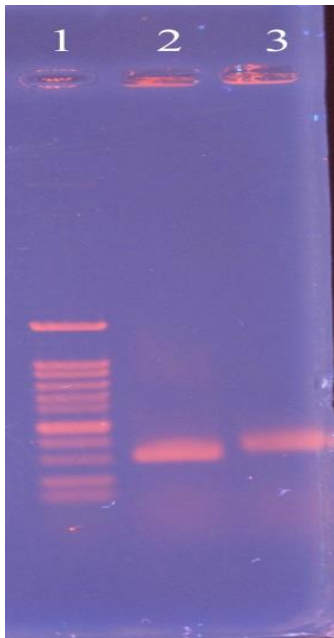
برای این منظور ۵ میکرولیتر استرپتواویدین با ۹۵ میکرولیتر بافر پوششی در چاهک A، ۱۰ میکرولیتر محصول PCR نشان‌دار شده

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



شکل ۲. نشان‌دار کردن محصول PCR با DIG-dUTP

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

تعیین میزان اختصاصیت روش PCR-ELISA

برای بررسی اختصاصیت پرایمرهای طراحی‌شده، از باکتری‌های *کلیدسیلا*، *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 بازه زمانی اردیبهشت تا شهریور ماه ۱۳۹۵ جمع‌آوری 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 دایلویشن 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 ۱۰^۴ 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* ATCC ۳۳۵۹۲ به عنوان کنترل مثبت استفاده شد (۱۳).

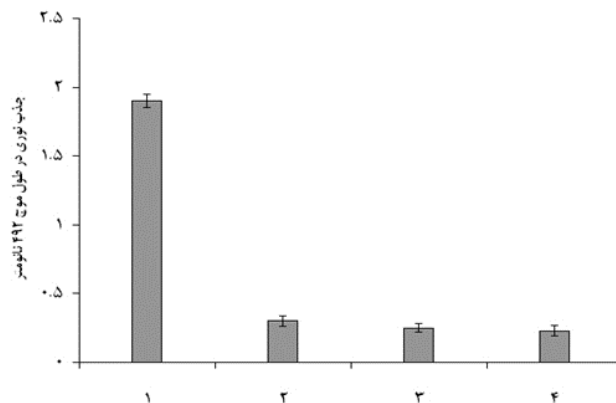
یافته‌ها

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

بیشتر از محصول PCR تکثیر شده با dNTPs عادی است. علت این امر وجود دیگوکسی ژنین در محصول PCR نشان‌دار شده است که باعث سنگین شدن قطعه مورد نظر شده است. این امر دلیلی بر انجام واکنش PCR در حضور DIG-dUTP است.

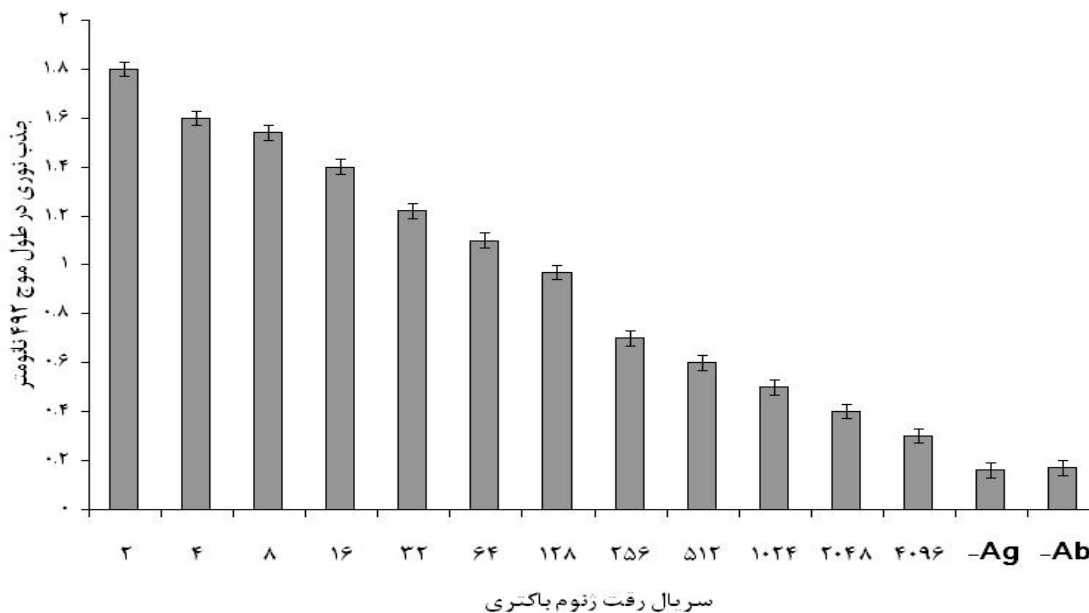
پس از نشان‌دار کردن محصولات PCR، آزمایش الیزا انجام گرفت و جذب نوری در طول موج ۴۹۲ نانومتر با دستگاه ELISA Reader خوانده شد. همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود میزان OD ثبت‌شده محصول PCR نشان‌دار شده ژن برابر ۱/۹ است که این میزان OD در حد قابل قبولی است.

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 الیزا آشکارسازی صورت گرفت (شکل ۴). نتایج به‌دست‌آمده نشان دهنده معنادار و قابل قبول بودن جواب‌ها در $OD=0/4$ برابر با رقت $1/2048$ (غلظت $0/505$ نانوگرم بر میکرولیتر) است.



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

در ادامه به منظور نشان‌دار کردن محصول PCR از DIG-dUTP استفاده شد. همان‌طور که در شکل ۲ دیده می‌شود محصول PCR تکثیر شده با دیگوکسی ژنین نیز تک‌باند است و تا حدودی

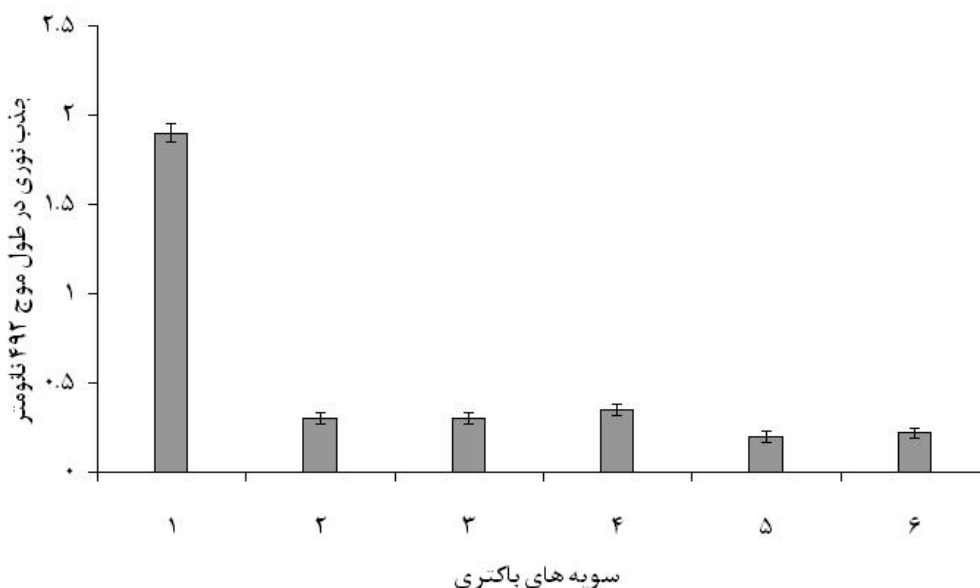


شکل ۴. تعیین حساسیت PCR-ELISA با سریال رقت ژنوم باکتری

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

PCR-ELISA مطابق اطلاعات ارائه شده در شکل ۵ ارزیابی و ثبت شد. جذب نوری نمونه مربوط به /ستافیلوکوکوس اورئوس/ بیش از حد مقادیر کنترل‌های واکنش بود، در حالی که جذب نوری برای باکتری‌های دیگر کمتر از کنترل واکنش بود.

اختصاصیت روش تشخیصی نیز با به‌کارگیری سایر باکتری‌ها ارزیابی شد. نتایج حاصل نشان‌دهنده اختصاصی بودن پرایمرهای طراحی‌شده بود؛ به طوری که برای سایر باکتری‌ها هیچ بانندی بر روی ژل آگارز مشاهده نشد. سپس نتایج به‌دست‌آمده با روش

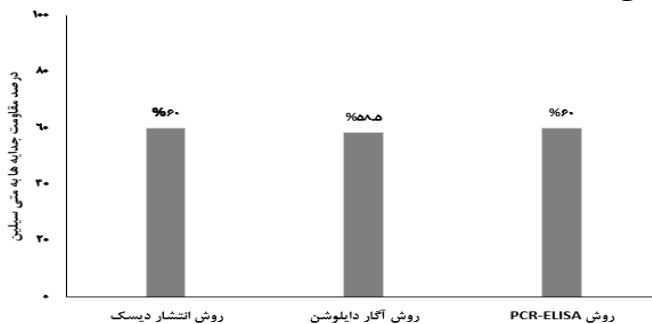


شکل ۵. تعیین اختصاصیت PCR-ELISA با استفاده از سایر باکتری‌ها
 ۱. استافیلوکوکوس اورئوس، ۲. اشرشیا کلی، ۳. کلبسیلا، ۴. باسیلوس سرئوس، ۵. بدون آنتی‌ژن، ۶. بدون آنتی‌بادی

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 متداول بودن، معایبی نیز دارد؛ از جمله استفاده از ژل الکتروفورز و رنگ‌آمیزی با مواد سمی همچون اتیدیوم بروماید برای آشکارسازی محصولات تکثیرشده. همچنین همه این روش‌ها معایب خاص خود را دارند؛ از قبیل صرف زمان و محدودیت در تعداد نمونه‌های تشخیص. ایمونواسی‌ها بر اساس آنتی‌بادی برای تشخیص باکتری‌ها به خوبی جاافتاده‌اند و سال‌هاست که استفاده می‌شوند. یکی از مهم‌ترین عوامل شناسایی یک هدف، استفاده از مولکول شنا ساگری با اختصاصیت و تمایل زیاد است. یکی از رایج‌ترین این عوامل، آنتی‌بادی‌ها هستند که در بسیاری از روش‌های تشخیص 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

بر اساس یافته‌های روش انتشار دیسک در حضور دیسک اگزاسیلین، ۶۰ درصد از سویه‌های مطالعه‌شده به متی‌سیلین مقاوم بودند. بر اساس برنامه CLSI، رشد در حضور غلظت ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر از آنتی‌بیوتیک اگزاسیلین به روش آگار دایلویشن به عنوان مقاومت به متی‌سیلین در نظر گرفته می‌شود. از این‌رو، با روش آگار دایلویشن نیز ۵۸/۵ درصد از سویه‌های مطالعه شده به متی‌سیلین 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 بیمارستان شناخته می‌شود. در ۵۰ سال گذشته این

جدایه‌ها باشد و به پزشک در انتخاب آنتی‌بیوتیک مناسب برای درمان بیمار کمک کند. درصد فراوانی جدایه‌های دارای مقاومت به متی‌سیلین را با روش‌هایی از قبیل انتشار دیسک ارزیابی می‌کنند. نتایج تحقیقات نشان داده است استفاده از روش‌های مولکولی در مقایسه با روش‌های آنتی‌بیوگرام می‌تواند سبب بهبود حساسیت تشخیص سویه‌های مقاوم شود. در تحقیق حاضر نیز تفاوتی در تعداد نمونه‌های مقاوم به متی‌سیلین با روش PCR-ELISA و آگار دایلو شدن مشاهده شد؛ هرچند این تفاوت از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. Najjar (۲۰۰۹) نیز در تحقیقی نشان داد فراوانی ایزوله‌های مقاوم به متی‌سیلین در جدایه‌های بالینی به روش PCR و آگار دایلو شدن 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 حساسیت تشخیص می‌شود. میزان حساسیت روش این تحقیق به گونه‌ای بود که امکان تأیید حضور ۰/۵ نانوگرم از ژنوم باکتری در نمونه را میسر ساخت. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد حساسیت روش تشخیص PCR-ELISA برای شناسایی *استافیلوکوکوس اورئوس* در مقایسه با نتایج ارائه‌شده مبتنی بر روش PCR، ۱۰۰ برابر بیشتر است. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت استفاده از PCR-ELISA می‌تواند سبب بهبود قابل توجهی در حساسیت تشخیص سویه‌های واجد مقاومت آنتی‌بیوتیکی شود. نتایج حساسیت تحقیق حاضر با نتایج تحقیق Gilligan (۲۰۰۰) همخوانی داشت. Gilligan نشان داد حساسیت روش PCR-ELISA برای شناسایی ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* واجد ژن کدکننده *antrotok* سین B ۱۰۰ درصد است (۲۰). با این حال حساسیت روش تشخیص PCR-ELISA ارائه‌شده در تحقیق حاضر ۱۰ برابر کمتر از حساسیت 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 بررسی شد. همان‌گونه که نتایج حاصل از بررسی‌ها در بانک ژنی نشان داد پرایمرها و پروب در این تحقیق برای باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* اختصاصی است. برای اثبات اینکه در عمل نیز چنین است، DNA ژنومی باکتری‌های *کلبسیلا پنومونیه*، باکتری *شریشیاکلی* و *باسیلوس سوبتیلیس* با روش PCR-ELISA بررسی و نتایج منفی حاصل شد.

در مقایسه با سایر روش‌های تشخیصی متداول برای تشخیص جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین،

روش‌های دیگر، از جمله PCR را بر طرف کرده است، زیرا سرعت و اختصاصیت قابل قبولی را در تشخیص مقادیر اندک توالی‌های اختصاصی ژن بیماری فراهم می‌آورد؛ به طوری که حد تشخیص آن ۰/۱ ng/μl است. این میزان در روش PCR معمولی ۱۰-۱ ng/μl است. همچنین برخلاف نتایج کیفی حاصل از PCR، یافته‌های روش PCR-ELISA به صورت نیمه‌کمی است. اگرچه نتایج حاصل از روش qPCR به صورت کمی و با حد تشخیص 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 تشخیصی امکان آنالیز هم‌زمان تعداد زیادی نمونه با استفاده از میکروپلیت‌های ۹۶ خانه است. نیاز نداشتن به دستگاه ژل داکت، اتاق تاریک، امکان آلودگی کم نسبت به روش‌های لکه‌گذاری ساترن و استفاده نکردن از مواد گران‌قیمت که در روش PCR Real-time به کار می‌رود، از دیگر محاسن این روش محسوب می‌شود. در این روش ریسک آلودگی کارکنان آزمایشگاه بسیار کم است. همچنین خطر استفاده از اتیدیوم بروماید که در روش PCR برای رنگ‌آمیزی به کار می‌رود، وجود ندارد.

در تحقیقاتی که در زمینه باکتری‌هایی خانواده *استافیلوکوک* به روش PCR-ELISA صورت گرفته است، تاکنون گزارشی مبنی بر تشخیص مقاومت آنتی‌بیوتیکی *استافیلوکوکوس اورئوس* به روش PCR-ELISA ارائه نشده است و به نظر می‌رسد چنین پژوهشی برای اولین بار انجام می‌شود. Zhang و همکاران (۲۰۰۵) از روش Multiplex PCR برای تشخیص *استافیلوکوکوس مقاوم* به پنی‌سیلین استفاده کردند (۱۵). Wolk و همکاران (۲۰۰۹) ترکیبی از روش‌های PCR و ESI-MS را برای تشخیص *استافیلوکوکوس اورئوس* به کار بردند (۱۶). همچنین Graveland و همکاران (۲۰۱۰) (۱۷) و Ružauskas و همکاران (۲۰۱۴) (۱۸) آزمایشاتی روی نمونه‌های گوساله با روش PCR برای شناسایی این باکتری انجام دادند. روش PCR استفاده شده توسط محققان اگرچه روشی ارزان است و می‌تواند به‌آسانی در برخی از آزمایشگاه‌های تشخیص طبی مورد استفاده قرار گیرد، ولی کمی‌بودن نتایج و نیز پایین‌بودن نسبی میزان حساسیت آن در مقایسه با سایر روش‌های مولکولی از معایب آن محسوب می‌شود.

در این تحقیق از ژن کدکننده *mecA* به عنوان ژن شاخص برای شناسایی سویه‌های بیماری‌زای *استافیلوکوکوس اورئوس* واجد مقاومت به آنتی‌بیوتیک متی‌سیلین استفاده شد. استفاده از این ژن به عنوان هدف می‌تواند نشان‌دهنده بروز مقاومت آنتی‌بیوتیکی در

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.

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.

References

- 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.
- Laupland KB, Lyytikäinen O, Søgaaard 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.
- 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.
- Chen CJ, Huang YC. New Epidemiology of Staphylococcus Aureus Infection in Asia. *Clin Microbiol Infect*. 2014; 20(7):605-623.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Sue MJ, Yeap SK, Omar AR, Tan SW. Application of PCR-ELISA in Molecular Diagnosis. *BioMed Res Int*. 2014; 2014.
- 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.
- Hamdan-Partida A, Sainz-Espuñes T, Bustos-Martínez J. 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.
- Zhang K, McClure JA, Elsayed S, Louie T, 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.
- 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; 47:37-3129.
- 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, Šiugždiniene 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.