Original Paper

Molecular detection of *Pseudomonas stutzeri* by duplex-PCR technique

Roya Beytsayyah (Alavi Sharif) (M.Sc)[1], Fatemeh Haddadi (Ph.D)*[2]
Hossein Kamaladini (Ph.D)[3], Mirza Mohammad Reza Sharifmoghadam (Ph.D)[4]

[1]M.Sc in Genetics, Department of Biology, Faculty of Sciences, Zabol University, Zabol, Iran. ORCID ID: 0000-0002-8905-451X

[2]***Corresponding Author**, Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, Zabol University, Zabol, Iran. **fatemeh.haddadi@uoz.ac.ir , haddadifatemeh@yahoo.com** ORCID ID: 0000-0002-1957-5213

[3]Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, Zabol University, Zabol, Iran. ORCID ID: 0000-0002-5550-9010

[4]Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, Ferdowsi University, Mashhad, Iran. ORCID ID: 0000-0002-3638-0653

Abstract

Background and Objective: Duplex PCR is a widespread molecular biology technique that has the ability in specific and high sensitivity detection of microorganisms. This study was performed to evaluate the molecular identification of *Pseudomonas stutzeri* using duplex PCR.

Methods: In this descriptive-laboratory study, *Pseudomonas stutzeri* ATCC 17588 bacteria was purchased from genetic resources center and after culturing the bacteria, DNA was extracted in the exponential growth phase using boiling method. Duplex PCR was carried out for specific identification of the bacteria subsequently. The primers were designed using *catA* and *nirP* gene sequences. Sensitivity and specificity of duplex PCR technique were investigated using 5 bacteria.

Results: The amplification of two bands of 512 bp and 249 bp for *catA* and *nirP* genes were observed, respectively. The specificity was 100% .The sensitivity of 0.048 ng/µL of genomic DNA was determined for *catA* and *nirP* genes, respectively.

Conclusion: Duplex-PCR molecular method with its sensitivity and proper feature and high potential for identification of *Pseudomonas* bacteria can be applied as a routine method in well-equipped laboratories by expert technician to identify suspicious cases.

Keywords: *Pseudomonas stutzeri*, Duplex-PCR, *catA* gene, *nirP* gene

Received 4 Oct 2017 **Revised** 30 Jun 2018 **Accepted** 23 Jul 2018

Cite this article as: Roya Beytsayyah (Alavi Sharif), Fatemeh Haddadi, Hossein Kamaladini, Mirza Mohammad Reza Sharifmoghadam. [Molecular detection of *Pseudomonas stutzeri* by duplex-PCR technique]. J Gorgan Univ Med Sci. 2019 Winter; 20 (4): 115-122. [Article in Persian]

تحقیقی

شناسایی مولکولی *سودوموناس استوتزری* به روش duplex-PCR

رویا بیت سیاح (علوی شریف)[۱]، دکتر فاطمه حدادی*[۲]، دکتر حسین کمال الدینی[۳]، دکتر میرزا محمدرضا شریف مقدم[٤]

۱- کارشناس ارشد رشته ژنتیک، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه زابل، زابل، ایران. کد ارکید 0000-0002-8905-451X

۲- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه زابل، زابل، ایران. کد ارکید 0000-0002-1957-5213

۳- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه زابل، زابل، ایران. کد ارکید 0000-0002-5550-9010

۴- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران. کد ارکید 0000-0002-3638-0653

چکیده

زمینه و هدف: *روش duplex-PCR یک روش زیست شناسی با کاربرد گسترده است که قابلیت شناسایی اختصاصی و با حساسیت بالای میکروارگانیسم‌ها را داراست. این مطالعه به منظور شناسایی مولکولی سودوموناس استوتزری (Pseudomonas stutzeri) به روش duplex-PCR انجام شد.*

روش بررسی: *در این مطالعه توصیفی آزمایشگاهی باکتری Pseudomonas stutzeri ATCC 17588 از مرکز ذخایر ژنتیک تهیه و پس از کشت، DNA در فاز لگاریتمی رشد به روش جوشاندن استخراج گردید. سپس با استفاده از روش duplex-PCR مبادرت به شناسایی اختصاصی این باکتری گردید. پرایمرهای موردنظر با استفاده از ژن‌های catA و nirP طراحی شد. بررسی حساسیت و اختصاصیت واکنش duplex-PCR با استفاده از ۵ باکتری انجام شد.*

یافته‌ها: *نتایج حاصل، تکثیر دو باند 512 bp و 249 bp را به ترتیب برای ژن catA و nirP نشان داد. نتایج بررسی اختصاصیت ۱۰۰درصد تعیین شد و حساسیت ۰/۰٤۸ ng/µL از DNA ژنومی را برای هر دو ژن catA و nirP نشان داد.*

نتیجه‌گیری: *روش مولکولی duplex-PCR باتوجه به داشتن حساسیت و ویژگی مناسب و قابلیت شناسایی بالای باکتری سودوموناس استوتزری می‌تواند به عنوان یک روش روتین در آزمایشگاه‌های مجهز توسط افراد متخصص برای شناسایی موارد مشکوک مورد استفاده قرارگیرد.*

کلید واژه‌ها: *سودوموناس استوتزری ، duplex-PCR ، ژن catA ، ژن nirP*

* نویسنده مسؤول : دکتر فاطمه حدادی ، پست الکترونیکی haddadifatemeh@yahoo.com , fatemeh.haddadi@uoz.ac.ir

نشانی: زابل، پردیس جدید دانشگاه زابل، دانشگاه ملی زابل، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، تلفن ۳۱۲۳۲۲۱۵-۰۵۴، نمابر ۳۱۲۳۲۱۸۰

وصول مقاله: ۱۳۹٦/۷/۱۲ ، اصلاح نهایی: ۱۳۹۷/٤/۹ ، پذیرش مقاله: ۱۳۹۷/۵/۱

مقدمه

با توجه به گزارش سازمان بهداشت جهانی بیماری‌های عفونی بزرگ‌ترین عامل مرگ و میر کودکان و نوجوانان در جهان است (۱). کنترل عفونت‌های باکتریایی تا حد زیادی وابسته به شناسایی دقیق گونه‌های باکتریایی است. از این‌رو توسعه تشخیص میکروبی به‌خصوص تشخیص مولکولی باکتری‌ها حائز اهمیت است (۲). *سودوموناس* از جمله باکتری‌های شایع در محیط زیست و جدا شده از نمونه‌های بیمارستانی است و گونه‌های مختلف آن به‌عنوان باکتری‌های مهم بیماری‌زا و عامل عفونت‌زای بیمارستانی، محسوب می‌شوند (۳). امروزه روش‌های مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (Polymerase Chain Reaction: PCR) به عنوان روش‌های سریع و حساس همراه با کارایی بالا به طور گسترده در تشخیص پاتوژن‌ها به‌کار گرفته می شوند و قادر به شناسایی سریع گونه‌های میکروبی با تکثیر توالی‌های ژنی منحصر به‌فرد در یک موجود است. یکی از عوامل موثر در موفقیت در انجام استفاده از DNA با کیفیت مطلوب است. هزینه و زمان لازم استخراج DNA از جمله عوامل مهم در انتخاب روش استخراج است (۴). این روش نیز به نوبه خود کاستی‌هایی دارد. از جمله این کاستی‌ها می‌توان به هزینه نسبتاً بالا برای هر نمونه و گاهی اوقات کمبود نمونه اولیه در بعضی از آزمایشگاه‌ها اشاره نمود. برای غلبه بر این مشکلات و همچنین افزایش ظرفیت تشخیصی، روش multiplex PCR با شناسایی منطقه بزرگ‌تری از توالی هدف، به‌کار گرفته می‌شود (۵) که سبب افزایش دقت شناسایی با به‌کارگیری تعداد بیشتر توالی ژنی می‌گردد. امروزه نظارت موثر و شناسایی دقیق و سریع پاتوژن‌های عفونی به دلیل گسترش روزافزون آنها حائز اهمیت است و شناسایی دیرهنگام برخی پاتوژن‌ها سبب مرگ اشخاص می‌گردد (۶).

بسیاری از گونه‌های *سودوموناس* غیرتخمیری بوده و در روش‌های رایج آزمایشگاهی به سختی قابل تشخیص هستند. لذا

بایستی برای تشخیص قطعی به آزمایشگاه‌های مرجع ارسال شوند. از این رو روش‌های مولکولی گزینه مناسبی برای شناسایی این میکروارگانیسم‌ها هستند. گونه‌های مختلف این باکتری شامل *آئروژینوزا* و *استوتزری* به عنوان پاتوژن انسانی مطرح هستند. گونه‌های *سودوموناس* قادرند در شرایط محیطی مختلف زنده بمانند؛ ولی اغلب در محیط‌های مرطوب بیمارستان یافت می‌شوند. نتایج به‌دست آمده از پژوهش‌ها حاکی از آن است که باکتری *سودوموناس* حتی به بعضی مواد مورد استفاده در بیمارستان‌ها نظیر ضدعفونی‌کننده‌ها، بسیار مقاومند (۷و۸). از اینرو این باکتری به دلیل سازگاری خوبی که با انواع محیط‌ها دارند و قادر به حضور در هر مکانی از بیمارستان هستند؛ بسیار مورد توجه واقع شده است (۹). همچنین *سودوموناس*‌ها دارای مقاومت آنتی‌بیوتیکی فوق‌العاده‌ای هستند که اهمیت آنها در عفونت‌های بیمارستانی را دوچندان نموده است (۱۰).

در سال ۱۹۷۳ اولین مورد قابل قبول در مورد عفونت حاصل از باکتری *سودوموناس استوتزری* توسط Gilardi و Mankin گزارش شد. این گزارش در مورد عفونت موجود در شکستگی استخوان درشت‌نی بود که موجب عدم جوش خوردن این شکستگی گردید (۱۱).

تاکنون گزارشات متعددی در مورد باکتریومی سپتیسمی (۱۲)، عفونت‌های استخوانی به عنوان مثال عفونت شکستگی، عفونت مفصل، آرتریت و استئومیلیت (۱۳)، اندوکاردیت (۱۴)، عفونت چشم (۱۵)، مننژیت، پنومونی، عفونت پوستی و عفونت دستگاه ادراری ناشی از باکتری *سودوموناس استوتزری* (۱۶) منتشر شده است.

مطالعه Hernandez Duquino و Rosenberg که در سال ۱۹۸۷ بر روی بطری‌های آب موجود در سوپرمارکت‌ها انجام شد نشان داد که بیشترین گونه موجود از جنس *سودوموناس* در این بطری‌ها، گونه *استوتزری* بود (۱۷). *سودوموناس استوتزری* به وفور در محیط‌های خاکی و آبی وجود دارند. به طوری که حضور این باکتری در اکثر محیط‌ها باعث شده آن را به عنوان باکتری فراگیر به حساب آورند. این گونه از *سودوموناس* در فاضلاب‌ها نیز به فراوانی رشد می‌کنند. در طول سال‌های گذشته افزایش قابل توجهی در جداسازی سویه‌های *استوتزری* از نمونه‌های بالینی صورت پذیرفته است. خطر عفونت بیماران مبتلا به بیماری‌های زمینه‌ای یا بیمارانی که تحت جراحی قلب قرار گرفته‌اند؛ از عمده‌ترین نگرانی‌ها در مورد عفونت ناشی از این باکتری است (۱۸). شایع‌ترین قسمت‌هایی که در معرض خطر عفونت ناشی از باکتری *سودوموناس استوتزری* هستند؛ زخم‌های جراحی، خون، دستگاه تنفس و دستگاه ادرار است (۱۷و۱۹).

باکتری *سودوموناس استوتزری*، مانند سایر گونه‌های جنس *سودوموناس*، گرم منفی، کاتالاز مثبت و اکسیداز مثبت هستند و از لحاظ متابولیسمی به شدت تنفسی هستند. برخلاف گونه‌های فلورسنت *سودوموناس*، *سودوموناس استوتزری* هیچگونه رنگدانه فلوروسنتی تولید نمی‌کند و بدین صورت از سایر گونه‌های *سودوموناس* قابل تمایز است. گونه‌ای از جنس *سودوموناس* که نزدیک‌ترین رابطه را با *سودوموناس استوتزری* دارد؛ *سودوموناس بالریک* است که در بسیاری از خصوصیات فنوتیپی با *سودوموناس استوتزری* تشابه دارد. این دو گونه از جنس *سودوموناس* متعلق به یک شاخه 16s rRNA هستند. هرچند که وجه تمایز این دو گونه را می‌توان توانایی رشد *سودوموناس بالریک* در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد ذکر نمود (۱۶).

ژن‌های مهم قابل استفاده در شناسایی باکتری *سودوموناس استوتزری* *nirP* و *catA* هستند. *nirP* یکی از این ژن‌ها است که در فرایند نیترات‌زدایی باکتری نقش دارد و یک پروتئین غشایی ۲ یا ۳ ظرفیتی را کد نموده و در احیای NO و نیتریت شرکت می‌کند. ژن *catA* که در *سودوموناس استوتزری* موقعیتی کروموزومی دارد؛ آنزیمی کلیدی در متابولیسم بنزوات و دیگر ترکیبات آلی به نام کاتکول ۱ و ۲-دی‌اکسیژناز را کد می‌کند (۱۶). انجام مطالعاتی به منظور شناسایی و تشخیص به‌موقع و سریع این گونه باکتریایی حایز اهمیت است. این مطالعه به منظور شناسایی مولکولی *سودوموناس استوتزری* به روش duplex-PCR انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه توصیفی آزمایشگاهی در دانشکده علوم پایه دانشگاه زابل در سال ۱۳۹۵ انجام شد.

تهیه نمونه: باکتری *Pseudomonas stutzeri* ATCC 17588 از مرکز ذخایر ژنتیک خریداری و پس از انتقال به آزمایشگاه، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. باکتری‌های *کلبسیلا پنومونیه* سویه ۹۹۹۷ از انستیتو پاستور تهران، *آسینتوباکتر بومانی* سویه ۱۹۶۰۶ از مرکز تحقیقات البرزی دانشگاه شیراز، *اشریشیاکلی* سویه DH5α از دانشگاه UPM مالزی، *سودوموناس آئروژینوزا* سویه ۲۷۸۵۳ از بیمارستان بوعلی همدان و *ادواردزیلا تاردا* سویه۱۵۹۴۷ از مرکز ذخایر ژنتیک ایران تهیه و به‌عنوان کنترل منفی مورد استفاده قرار گرفت.

کشت باکتری و استخراج DNA: به‌منظور کشت باکتری *سودوموناس استوتزری* از محیط‌های کشت جامد بلاد آگار و LB و محیط کشت مایع نوترینت براث استفاده گردید. به‌دنبال کشت باکتری در محیط مایع استخراج DNA به دو روش جوشاندن و اتانول سرد صورت گرفت. در روش جوشاندن ابتدا یک میلی‌لیتر از محیط کشت TSB حاوی باکتری *سودوموناس استوتزری* به تیوب

اپندورف منتقل گردید و با استفاده از میکروسانتریفوژ یخچال‌دار در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲ دقیقه در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ گردید. سپس محلول رویی دور ریخته شد و رسوب باقیمانده در یک میلی‌لیتر محلول PBS حل شد و در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت یک دقیقه در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد سانتریوفیوژ انجام شد. پس از ۳ مرتبه تکرار این مرحله، رسوب حاصل در ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه یا آب مقطر استریل حل و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد از آن، محتویات تیوب به مدت ۵ دقیقه در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه و در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. در انتها محلول رویی که حاوی DNA بود؛ به تیوب جدید انتقال یافت و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

در روش اتانول سرد ابتدا ۵۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری در تیوب ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته شد و به مدت ۱۰ دقیقه در بن‌ماری در دمای ۹۲-۸۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد از ۱۰ دقیقه، تیوب به مدت ۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریوفوژ گردید و محلول رویی به تیوب جدید منتقل شد. در مرحله بعد، دو برابر محلول جدا شده، الکل اتانول ۹۵ درصد به تیوب اضافه و تیوب حاوی محلول و الکل به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰ سانتریوفوژ شد. بعد از آن محلول رویی دور ریخته شد و رسوب حاصل که DNA بود؛ در ۵۰ میکرولیتر آب دیونیزه حل شد. قبل از حل نمودن DNA در آب، به‌منظور خروج کامل اتانول از DNA درب تیوب باز و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد تا باقیمانده اتانول به‌طور کامل بخار شد. DNA استخراج شده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

استخراج DNA: به میزان ۲۰ µL از DNA استخراج شده به روش‌های جوشاندن و اتانول سرد بر روی ژل آگارز یک درصد بارگذاری شد. وجود تک باند کمرنگ ولی مشخص برای روش جوشاندن نشان‌دهنده کیفیت DNA استخراج شده از روش جوشاندن است. در ادامه به منظور بررسی کمیت DNA استخراج شده از دو روش جوشاندن و اتانول سرد، از دستگاه بیوفتومتر استفاده شد.

انتخاب ژن‌های مناسب برای انجام واکنش duplex-PCR: دو ژن *catA* و *nirP* به‌منظور طراحی پرایمر برای واکنش duplex-PCR انتخاب گردید. توالی کامل این دو ژن از پایگاه اطلاعاتی NCBI به‌دست آمد. شماره دسترسی این توالی‌ها برای ژن *nirP* و ژن *catA* به‌ترتیب AY957388 REGION: 9112..9360 و AY957388 REGION: 1644563..1645501 بودند.

ویژگی ترمودینامیکی پرایمرهای طراحی شده از طریق وب‌سایت Integrated DNA Technology و از بخش OligoAnalyzer مورد ارزیابی قرار گرفت و در آخر به‌منظور اطمینان از اختصاصیت پرایمرهای طراحی شده از سرویس BLAST سایت NCBI استفاده گردید. پرایمرهای طراحی شده از شرکت Bioneer کره جنوبی تهیه شد. در جدول یک مشخصات پرایمرها نشان داده شده است.

انجام واکنش‌های PCR: محلول واکنش PCR شامل ۸ میکرولیتر Master Mix 2x، ۰/۵ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرها، ۰/۲ میکرولیتر DNA الگو با غلظت ۱۰۰ ng/µL تهیه گردید و در نهایت با استفاده از آب مقطر دیونیزه به حجم ۱۵ میکرولیتر رسانده شد.

مراحل انجام واکنش PCR : دمای واسرشتگی اولیه ۹۴درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه، در ادامه ۳۵ سیکل حرارتی به‌صورت ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه به ازای هر سیکل، دمای اتصال ۶۰/۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و دمای بسط ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه طراحی شد. دمای بسط نهایی نیز ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انتخاب گردید.

تعیین اختصاصیت و حساسیت پرایمرهای طراحی شده ژن *catA*: بعد از به دست آوردن دمای بهینه واکنش برای پرایمرهای طراحی شده ژن *catA* (۶۰/۹ درجه سانتی‌گراد) به‌منظور ارزیابی ویژگی پرایمرهای طراحی شده ژن *catA*، واکنش PCR با ژنوم تخلیص شده باکتری‌های *کلبسیلا پنومونیه* سویه ۹۹۹۷، *آسینتوباکتر بومانی* سویه ۱۹۶۰۶، *اشریشیاکلی* سویه DH5α، *سودوموناس آئروژینوزا* سویه ۲۷۸۵۳ و *ادواردزیلا تاردا* سویه۱۵۹۴به‌عنوان کنترل منفی انجام شد.

برای تعیین حساسیت این روش با استفاده از پرایمرهای ژن *catA* حداقل غلظت DNA ژنومی مورد نیاز برای شناسایی باکتری مورد بررسی قرار گرفت. بنابراین از ژنوم با غلظت اولیه ۱۹۸ ng/µL، ساخت رقت‌های از ۵۰ ng/µL تا ۰/۰۰۰۰۵ ng/µL صورت گرفت و بعد از انجام PCR از رقت‌های ۳/۱۲۵ ng/µL تا ۰/۰۰۳ ng/µL، نتایج تکثیر بر روی ژل آگارز یک درصد انجام شد.

واکنش duplex-PCR: پس از مشخص کردن دمای بهینه واکنش

جدول ۱ : پرایمرهای طراحی شده ژن‌های nirP و catA

نام پرایمر	توالی پرایمر '3-'5	GC (درصد)	دما (درجه سانتی‌گراد)
NirP Primer F	ATGTCCGCTTCCAAGTTGC	۵۶/۵	۶۲/۶
NirP Primer R	TCAGAGCAGCGTCAGCAG	۵۹/۱	۶۲/۹
CatA Primer F	AATCTCCCACACCAACGACG	۵۹/۱	۶۲/۳
CatA Primer R	ACTCGGACTGGCTCTTGTC	۵۹/۱	۶۲/۸

PCR برای جفت پرایمرهای مربوط به دو ژن *catA* و *nirP* (۶۰/۷ درجه سانتی‌گراد)، واکنش شیب دمایی برای PCR چندگانه نیز انجام شد و بهترین دمای این واکنش به‌دست آمد.

تعیین اختصاصیت و حساسیت پرایمرهای طراحی شده ژن‌های *catA* و *nirP*: برای بررسی ویژگی پرایمرهای طراحی شده ژن‌های *catA* و *nirP*، واکنش duplex-PCR با ژنوم تخلیص شده باکتری‌های کنترل منفی انجام گرفت.

حساسیت واکنش duplex-PCR با استفاده از پرایمرهای طراحی شده برای ژن‌های *catA* و *nirP* و با از روش رقت‌های DNA و رقت‌های سریالی محیط کشت بررسی گردید.

تعیین میزان حساسیت با استفاده از رقت‌های سریالی از محیط کشت باکتری: برای ارزیابی حساسیت پرایمرهای طراحی شده از طریق شمارش کلونی، رقت‌های سریالی از سوسپانسیون باکتری در محیط کشت TSB تهیه گردید. بدین منظور از کشت ۱۶ ساعته ۱۰۰ میکرولیتر برداشته و در ۹۰۰ میکرولیتر محیط کشت TSB تلقیح شد. نمونه‌ها به روش سریال دایلوشن در تیوب اپندورف رقیق‌سازی شدند. به‌این صورت که از تیوب شماره ۱، ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی برداشته و به تیوب شماره ۲ حاوی ۹۰۰ میکرولیتر محیط کشت TSB اضافه گردید. این کار برای سایر تیوب‌ها به صورت سریالی انجام شد و بدین‌ترتیب هر تیوب نسبت به تیوب قبل از خود، ۱۰ برابر رقیق‌تر گردید. همزمان با تهیه رقت‌های سریالی، از هر رقت ۱۰۰ میکرولیتر بر روی محیط کشت LB جامد پخش شد و سپس پتری دیش‌ها به انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند و بعد از رشد کامل، پتری دیش‌ها از نظر تعداد کلونی مورد ارزیابی قرار گرفتند. از طرفی از ۱۰ رقت به‌دست آمده در تیوب، به روش جوشاندن استخراج DNA صورت گرفت و از DNA استخراج شده برای بررسی حساسیت توسط PCR، استفاده گردید. در نهایت محصولات PCR بر روی ژل آگارز یک درصد مورد ارزیابی قرار گرفتند.

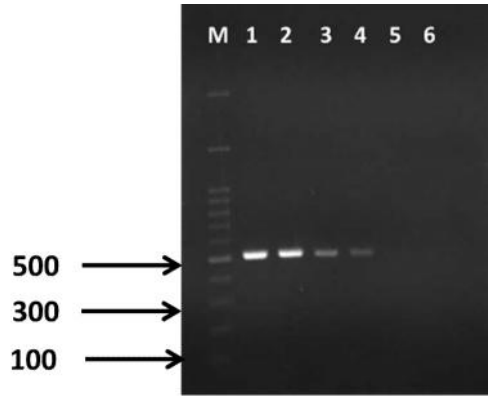
یافته‌ها

استخراج DNA: در روش اتانول سرد باند مشخصی برای DNA مشاهده نگردید. غلظت DNA استخراج شده به روش جوشاندن ۱۹۸ ng/µL و غلظت آن در روش اتانول سرد ۹۴ ng/µL اندازه‌گیری شد. عامل خلوص A260/A280 به ترتیب برای این دو روش ۱/۸ و ۲/۶ بود که نشان‌دهنده برتری روش جوشاندن نسبت به اتانول سرد است.

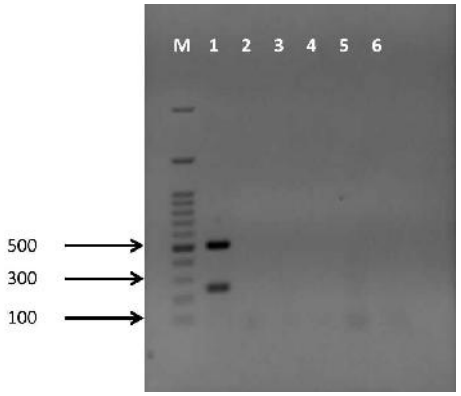
نتایج حاصل از PCR

تعیین اختصاصیت پرایمرهای ژن *catA*: عدم تشکیل باند در نمونه‌های کنترل منفی نشان‌دهنده اختصاصیت پرایمرهای طراحی شده برای ژن *catA* بود (شکل یک).

تعیین حساسیت پرایمرهای ژن *catA*: باندی از DNA ژنومی در غلظت‌های ۰/۰۱۲ ng/µL و ۰/۰۰۳ ng/µL مشاهده نگردید. نتایج حساسیت واکنش PCR ژن *catA* تا رقت ۰/۰۴۸ ng/µL از DNA ژنومی در شکل ۲ نشان داده شده است.



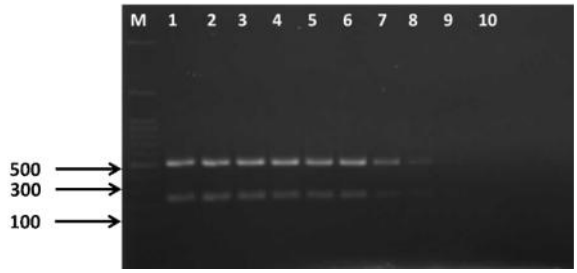
شکل ۱ : تعیین اختصاصیت پرایمرهای ژن catA
M- DNA سایز مارکر؛ ۱- کلبسیلا پنومونیه؛ ۲- آسینتوباکتر بومانی؛ ۳- اشریشیاکلی ٤- سودوموناس آئروژینوزا ۵- ادواردزیلا تاردا



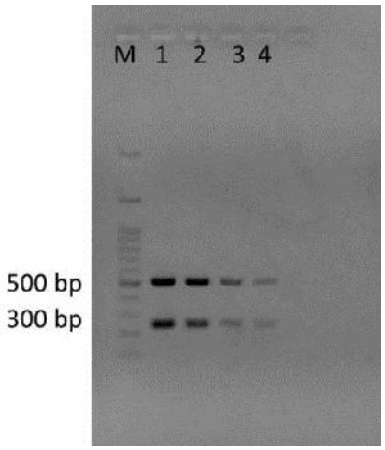
شکل ۲ : تعیین حساسیت پرایمرهای ژن catA
M- سایز مارکر bp ۱۰۰؛ ۱- ng/µL ۳/۱۲۵؛ ۲- ng/µL ۰/۷۸۱
۳- ng/µL ۰/۱۹۵؛ ٤- ng/µL ۰/۰٤۸؛ ۵- ng/µL ۰/۰۱۲
٦- ng/µL ۰/۰۰۳

تعیین اختصاصیت duplex-PCR: باندهای ۲۴۸ bp و ۵۱۲ bp به‌ترتیب با استفاده از پرایمرهای ژن *catA* و *nirP* و DNA ژنومی باکتری *سودوموناس استوتزری* مشاهده گردید. عدم تکثیر قطعات مورد نظر در حضور DNA ژنومی باکتری‌های کنترل منفی نشان‌دهنده اختصاصیت پرایمرهای طراحی شده است (شکل ۳).

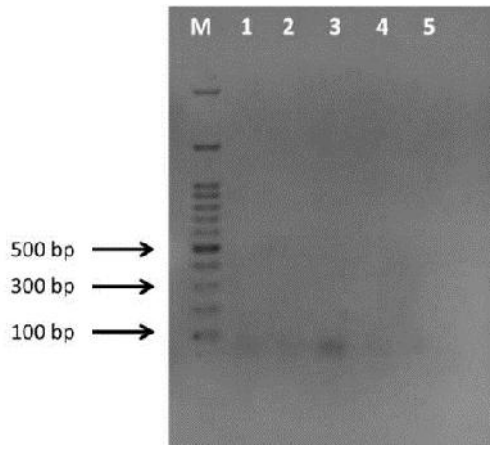
تعیین حساسیت duplex-PCR: در روش رقت‌های DNA، تشکیل دو باند مورد نظر تا رقت ۰/۰۴۸ ng/µL از DNA ژنومی مشاهده شد (شکل ۴) و در روش رقت‌های سریالی با رشد باکتری در پتری دیش پس از ۱۶ ساعت، ۲۳ تک کلونی در رقت 10^{6} مشاهده گردید. نتایج حاصل از تکثیر توسط PCR مطابق با شکل ۵ است. به طوری که باندهای ۵۱۲ bp و ۲۴۹ bp تا رقت 10^{8} مشاهده گردید.



شکل ۳ : واکنش duplex-PCR برای تعیین اختصاصیت پرایمرهای ژن‌های nirP و catA
M- DNA سایز مارکر ۱- سودوموناس استوتزری؛ ۲- کلبسیلا پنومونیه؛ ۳- آسینتوباکتر بومانی؛ ٤- اشریشیاکلی ٥- سودوموناس آئروژینوزا ٦- ادواردزیلا تاردا



شکل ٤ : تعیین حساسیت duplex-PCR به روش رقت‌های DNA ژنومی
M- سایز مارکر bp ۱۰۰؛ ۱- ng/µL ۳/۱۲۵؛ ۲- ng/µL ۰/۷۸۱ ۳- ng/µL ۰/۱۹۵؛ ٤- ng/µL ۰/۰٤۸؛ ٥- ng/µL ۰/۰۱۲ ٦- ng/µL ۰/۰۰۳



شکل ٥ : تعیین میزان واحد تشکیل کلونی duplex-PCR
سایز مارکر bp ۱۰۰؛ ۱- رقت 10^{5}؛ ۲- رقت 10^{6} ۳- رقت 10^{7}؛ ٤- رقت 10^{8}

بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان‌دهنده کیفیت و خلوص بالاتر DNA استخراج شده به روش جوشاندن نسبت به روش اتانول سرد بود. روش جوشاندن علاوه بر باکتری‌های گرم منفی، برای استخراج DNA ژنومی از باکتری‌های گرم مثبت نیز به‌کار می‌رود.

اساس روش‌های مبتنی بر PCR بر پایه استفاده از اسیدنوکلئیک بوده و حساسیت و اختصاصیت آن در مقایسه با روش‌های میکروبی و بیوشیمیایی معمول، بالاتر است. استفاده از این روش‌ها به‌دلیل پایداری بالای مولکول DNA طی فرایندهای مختلف برای شناسایی موجودات متعدد گسترش فراوانی یافته است (۲۰).

در مطالعه شهبازی و نارنجی در سال ۲۰۱۴ چهار روش متفاوت استخراج DNA بررسی شد. نتایج حاصله عملکرد مناسب DNA استخراج شده به روش جوشاندن را در مطالعات مولکولی مانند واکنش PCR تایید نمود. همچنین صرف زمان و هزینه پایین و همچنین به‌دست آوردن DNA با غلظت و خلوص مناسب از دیگر مزایای روش جوشاندن گزارش شد (۲۱) که با نتایج مطالعه حاضر هم‌خوانی داشت.

توانایی روش duplex-PCR در تشخیص همزمان چند نمونه میکروبی، این روش را برای شناسایی همزمان چندین عامل بیماری‌زا با ویژگی‌های بالینی مشابه و خصوصیات اپیدمیولوژیک یکسان، بسیار کاربردی کرده است. در این روش با شناسایی همزمان بیش از یک توالی ژنی، امکان غربالگری گونه‌های متعدد و از طرفی شناسایی تمام گونه‌های موجود در یک نمونه به‌طور همزمان فراهم شده است (۲۲). این روش در مقایسه با PCR معمولی از حساسیت و اختصاصیت بیشتری برخوردار است و از مشکلات بالقوه‌ای که در PCR معمولی وجود دارد؛ مانند نتیجه منفی کاذب به علت عدم واکنش و یا مثبت کاذب به علت آلودگی، مبرا است. وجود این مشکلات در PCR ساده، داشتن کنترل‌های مناسب در این روش را ضروری کرده است. همچنین duplex-PCR نسبت به PCR معمولی مقرون به صرفه بوده و زمان کمتری را به خود اختصاص می‌دهد (۲۳).

در مطالعه حاضر با توجه به استفاده از ژن های *catA* و *nirP* و تشکیل دو باند با اندازه‌های ۵۱۲ bp و ۲۴۹ bp در کنترل مثبت و عدم تشکیل آنها در نمونه‌های کنترل منفی؛ نشان دهنده وجود این دو ژن در *سودوموناس استوتزری* و اختصاصیت پرایمرهای طراحی شده بود. شناسایی این باکتری با استفاده از duplex-PCR به مدت حدود ۳ ساعت به طول انجامید. این روش در مقایسه با روش‌های وابسته به کشت برای شناسایی *سودوموناس استوتزری* که گران‌قیمت و وقت‌گیر هستند؛ روشی بسیار قابل قبول و مقرون به‌صرفه ارزیابی شد. در این مطالعه برای تشخیص باکتری *سودوموناس استوتزری* از ژن‌های واقع در پلاسمید استفاده نشد. زیرا از آنجایی که فعالیت ترانسفورماسیون این باکتری بالا است (۱۶)؛ احتمال انتقال ژن‌های پلاسمیدی این باکتری به سایر باکتری‌ها در طبیعت افزایش یافته و می‌تواند منجر به شناسایی همراه

با خطای این باکتری گردد. برای این منظور ژن‌های *catA* و *nirP* که موقعیتی کروموزومی دارند؛ مناسب بودند. از آنجایی که تشخیص *سودوموناس استوتزری* در عفونت‌ها، براساس کشت باکتری و شناسایی آن توسط انجام واکنش‌های افتراقی بر روی یکسری پیچیده از سوبستراهای بیوشیمیایی امکان‌پذیر می‌گردد؛ بایستی برای شناسایی این باکتری از روش‌های جدید مولکولی که دربرگیرنده کمترین هزینه و داشتن بالاترین حساسیت و کمترین زمان جواب‌دهی است؛ بهره گرفت.

پرایمرهای مورد استفاده برای ژن‌های *catA* و *nirP* در این مطالعه به گونه‌ای طراحی شدند که هیچگونه واکنش متقاطعی با ژنوم سایر موجودات اعم از ژنوم یوکاریوت‌ها و پروکاریوت‌ها نداشته باشند و بدین ترتیب ویژگی واکنش duplex-PCR برای تشخیص این باکتری، ۱۰۰ درصد تعیین گردید. از منظری دیگر به دلیل قرارگیری این دو ژن بر روی کروموزوم، مطالعه این باکتری با دقت بیشتری انجام می‌شود. Cladera و همکاران نیز با استفاده از آنالیز ۷ ژن از باکتری *سودوموناس استوتزری* از جمله ژن *catA* به تمایز این گونه از دیگر گونه‌های *سودوموناس* پرداختند (۲۴).

در مطالعه حاضر حساسیت روش duplex-PCR برای ژن‌های *catA* و *nirP*، با استفاده از روش DNA ژنومی، ۰/۰۴۸ ng/µL به‌دست آمد. در روش رقت‌های سریالی نیز تشکیل دو باند تا رقت ۸ مشاهده گردید. این نتایج گویای صلاحیت هر دو روش به‌کار رفته برای شناسایی مقادیر کم DNA در نمونه مورد مطالعه است. همچنین حساسیت به دست آمده در واکنش PCR ژن *catA* با حساسیت duplex-PCR برابر بود. این نتایج نشان می‌دهد که در حضور یک جفت پرایمر دیگر، هر جفت مستقلاً و بدون هیچ مشکلی به کار خود ادامه داده و پرایمرهای ژن *catA* همچنان تا رقت ۰/۰۴۸ ng/µL از DNA ژنومی تکثیر می‌یابند. از طرفی تشکیل دو باند در آخرین رقت‌ها، نشان‌دهنده بازده تکثیر یکسان برای هر دو ژن است. بازده تکثیر یکسان حاکی از طراحی صحیح پرایمرها و در نتیجه تکثیر ترجیحی یک توالی نسبت به توالی دیگر مشاهده نشد.

باوجود مزایای بسیار واکنش‌های مبتنی بر PCR، اما محدودیت‌هایی نیز وجود دارند که می‌توان به استفاده از دستگاه گران قیمت ترموسایکلر و یا استفاده از مواد سمی و خطرناک مثل اتیدوم برماید برای آشکارسازی و تشخیص محصول PCR اشاره نمود که موجب می‌گردد تا این روش تنها در آزمایشگاه‌های مجهز توسط افراد متخصص به‌کار گرفته شود.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که روش مولکولی duplex-PCR باتوجه به داشتن حساسیت و ویژگی مناسب و قابلیت شناسایی بالای باکتری *سودوموناس استوتزری* می‌تواند به عنوان یک روش روتین در آزمایشگاه‌های مجهز توسط افراد متخصص برای شناسایی موارد مشکوک مورد استفاده قرارگیرد و با بهینه‌سازی متغیرهای این روش، می‌توان توالی هدف را با کارایی بالا شناسایی نمود.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه (کد ۲۲۸۷۷۸۲ ایران داک) خانم رویا بیت سیاح (علوی شریف) برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته ژنتیک از دانشکده علوم پایه دانشگاه زابل بود.

References

1. Dixit U, Shanker R. Detection of water-borne pathogens: culture plate to genomics. Indian J of Sci Technol. 2009 Nov; 2(11): 59-71.

2. Pindi PK, Srinath RR, Shanker AS. Novel approaches of genomic DNA isolation for identification of Cultivable Bacteria. Jundishapur J Microbiol. 2013 Dec; 6(10): e8339. doi: 10.5812/jjm.8339

3. Moolenaar RL, Crutcher JM, San Joaquin VH, Sewell LV, Hutwagner LC, Carson LA, et al. A prolonged outbreak of Pseudomonas aeruginosa in a neonatal intensive care unit: did staff fingernails play a role in disease transmission? Infect Control Hosp Epidemiol. 2000 Feb; 21(2): 80-5. doi: 10.1086/501739

4. Aidar M, Line SR. A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells. Braz Dent J. 2007; 18(2): 148-52.

5. Osmani Bojd M, Kamaladini H, Haddadi F, Vaseghi A. Thiolated AuNP probes and multiplex PCR for molecular detection of Staphylococcus epidermidis. Mol Cell Probes. 2017 Aug; 34: 30-36. doi: 10.1016/j.mcp.2017.04.006

6. Aydemir O, Aydemir Y, Ozdemir M. The role of multiplex PCR test in identification of bacterial pathogens in lower respiratory tract infections. Pak J Med Sci. 2014 Sep; 30(5): 1011-16. doi: 10.12669/pjms.305.5098

7. Iroha IR, Oji AE, Nwosu OK, Amadi ES. Antimicrobial Activity of Savlon®, Izal® and Z-Germicide® Against Clinical Isolates of Pseudomonas aeruginosa from Hospital Wards. European Journal of Dentistry and Medicine. 2011; 3: 32-35. doi: 10.3923/ejdm.2011.32.35

8. White DG, McDermott PF. Biocides, drug resistance and microbial evolution. Curr Opin Microbiol. 2001 Jun; 4(3): 313-37.

9. Brooks G, Carroll KC, Butel J, Morse S. Medical Microbiology (Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology). 24th ed. New York: McGraw-Hill Medical. 2007; pp: 352-46.

10. Eriksen HM, Iversen BG, Aavitsland P. Prevalence of nosocomial infections in hospitals in Norway, 2002 and 2003. J Hosp Infect. 2005 May; 60(1): 40-5. doi: 10.1016/j.jhin.2004.09.038

11. Gilardi GL, Mankin HJ. Infection due to Pseudomonas stutzeri. NY State J Med. 1973 Dec; 73(23): 2789-91.

12. Priestley GS, Holland J, Marsh B, Wilson R. Pseudomonas stutzeri septicaemia in association with a bullous skin eruption. Anaesth Intensive Care. 1996 Dec; 24(6): 710-13.

13. Reisler RB, Blumberg H. Community-acquired Pseudomonas stutzeri vertebral osteomyelitis in a previously healthy patient: case report and review. Clin Infect Dis. 1999 Sep; 29(3): 667-69.

14. Rosenberg I, Leibovici L, Mor F, Block C, Wysenbeek AJ. Pseudomonas stutzeri causing late prosthetic valve endocarditis. J R Soc Med. 1987 Jul; 80(7): 457-59. doi:

10.1177/014107688708000719

15. Lebowitz D, Gürses-Ozden R, Rothman RF, Liebmann JM, Tello C, Ritch R. Late-onset bleb-related panophthalmitis with orbital abscess caused by Pseudomonas stutzeri. Arch Ophthalmol. 2001 Nov; 119(11): 1723-25.

16. Lalucat J, Bennasar A, Bosch R, García-Valdés E, Palleroni NJ. Biology of Pseudomonas stutzeri. Microbiol Mol Biol Rev. 2006 Jun; 70(2): 510-47. doi: 10.1128/MMBR.00047-05

17. Hernandez Duquino H, Rosenberg FA. Antibiotic-resistant Pseudomonas in bottled drinking water. Can J Microbiol. 1987 Apr; 33(4): 286-89.

18. Holmes B. Identification and distribution of Pseudomonas stutzeri in clinical material. J Appl Bacteriol. 1986 May; 60(5): 401-11.

19. Taneja N, Meharwal SK, Sharma SK, Sharma M. Significance and characterisation of pseudomonads from urinary tract specimens. J Commun Dis. 2004 Mar; 36(1): 27-34.

20. Kim MJ, Kim HY. Species identification of commercial jerky products in food and feed using direct pentaplex PCR assay. Food Control. 2017; 78: 1-6. http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.02.027

21. 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. [Article in Persian]

22. Solà M, Riudavets J, Agustí N. Detection and identification of five common internal grain insect pests by multiplex PCR. Food Cntrol. 2018 Feb; 84: 246-54. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.08.002

23. Markoulatos P, Siafakas N, Moncany M. Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. J Clin Lab Anal. 2002; 16(1): 47-51.

24. Cladera AM, Bennasar A, Barceló M, Lalucat J, García-Valdés E. Comparative genetic diversity of Pseudomonas stutzeri genomovars, clonal structure, and phylogeny of the species. J Bacteriol. 2004 Aug; 186(16): 5239-48. doi: 10.1128/JB.186.16.5239-5248.2004