مقاله پژوهشی

مقایسه روش PCR مستقیم و PCR با استفاده از DNA استخراج‌شده با کیت در تعیین ژن‌های tst و mecA در باکتری استافیلوکوک اورئوس

نویسندگان:

حامد طهماسبی [1*]، محمد بکائیان [1و2]، مژده جهانتیغ [1]، جواد ادبی [1]

۱- گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران

۲- مرکز بیماری‌های عفونی-گرمسیری زاهدان، زاهدان، ایران

Pars Journal of Medical Sciences, Vol. 14, No.3, Fall 2016

چکیده:

مقدمه: انجام واکنش PCR یکی از دقیق‌ترین و حساس‌ترین آزمایش‌ها برای سنجش‌های مولکولی است. استخراج DNA همیشه از وقت‌گیرترین مراحل قبل از PCR بوده که با حذف آن می‌توان در زمان و هزینه صرفه‌جویی قابل‌توجهی کرد. هدف از این مطالعه، مقایسه دو روش PCR مستقیم و PCR با استخراج DNA الگو در شناسایی ژن‌های tst و femA و mecA بود.

روش کار: در این بررسی ایزوله‌های بالینی استافیلوکوک اورئوس که با آزمایش‌های بیوشیمیایی تأییدشده بودند، با روش PCR مستقیم از کلنی‌های استافیلوکوک اورئوس کشت داده‌شده روی محیط مولرهینتون آگار (Muller Hinton agar) و روش PCR با DNA استخراج‌شده با کیت استخراج برای ژن‌های tst و mecA مورد ارزیابی قرار گرفتند. در این آزمایش برای ژن‌های موردنظر از سه پرایمر اختصاصی استفاده و تعیین توالی همه نمونه‌ها به‌عنوان استاندارد طلایی در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: تکثیر ژن‌های tst و mecA به طول ۳۲۶ bp و ۱۶۳bp از طریق روش PCR مستقیم و روش PCR با DNA استخراج‌شده با موفقیت انجام شد که مربوط به توکسین و مقاومت به متی سیلین بود. در هر دو روش، همه نمونه‌ها از نظر حضور ژن femA مثبت شدند. در PCR مستقیم، میزان حضور ژن‌های mecA و tst به ترتیب در ۶۸ ایزوله (۷۸/۱۷٪) و ۹ ایزوله (۱۱/۵۳٪) مثبت گزارش شد. در PCR با استفاده از DNA استخراج‌شده با کیت نیز میزان حضور ژن‌های mecA و tst به ترتیب در ۶۹ ایزوله (۸۸/۴۶٪) و ۱۲ ایزوله (۱۵/۳۸٪) مثبت شدند.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج به‌دست‌آمده، برای صرفه‌جویی در وقت و هزینه در تشخیص استافیلوکوک اورئوس می‌توان از روش PCR مستقیم استفاده کرد.

واژگان کلیدی: استافیلوکوک اورئوس، مقاومت به متی سیلین، PCR مستقیم، ژن tst، ژن mecA

Pars J Med Sci 2016;14 (3):43-51

مقدمه:

واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (PCR) یکی از حساس‌ترین و دقیق‌ترین آزمایش‌های مولکولی است که می‌تواند برای ردیابی ژن‌های مختلف در نواحی خاصی از مولکول DNA مورداستفاده قرار گیرد [۱, ۲]. در آوریل سال ۱۹۸۳ کری مولیس ایده استفاده از واکنش زنجیره ایی پلی مراز برای تکثیر DNA را در ذهن پروراند و سرانجام در سال ۱۹۹۳ برای معرفی این روش موفق به دریافت جایزه نوبل شد [۳]. PCR واکنشی است که توسط آن می‌توان به‌طور مصنوعی مولکول DNA را به‌صورت تک رشته تکثیر کرد [۴]. سازوکار این واکنش بدین‌صورت است که در ابتدا رشته‌های DNA الگو توسط حرارت در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد از هم جدا می‌شوند و بعد از آن بااتصال قطعات خاصی به نام پرایمر در دمایی خاص، طویل سازی و در نهایت همانندسازی از روی یکی از رشته‌های موردنظر انجام می‌شود [۵]. در PCR مراحل سه‌گانه شامل جداسازی، اتصال و طویل سازی است که دما و مدت‌زمان هر مرحله و تعداد سیکل‌های تکرارشونده با هم متفاوت است [۵]. آنزیم مورداستفاده برای همانندسازی DNA

* نویسنده مسئول، نشانی: دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، دانشکده پزشکی، گروه میکروب‌شناسی

تلفن تماس: ۰۹۱۸۳۱۹۵۶۴۵ پست الکترونیک: h.tahmasebi87@yahoo.com

دریافت: ۱۳۹۵/۲/۱۳ اصلاح: ۱۳۹۵/۶/۲۴ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۲/۱۶

پلی مراز بوده و برای این‌که توان آنزیم DNA پلی مراز در دماهای مختلف حفظشده و عمل همانندسازی به‌خوبی پیش رود، از باکتری ترموفیلوس آکواتیکوس جداشده از چشمه‌های آب گرم استفاده می‌شود [۶]. از این باکتری در سال ۱۹۸۹ توسط جلفاند و همکاران برای ساخت Taq پلی مراز استفاده شد و در سال ۱۹۹۰ توسط مولیس و همکاران در PCR مورداستفاده قرار گرفت [۶]. سازوکار انجام PCR در ابتدا به این صورت بود که برای القای دماهای موردنظر در مراحل مختلف جداسازی، اتصال و طویل سازی از ظروف آب گرم بن ماری برای مدت‌زمانی معین استفاده می‌شد که این امر علاوه بر زمان‌بر بودن، با خطای بسیاری نیز همراه بود [۷]. این شیوه قدیمی با پیشرفت علم، جای خود را به دستگاه‌های جدید PCR داد تا علاوه برداشتن صرفه اقتصادی، از سرعت و دقت بالایی نیز برخوردار باشد [۸]. بدین ترتیب، علاوه بر شناسایی باکتری‌ها امکان ردیابی مولکولی ژن‌های کد کننده عوامل مختلفی نیز میسر شد [۹]. ژن عامل مقاومت به متی سیلین (mecA) و ژن عامل توکسین سندروم شوک توکسین (tst) از جمله ژن‌هایی هستند که در باکتری استافیلوکوک اورئوس با روش PCR به‌راحتی قابل تشخیص است [۱۰]. سازوکار اصلی مقاومت به متی سیلین در استافیلوکوک اورئوس وابسته به تولید پروتئینی به نام PBP2 است که میل ترکیبی کمی با بتا لاکتام ها داشته و سبب مقاومت به بتا لاکتام ها می‌شود. ژن mecA منجر به کد شدن این پروتئین و در نهایت منجر به بروز استافیلوکوک اورئوس های مقاوم به متی سیلین می‌شود [۱۱]. ژن mecA روی یک المنت ژنتیکی سیار قرار دارد که به آن کاست کروموزومی mec استافیلوکوکی می‌گویند [۱۱]. از آن جایی که بخش عمده ایی از کارکنان شاغل در بیمارستان‌ها حامل این باکتری در پوست و قسمت بینی خود هستند، می‌توانند آن را به‌راحتی به سایرین منتقل کرده و سبب گردش سویه‌های خطرساز مولد TSST-1 شوند [۱۲]. از طرفی، انتقال افقی ژن tst به‌واسطه عناصر متحرک ژنتیکی در کنار گردش مقاومت آنتی‌بیوتیکی بین سویه‌های استافیلوکوک اورئوس می‌تواند باعث بروز مشکلات زیادی در سیر درمان و افزایش میزان بیماری‌زایی شود [۱۳]. روش PCR با استفاده از DNA استخراج‌شده، در کنار سرعت و دقتی که دارد، در برخی موارد علاوه بر تحمیل هزینه‌های مالی اضافه به محقق، سرعت کار را نیز کاهش می‌دهد. یکی از این مراحل، آماده‌سازی و استخراج DNA است. این کار معمولاً به روش‌های جوشاندن، استفاده از فنل کلروفورم و کیت‌های استخراج انجام می‌شود [۱۳]. برای رسیدن به بالاترین ضریب همانندسازی PCR و دریافت بهترین قطعه باید کیفیت DNA استخراجی را مدنظر قرار داد [۱۴]. از این رو برای استخراج DNA روش‌های متفاوتی از جمله جوشاندن، فنیل کلروفوم، رسوب با اتانول، استفاده از دترجنت ها و استفاده از کیت‌های استخراج مطرح است [۱۵]. هر یک از این روش‌ها علاوه بر وقت‌گیر بودن و تحمیل هزینه‌های جانبی، دارای مشکلات و معایب زیادی نیز هستند [۱۳]. روش فنیل کلروفوم علاوه بر کند بودن، به دلیل سمی و خطرناک بودن ماده مورداستفاده، یک روش غیر ایمن بوده که کار کردن با آن در طولانی‌مدت باعث بروز مشکلاتی می‌شود [۱۵]. روش رسوب با اتانول نیز می‌تواند با انتقال اتانول در مراحل نهایی باعث بروز خطا و حتی از بین رفتن محصول نهایی شود [۱۴]. همچنین روش جوشاندن نیز به دلیل وقت‌گیر بودن، کیفیت به نسبت پایینی از DNA استخراج‌شده ارائه می‌دهد [۱۶]؛ اما از طرف دیگر، برای تکثیر ژن‌های باکتریایی می‌توان بدون انجام استخراج DNA و با استفاده از کلنی‌های تازه کشت داده و تلقیح آن‌ها در مخلوط نهایی، به نتایج قابل قبولی دست‌یافت. با حذف مرحله استخراج DNA می‌توان سرعت انجام PCR را هنگام مطالعه روی تعداد بسیار زیادی از نمونه‌ها بالا برد و از این زمان برای شناسایی بیش‌تر استفاده کرد [۱۶]. در مواردی که محقق قصد شناسایی چند ژن به‌صورت هم‌زمان را دارد، بهتر است از روش Multiplex PCR استفاده شود. در این روش از چند جفت پرایمر اختصاصی برای هدف‌های مختلف به‌طور هم‌زمان استفاده می‌شود. مزیت این روش، مطالعه هم‌زمان چندین ژن با کمترین مواد مصرفی است. همچنین صرفه‌جویی در زمان نیز یکی دیگر از مزیت‌های این روش است. در برخی باکتری‌ها از جمله استافیلوکوک اورئوس می‌توان با استفاده از روش PCR مستقیم و برداشت از کلنی‌های باکتریایی، مرحله استخراج DNA را حذف کرد. هدف از انجام این مطالعه، بررسی نتایج تکثیر ژن‌های femA، tst و mecA در استافیلوکوک اورئوس با دو روش PCR مستقیم بر پایه روش Multiplex و PCR با استفاده از DNA استخراج‌شده با کیت استخراج است تا در صورت مثبت بودن، بتوان در زمان و هزینه‌های جانبی حداکثر صرفه‌جویی را انجام داد.

روش کار:

جداسازی و ایزوله کردن باکتری‌ها

در این مطالعه – مقایسه‌ای، نمونه‌های جمع‌آوری‌شده شامل خون، ادرار، خلط، بزاق، تراشه، خون، زخم، ترشحات، آبسه و ... (معیار ورود باکتریایی بودن نمونه‌ها) از بیماران بستری در مراکز درمانی شهر زاهدان در مدت شش ماه جمع‌آوری و توسط محیط ترانسپورت BHI (Merck آلمان) به آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی زاهدان منتقل شدند. این نمونه‌ها تا زمان کشت اولیه درون فریزر با دمای ۲۰- درجه نگهداری شدند. در زمان موردنظر، نمونه‌ها روی محیط بلادآگار (Merck آلمان) با ۵ درصد خون گوسفند کشت داده و کوکسی‌های گرم مثبت توسط

رنگ‌آمیزی گرم جداسازی شدند. کلنی به‌دست‌آمده با استفاده از آزمایش‌های بیوشیمیایی اولیه مانند کوگولاز، کاتالاز، Manithol Salt Agar (ساخت Merk آلمان)، DNAs (ساخت Sigmaalderich آمریکا) غربالگری شده و نمونه‌های استافیلوکوک اورئوس جداسازی شدند. کلنی‌های تأییدشده برای انجام مراحل بعدی مورداستفاده قرار گرفتند.

استخراج DNA

به‌منظور استخراج DNA ژنومیک مراحل زیر انجام شد. ایزوله‌های بالینی ذخیره‌شده در ۲۰- درجه سانتی‌گراد روی محیط Blood Agar (ساخت Merckآلمان) کشت داده شدند و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. سپس یک کلنی از هر ایزوله کشت داده‌شده به ۵ میلی‌لیتر محیط کشت LB Broth (ساخت Merck آلمان) که قبلاً درون لوله‌های درب دار شیشه‌ای به تعداد ایزوله‌ها تقسیم و شماری گذاری شده بودند، تلقیح و به مدت ۲۰ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. بعد از سپری شدن زمان موردنظر (۲۰ ساعت)، لوله‌ها از انکوباتور خارج شد. ۱/۵ سی‌سی از محیط کشت حاصل، درون میکروتیوب های درب دار ۱/۵ پلاستیکی ریخته و مراحل استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت استخراج شرکت سینا ژن (Cat. No.PR881614) بر اساس پروتکل شرکت سازنده انجام شد. برای تأیید کار و کیفیت‌سنجی DNA های استخراج‌شده، ابتدا با رقت سازی DNA های استخراج‌شده، OD آن‌ها مورد خوانش قرار گرفت. همچنین محصولات DNA به میزان ۵ لاندا بعد از ترکیب با Loading dye (ساخت شرکت Thermo آمریکا) روی ژل آگارز یک درصد بارگذاری شد. DNA های حاصل تا زمان انجام آزمایش PCR در دمای ۲۰- ذخیره‌سازی شدند.

آماده‌سازی پرایمرها و انجام PCR با DNA استخراج شده

برای شناسایی ژن‌های femA، mecA و tst از پرایمرهای زیر استفاده شد. همه پرایمر ها که از شرکت زیست فن‌آوران خریداری‌شده بودند، بعد از اضافه کردن آب مقطر لیوفیلیزه (با توجه به حجم تعیین‌شده توسط شرکت سازنده پرایمر)، رقت اولیه ۱۰۰ پیکومولار تهیه و سپس از پرایمر ها به‌صورت جداگانه رقت ۱۵ پیکومولار برای PCR با استفاده از DNA استخراج‌شده توسط کیت تهیه شد (جدول ۱).

جدول ۱: لیست پرایمرهای مورداستفاده به همراه مشخصات آن‌ها

طول ژن (bp)	توالی پرایمرهای مورداستفاده	ژن‌های موردنظر	مرجع
۱۳۲	AAAAAAGCACATAACAAGCG GATAAAGAAGAAACCAGCAG	femA	Manisha Mehrotra و همکاران [۱۶]
۱۶۳	ACTGCTATCCACCCTCAAAC CTGGTGAAGTTGTAATCTGG	mecA	Manisha Mehrotra و همکاران [۱۶]
۳۲۶	AAC ATG GGG TAT CAG GGA GAT G CAA AGC GCG TAA CCG GATTGG	tst	Manisha Mehrotra و همکاران [۱۶]

برای انجام واکنش PCR Multiplex، ۵۰ میکرو لیتر از محلول نهایی شامل یک میکرو لیتر از DNA الگو، یک میکرو لیتر از هر پرایمر با غلظت ۱۰ پیکومولار و ۱۲/۵ میکرو لیتر از مستر میکس 2x and 1.5 mM MgCl2 (شرکت Ampliqon آلمان) حاوی Tris-Hcl PH8.5, (NH4) SO4, 3mM Mgcl2, 0.2%Tween20، unit 0/2 ،unit Ampliqon polymeras 0/2 ، MmdNTP 4/4 Insert red dye and stabilizer، Ampliqon polymeras استفاده شد. برای رساندن به حجم نهایی از آب مقطر دیونیزه استفاده شد. از مخلوط PCR فاقد DNA الگو به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد [۱۴]. سپس آزمایش Multiplex PCR برای ژن‌های femA، mecA و tst با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (BioRad آمریکا)، شامل دناتوراسیون اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه به مدت ۲ دقیقه، مرحله اتصال پرایمر در دمای ۵۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه و تکثیر قطعه هدف در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه انجام گرفت. محصولات PCR برای انجام الکتروفورز، در یخچال با دمای ۴+ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

انجام PCR مستقیم با استفاده از کلنی

به دلیل نبود یک پروتکل مصوب و قطعی، با آزمون‌وخطاهای متعدد بهترین نتیجه از موارد زیر به دست آمد. در ابتدا رقت مناسبی از رقت اولیه تهیه شد. در این روش غلظت پرایمر مورداستفاده تا ۲۵ پیکومولار افزایش داده شد. برای انجام واکنش PCR مستقیم، به‌جای استفاده از DNA الگو و انجام مراحل مختلف استخراج، یک عدد از کلنی‌های باکتری تازه کشت داده‌شده را با فیلدوپلاتین برداشته و داخل میکس آماده‌شده تلقیح

شد. در این روش برای به حداقل رساندن خطاهای احتمالی از محیط کشت Muller Hinton agar (ساخت Merck آلمان) برای ایزوله کردن باکتری و برداشت کلنی تک استفاده شد. همچنین برای بهتر حل شدن کلنی به مدت ۱۰ ثانیه میکس نهایی ورتکس شد. برای آماده‌سازی میکس نهایی، حجم نهایی را مطابق با روش اول به ۵۰ میکرو لیتر رسانده و به‌جای یک میکرو لیتر از هر پرایمر، ۳ میکرو لیتر اضافه شد و با همان سیکل دمایی واکنش انجام گرفت.

الکتروفورز روی ژل آگارز ۳ درصد

پنج میکرو لیتر از محلول PCR در ژل آگارز ۳ درصد الکتروفورز شد. هنگام تهیه ژل به آن ۵ میکرو لیتر محلول Gel Red (ساخت Biotium آمریکا) اضافه شد. نتیجه نهایی توسط دستگاه Gel Documentation system CCD (مدل CCD-Tab1 ساخت کیاژن ایران) بررسی و از آن عکس تهیه شد. از مارکر ۱۰۰bp فرمنتاز (شرکت Thermofisher آمریکا) برای شناسایی باند موردنظر استفاده شد. نتایج حاصل از تعیین توالی آزمون PCR به‌عنوان استاندارد طلائی برای مقایسه با سایر نتایج مورداستفاده قرار گرفت.

تجزیه‌وتحلیل داده‌ها

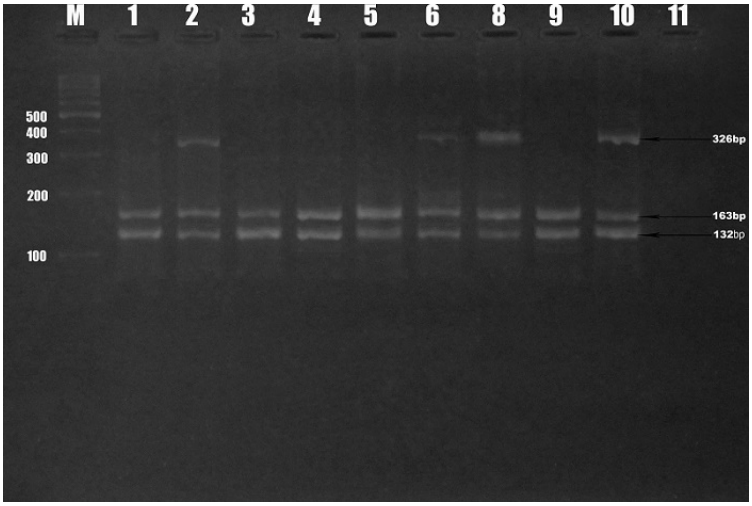
نتایج به‌دست‌آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSSنسخه ۱۶ و با کمک روش‌های آمار توصیفی (فراوانی، درصد و میانگین) تجزیه‌وتحلیل شدند.

یافته ها:

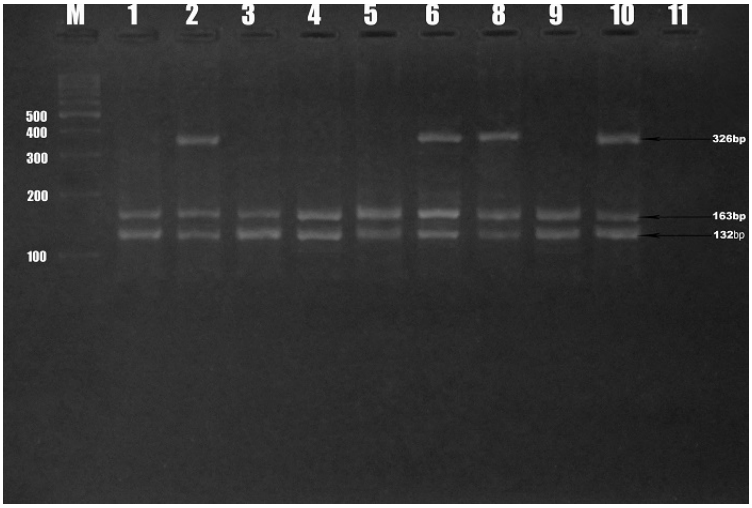
در این تحقیق، روش PCR مستقیم با استفاده از کلنی باکتری، در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس با موفقیت انجام شد و برای مقایسه نتایج به‌دست‌آمده از واکنش PCR با استفاده از DNA استخراج‌شده با کیت استفاده شد. در هر دو روش ژن‌های femA، mecA و tst با طول باندهای ۱۳۲، ۱۶۳ و ۳۲۶ جفت بازی بود، با موفقیت تکثیر شدند (تصویر ۱ و ۲). در این بررسی از مجموع ۱۳۰ ایزوله استافیلوکوکوس جداشده از نمونه‌های مختلف، ۶۹ ایزوله با روش PCR با استفاده از DNA استخراج‌شده با کیت از نظر مقاومت به متی سیلین مثبت شدند. همچنین ۶۸ ایزوله با روش PCR مستقیم مقاوم به متی سیلین شناخته شدند. در گزارش ژن‌های mecA و tst در سویه‌های استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین تفاوت در دو روش مورداستفاده دیده شد. در این بین، آزمون تعیین توالی همه نمونه‌های استافیلوکوک اورئوس برای ژن‌های موردبررسی به‌عنوان استاندارد طلایی در نظر گرفته شد. با توجه به نتایج حاصل از تعیین توالی، حساسیت و ویژگی روش‌های مختلف به دست آمد. در روش استخراج با استفاده از کیت حساسیت و ویژگی به ترتیب برای *mecA* و *tst* ۸۴/۲٪ و ۹۸/۵۵٪، ۹۶/۰۷٪ و ۹۸٪ حاصل شد. حساسیت و ویژگی روش PCR مستقیم هم برای ژن‌های mecA و tst هم به ترتیب ۹۸/۸۱٪ و ۹۲/۱۳٪ و ۹۴/۳۴٪ و ۹۶/۹۶٪ به دست آمد (جدول ۲). همه ایزوله‌هایی که استافیلوکوک اورئوس بودنشان با روش‌های فنوتیپی تأییدشده بود، با روش‌های PCR مستقیم و PCR با استفاده از DNA استخراج‌شده با کیت دارای ژن femA بودند. همچنین در بررسی ژن tst با دو روش ذکرشده، ۱۲ ایزوله با روش PCR با استفاده از DNA استخراج‌شده با کیت مثبت شدند و ۹ ایزوله با روش PCR مستقیم حضور ژن tst را نشان دادند (جدول ۲). در این بررسی به‌منظور تعیین یک استاندارد طلایی در مقایسه روش‌های مورداستفاده، همه محصولات به‌دست‌آمده از تکثیر ژن‌های مورد مطالعه تعیین توالی شدند. نتایج حاصل از Blast این توالی‌ها، بعد از تجزیه‌وتحلیل در سایت NCBI مشخص کرد که برای ژن‌های مورد مطالعه، ۷۸ ایزوله (۱۰۰٪) برای ژن femA، ۶۹ ایزوله (۸۷/۱۷) برای ژن mecA و ۱۳ ایزوله (۱۰/۵۳٪) برای ژن tst مثبت هستند.

جدول ۲: حساسیت، ویژگی و ارزش اخباری منفی و مثبت آزمایش‌های PCR مستقیم و PCR با استفاده از کیت استخراج

آزمایش	حساسیت (٪)		ویژگی (٪)		ارزش اخباری مثبت (٪)		ارزش اخباری منفی (٪)	
	TST	mecA	TST	mecA	TST	mecA	TST	mecA
روش PCR با استفاده از کلنی مستقیم	٪۸۴/۲	٪۹۸/۵۵	٪۹۶/۰۷	٪۹۸	٪۹۷/۵۸	٪۹۹/۸	٪۹۸/۸۵	٪۹۸
روش PCR با استفاده از DNA استخراج‌شده با کیت	٪۹۸/۸۱	٪۹۲/۱۳	٪۹۴/۳۴	٪۹۶/۹۶	٪۹۵/۹۸	٪۱۰۰	٪۹۶/۳۵	٪۱۰۰



تصویر ۱: نتیجه ژل الکتروفورز تکثیر ژن‌های عامل مقاومت به متی سیلین mecA و توکسین ۱ سندروم شوک توکسیک TST با PCR مستقیم با استفاده از کلنی‌های باکتری. چاهک‌های ۹-۱: PCR با استفاده از کلنی‌های باکتری و به‌صورت مستقیم، چاهک ۱۰: کنترل مثبت به‌صورت PCR مستقیم، چاهک ۱۱: کنترل منفی. چاهک M: مارکر ۱۰۰bp.



تصویر ۲: نتیجه ژل الکتروفورز تکثیر ژن‌های عامل مقاومت به متی سیلین mecA و توکسین ۱ سندروم شوک توکسیک TST با PCR با DNA استخراج‌شده با استفاده از کیت استخراج. چاهک‌های ۹-۱: PCR با استفاده DNA استخراج‌شده با کیت. چاهک ۱۰: کنترل مثبت به‌صورت PCR با DNA استخراج‌شده با استفاده از کیت، چاهک ۱۱: کنترل منفی. چاهک M: مارکر ۱۰۰bp.

جدول ۲. فراوانی ژن‌های femA، mecA و TST به‌دست‌آمده از دو روش PCR با استفاده از DNA استخراج‌شده توسط کیت استخراج و PCR مستقیم در نمونه‌های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس

نوع آزمایش PCR	استافیلوکوکوس اروئوس مقاوم به متی سیلین به روش فنوتیپی تعداد (درصد)، n=۷۸			استافیلوکوکوس حساس به متی سیلین به روش فنوتیپی تعداد (درصد)، n=۵۲		
	femA	mecA	TST	femA	mecA	TST
PCR مستقیم	۷۸ (٪۱۰۰)	۶۸ (٪۸۷ /۱۷)	۹ (٪۱۱/۵۳)	۵۲ (٪۱۰۰)	۰	۲ (٪۳/۸۴)
PCR با استفاده از DNA استخراج‌شده	۷۸ (٪۱۰۰)	۶۹ (٪۸۸ /۴۶)	۱۲ (٪۱۵/۳۸)	۵۲ (٪۱۰۰)	۰	۲ (٪۳/۸۴)

بحث:

استافیلوکوک های مقاوم به پنی‌سیلین بعد از شناسایی در سال ۱۹۵۰، به‌مرور به سایر آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتامی نیز مقاوم شدند، به‌طوری‌که تا ۱۹۷۵ سویه‌های جدید با مقاومت کامل به متی سیلین ظهور کردند که استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین نام گرفتند [۲]. این سویه‌ها حامل یکی و یا هر دو ژن‌های mecA و یا mecC هستند که با کد کردن پروتئین خاصی تحت PBPs از اتصال آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتامی به باکتری جلوگیری می‌کند [۴]. حضور ژن mecA منجر به بروز استافیلوکوک اورئوس های مقاوم به متی سیلین می‌شود [۲۳]. ژن mecA بر روی یک المنت ژنتیکی سیار قرار دارد که به آن کاست کروموزومی mec استافیلوکوکی می‌گویند [۴]. در کنار بروز مقاومت، این باکتری توانایی تولید عوامل بیماری‌زای مختلفی از قبیل توکسین، آنتی‌ژن‌های سطحی، آنزیم‌های خارج سلولی و برخی عوامل وابسته و متصل به کپسول پلی ساکاریدی بنام بیوفیلم را دارد [۹].سویه‌های از استافیلوکوک اورئوس تولید کننده توکسین های سوپرآنتی ژن می توانند در افراد بستری در بیمارستان مشکلات زیادی را ایجاد کنند. اهمیت این موضوع زمانی پررنگ تر می شود که در افراد دچار سوختگی و یا افرادی که مدت بسیار زیادی از بستری آن‌ها در بیمارستان می‌گذرد، سویه های توکسین زای استافیلوکوک های اورئوس، تظاهرات بالینی شدیدتری را در بیماران ایجاد می‌کنند. از این موارد می‌توان به فلسی‌شدن پوست، پوسته ریزی، قرمزی و ظهور کهیرهای وسیع اشاره کرد[۱۶].این مورد باعث می‌شود بر اثر ورود توکسین و واکنش‌های شدید ایمونولوژی، علاوه بر این‌که سیستم ایمنی بیمار شدیداً درگیر شود، روند درمان بیماری هم کند شود. چون در بیش‌تر موارد، این باکتری به‌صورت ثانویه ایجاد بیماری می‌کند[۱۶]. با وجود چنین شرایطی در تشخیص اولیه توکسین های سوپرآنتی‌ژنیک و اهمیت تشخیص به‌موقع سویه‌های خطرساز، وجود روش‌های ژنوتیپی و ردیابی ژن‌های عامل توکسین شدیداً احساس می‌شود. از جمله این ژن‌ها می‌توان به ژن tst، مولد توکسین-۱ سندروم شوک توکسیک اشاره کرد که باعث بروز سندروم شوک توکسیک در بیماران آلوده به استافیلوکوک می‌شود [۱۷]. این ژن از جمله ژن‌های کروموزومی مسئول کد کردن پروتئین‌های لازم برای ساخت توکسین مذکور بوده و حضور آن مؤید توکسین زا بودن باکتری است.

برای مطالعه روی میکروارگانیسم‌ها و پروتئین‌های ترشحی توسط آن‌ها و پی بردن به خصوصیات ذاتی و یا اکتسابی‌شان برای طبقه‌بندی و شناخت بیش‌تر، می‌توان از روش‌های مبتنی بر بررسی ژنوم استفاده کرد [۱۲]. یکی از بهترین و سریع‌ترین روش‌های ممکن برای این کار، شناسایی ژن‌های کد کننده این عوامل است که با حساسیت بسیار بالا و خطای اندک، تشخیص را قابل‌اطمینان می‌کند [۱۸]. با روش Multiplex PCR می‌توان چند ژن را به‌طور هم‌زمان مورد مطالعه قرار داده و اطلاعات دقیق از آن‌ها به دست آورد. این روش علاوه بر داشتن حساسیت و ویژگی بسیار بالا نسبت به روش‌های قدیمی در شناسایی خصوصیات میکروارگانیسم‌ها، از سرعت خوبی هم برخوردار است. بالا بودن حساسیت این روش در تشخیص باکتری‌ها و عفونت‌های وابسته به باکتری‌های فرصت‌طلب، مانند استافیلوکوکوس اورئوس که در بیش‌تر مواقع می‌توانند بیماری‌زایی شدیدی را ایجاد کنند، می‌تواند نقشی بسیار مؤثر و تعیین‌کننده داشته باشد [۱۹]. این در حالی است که با افزایش روزافزون سویه‌های مقاوم در استافیلوکوکوس اورئوس، به‌خصوص سویه‌های مقاوم به متی سیلین و تهدید برانگیز بودن آن در مقابل درمان، برای تشخیص سریع و جلوگیری از اپیدمی‌های وسیع باید به روش‌های سریع و قابل‌اطمینان روی آورد [۱۹]. همچنین توکسین های وابسته استافیلوکوکوس اورئوس نیز می‌توانند بیماری‌زایی باکتری را افزایش داده و گاهی مواقع خطرساز شوند [۲۰]. از جمله بیماری‌های ایجادشده توسط توکسین های باکتریایی می‌توان به سندرم شوک توکسیک (TSS) اشاره کرد که توسط باکتری استافیلوکوکوس اورئوس ایجاد می‌شود [۲۱]. همچنین از مهم‌ترین نکاتی که می‌توان به آن اشاره کرد شناسایی ژن mecA توسط روش PCR مستقیم است. این ژن یک شناساگر بسیار مهم در شناسایی سویه‌های مقاوم بوده و می‌توان از آن برای تعیین هویت قطعی استافیلوکوکوس اورئوس استفاده کرد که بدین ترتیب می‌تواند در منسوخ کرد روش‌های طولانی بیوشیمیایی و فنوتیپی مفید باشد. با استفاده از روش‌های فنوتیپی و سرولوژیکال نمی‌توان عوامل ایجادکننده عفونت‌های وابسته به استافیلوکوکوس های مقاوم را به‌سرعت تشخیص داد و عامل پاتوژن را از بین برد [۲۲]. با مشخص کردن ویژگی‌های ذاتی یا اکتسابی باکتری بیماری‌زا، از جمله داشتن مقاومت به آنتی‌بیوتیک و تولید توکسین های خطرناک، می‌توان در کمترین زمان ممکن با تجویز مناسب‌ترین دارو در مناسب‌ترین دز ممکن، علاوه بر درمان به‌موقع و کم کردن خطر ناشی از عفونت، از بروز مقاومت‌های گسترده به دلیل تشخیص غلط و تجویز اشتباه نیز جلوگیری کرد [۲۳]. اگرچه PCR یک روش ساده، آسان و در دسترس برای تکثیر ژنوم است، اما به استخراج DNA که یک مرحله وقت‌گیر است، نیاز دارد. نتایج مطالعه حاضر بیانگر این مطلب است که در برخی موارد باندهای حاصل از Multiplex PCR مستقیم کمی ضعیف‌تر از باندهای Multiplex PCR با استفاده از DNA بودند. در این زمینه مطالعات متعددی انجام‌شده است که نتایج این مطالعات با مطالعه

حاضر یکسان است. لیچ تنستیگر و همکاران در سال ۱۹۹۶ با مطالعه روی باکتری پاستورولا مولتی سیدا با روش PCR مستقیم نشان دادند که این روش برای شناسایی توکسین های این باکتری می‌تواند مورداستفاده قرار بگیرد و در کنار داشتن ارزش تشخیصی مناسب، مشخص کردند که این روش در کنار روش‌هایی مانند الیزه و تزریق یک دز کشنده توکسین به موش، دارای سرعت، دقت و ارزش اخباری قابل قبولی است [۲۴]. ناکآو و همکاران هم طی یک مطالعه روی توکسین های دیفتری با استفاده از PCR مستقیم در سال ۱۹۹۷، مشخص کردند که این روش دارای حساسیت قابل قبولی برای تشخیص سم دیفتری بوده و می‌توان توسط آن نمونه‌های بالینی را از نظر حضور ژن tox که عامل تولید سم دیفتیری است مورد ارزیابی مولکولی قرار داد [۲۵]. همچنین واقان و همکاران طی یک مطالعه در سال ۲۰۰۳ از روش PCR مستقیم برای ارزیابی باکتری اشریشیاکلی استفاده کردند که نتایج حاصل نشان‌دهنده تطابق این روش با روش مبتنی بر استخراج DNA بوده و باندهای به‌دست‌آمده در هر دو روش تقریباً یکسان و قابل استناد هستند [۲۶]. انگلس و همکاران در سال ۲۰۰۳ با استفاده از PCR مستقیم ردیابی مولکولی گونه‌های کمپیلوباکتر را موردبررسی قراردادند [۲۷]. در سال ۲۰۰۷ وان حال و همکاران با مطالعه مولکولی روی استافیلوکوک های مقاوم به متی سیلین نشان دادند که روش PCR مستقیم می‌تواند یک روش مناسب در تشخیص این باکتری باشد، به‌طوری‌که حساسیت و ویژگی این روش علاوه بر کاهش قابل‌ملاحظه بار مالی، بیش از ۸۰ درصد گزارش شد [۲۸]. مطالعات مشابه هم مؤید این امر است که می‌توان با حذف مرحله استخراج و استفاده مستقیم از کلنی باکتری، سرعت کار را بدون افت دقت، بالا برد[۲۹]. در مطالعه احسنی و همکاران در سال ۱۳۹۱ مشخص شد که می‌توان از روش PCR مستقیم برای مطالعه ژن‌های عامل توکسین در کلستریدیوم دیفیسیل استفاده کرد. این مطالعه نشان داد که کیفیت باندهای به‌دست‌آمده در این روش با کیفیت باندهای به‌دست‌آمده در روش PCR با استفاده از DNA استخراج‌شده کاملاً برابر هستند [۱۴].

در برخی از مطالعات نشان داده‌شده است که روش PCR مستقیم علاوه بر این‌که در مطالعات باکتریایی قابل‌استفاده است، در مطالعات غیر باکتریایی نیز می‌تواند کاربرد داشته باشد. برای نمونه، مطالعه نیشیمارو و همکاران در سال ۲۰۰۹ مشخص کرد که RT-PCR مستقیم از ویژگی و حساسیت مناسبی برای شناسایی ویروس نوروالک ویروس (Norwalk virus) برخوردار است و حتی می‌شود از این روش برای بررسی حضور ویروس نوروالک وویروس در مدفوع نیز استفاده کرد [۳۰]. علاوه بر مطالعات فوق و همچنین تحقیق حاضر، عدم بررسی این روش در سایر باکتری‌ها با ساختارهای متفاوت و الگوی های منحصربه‌فرد خود، دیده می‌شود.

نتیجه‌گیری:

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از یک‌سو و پرهزینه بودن برخی کیت‌های استخراج DNA و همچنین وقت‌گیر بودن این روش برای بررسی نمونه‌ها در حجم بالا، استفاده از روش PCR مستقیم می‌تواند بسیار مفید باشد. علاوه بر این، برخی روش‌های استخراج، به دلیل باقی گذاشتن مواد مورداستفاده در فرایند استخراج، ممکن است تأثیر بدی روی کیفیت و پایداری DNA در مراحل نهایی گذاشته و نتایج بررسی را با خطا و یا حتی شکست مواجه کنند. در این پژوهش، باوجود چند ژنی بودن و حذف کیت، استخراج با روش PCR معمولی کیفیتی به‌مراتب بالاتر و بهتر به دست داد. همچنین با توجه به نتایج قابل قبولی که این روش نسبت به روش PCR با DNA استخراج‌شده دارد، توصیه می‌شود که در مواردی که قطعیت آن‌ها اثبات‌شده است، از کلنی مستقیم برای انجام آزمایش‌های PCR استفاده شود.

تشکر و قدردانی:

این پژوهش مصوب شورای پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی زاهدان در سال ۱۳۹۴ با کد کمیته اخلاق به شماره ۷۱۵۲ است.

تعارض منافع:

نویسندگان هیچ تعارض منافع با توجه به تألیف و یا انتشار این مقاله اعلام نکرده‌اند.

References:

1. Andreson R, Reppo E, Kaplinski L, et al. Genomemasker package for designing unique genomic PCR primers. BMC Bioinformatics 2006; 7(2): 172-172.
2. Walley AJ. PCR Protocols Current Methods and Applications. J Med Genet 1994; 31(1): 87-87.
3. Degen HJ, Deufel A, Eisel D, et al (eds). PCR applications manual. Roche, Mannheim, Germany: 2006.
4. Innis M, Gelfand D. 1 - Optimization of PCR: Conversations between Michael and David, in PCR Applications, M.A.I.H.G.J. Sninsky, Editor. Academic Press: San Diego; 1999:11(9) 3-22.
5. Rychlik W. Selection of primers for polymerase chain reaction. Mol Biotechnol 1995; 3(2): 129-34.
6. Brock TD. The Value of Basic Research: Discovery of Thermus Aquaticus and Other Extreme Thermophiles. Genetics 1997; 146(4): 1207-1210.
7. Bartlett JM, Stirling D. A short history of the polymerase chain reaction. Methods Mol Biol 2003; 22(6): 3-6.
8. Fortun M. The J. H. B. Bookshelf. J His Biol 1998; 31(1): 143-145.
9. Belgrader P, Benett W, Hadley D, et al. PCR detection of bacteria in seven minutes. Science 1999; 284(5413): 449-50
10. Tashiro M, Izumikawa K, Ashizawa N. Clinical significance of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci obtained from sterile specimens. Diagn Microbiol Infect Dis 2015; 81(1): 71-75.
11. Abdollahi A, Koohpayeh SA, Najafipoor S, et al. Evaluation of drug Resistance and Staphylococcal cassette chromosome (SCCmec) types among methicillin-Resistant Staphylococcus aureus(MRSA). ALBORZ-E-IRAN 2012; 1(1): 47-52.
12. Shimizu T, Yamamoto Y, Hosoi T, et al. MRSA toxic shock syndrome associated with surgery for left leg fracture and co-morbid compartment syndrome. J Acute Dis 2014; 3(1): 82-84.
13. Shahbazi B, Narenji H. Comparison of four methods of DNA extraction from gram-negative and gram-positive bacteria. Zanko J Med Sci 2014; 15(45): 9-16.
14. Ahsani MR, Shamsaddini BM. Compare of two methods of direct PCR and PCR with DNA extraction in Clostridium Perfringens typing. Iran Vet J 2012; 8(4): 5-12.
15. Mousazade moghadam M, Babavalian H, Mirnejad R, et al. Rapid DNA extraction of bacterial genome of Staphylococcus aureus using laundry detergents and assessment of the efficiency of DNA in downstream process using PCR. Mljgoums 2012; 6(1): 35-42.
16. Chum PY, Haimes JD, André CP, et al. Genotyping of Plant and Animal Samples without Prior DNA Purification. J Vis 2012;10(67): 3791-3844
17. Mehrotra M, Wang G, Johnson WM. Multiplex PCR for Detection of Genes for Staphylococcus aureus Enterotoxins, Exfoliative Toxins, Toxic Shock Syndrome Toxin 1, and Methicillin Resistance. J Clin Microbiol 2000; 38(3): 1032-1035.
18. Capoluongo E, Giglio A A, Lavieri MM, et al. Genotypic and phenotypic characterization of Staphylococcus aureus strains isolated in subjects with atopic dermatitis. Higher prevalence of exfoliative B toxin production in lesional strains and correlation between the markers of disease intensity and colonization density. J Dermatol Sci 2001; 26(2): 145-155.
19. Borst P. Genetic Mechanisms of Drug Resistance: A Review. Acta Oncologica 1991; 30(1): 87-105.
20. Humphreys H. Role of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin in systemic staphylococcus aureus infection. Infect Dis Newsl 1993; 12(3): 17-20.
21. Quan L, Morita R, Kawakami S. Toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) antibody levels in Japanese children. Burns 2010; 36(5): 716-721.
22. Montazeri EA, Khosravi AD, Jolodar A, et al. Identification of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) strains isolated from burn patients by multiplex PCR. Burns 2015; 41(3):590-4
23. Quirk M. First VRSA isolate identified in USA. Lancet Infect Dis 2002; 2(9): p510.
24. Lichtensteiger CA, Steenbergen SM, Lee RM, et al. Direct PCR analysis for toxigenic Pasteurella multocida. J Clin Microbiol 1996; 34(12): 3035-3039.
25. Nakao H, Popovic T. Development of a direct PCR assay for detection of the diphtheria toxin gene. J Clin Microbiol 1997; 35(7): 1651-1655.
26. Fode-Vaughan KA, Maki JS, Benson JA, et al. Direct PCR detection of Escherichia coli O157:H7. Lett Appl Microbiol 2003; 37(11): 239-243.
27. Inglis GD, Kalischuk LD. Use of PCR for direct detection of Campylobacter species in bovine feces. Appl Environ Microbiol 2003; 69(6): 3435-47.
28. van Hal SJ, Stark D, Lockwood B,et al. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) detection: comparison of two molecular methods (IDI-MRSA PCR assay and GenoType MRSA Direct PCR assay) with three selective MRSA agars (MRSA ID, MRSASelect, and CHROMagar MRSA) for use with infection-control swabs. J Clin Microbiol 2007; 45(8): 2486-90.
29. Psifidi A, Dovas CI, Banos G. A comparison of six methods for genomic DNA extraction suitable for PCR-based genotyping applications using ovine milk samples. Mol cell probes 2010; 24(2):93-8.
30. Nishimura N, Nakayamaa H, Yoshizumib S, et al. Detection of noroviruses in fecalspecimens by direct RT-PCR without RNA purification. J Virol Methods 2009; 163(2): 282-286.

Original Article

Comparing direct PCR and PCR with DNA extraction kits in identifying TST and mecA in Staphylococcus aureus

Hamed Tahmasebi *[1], Mohammad Bokaeian [1, 2], Mojdeh Jahantigh [1], Javad Adabi [1]

Received: 2016/2/05 Revised: 2016/14/09 Accepted: 2017/6/03

1. Dept of Microbiology, School of Medicine, Zahedan University of Medical Science, Zahedan, Iran
2. Zahedan Center of Infectious Diseases & Tropical, Zahedan, Iran

Pars Journal of Medical Sciences, Vol. 14, No.3, Fall 2016

Pars J Med Sci 2016; 14(3):43-51

Abstract

Introduction:
Polymerase Chain Reaction (PCR) is an accurate and sensitive test in molecular assays. DNA extraction has always been a time-consuming stage before conducting PCR and can be eliminated to significantly save time and costs. The present study was conducted to compare direct PCR and the PCR with template DNA extraction in detecting TST, femA and mecA.

Materials and Methods:
In the present study, clinical isolates of Staphylococcus aureus (S. aureus) which were biochemically confirmed were assessed using direct PCR of colonies of S. aureus cultured on Muller Hinton agar and PCR with DNA extraction kits for TST and mecA. Three specific primers were used for these genes and the sequencing of all the samples was considered the gold standard.

Results:
The 326-bp TST and 163-bp mecA were successfully amplified using direct PCR and PCR with DNA extraction, which was associated with toxins and resistance to methicillin. All the samples were found to be femA-positive in both methods. In direct PCR, 68 (87.17%) isolates were found to be mecA-positive and 9 (11.53%) TST-positive. In PCR with DNA extraction kits, 69 (88.46%) isolates were found to be mecA-positive and 12 (15.38%) TST-positive.

Conclusions:
According to the results obtained, direct PCR is recommended to be used as a time and cost effective method of identifying S. aureus.

Key words: Staphylococcus Aurous, Methicillin-Resistant, Direct PCR, TST, mecA

* Corresponding author, Email: h.tahmasebi87@yahoo.com