مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد/ دوره ۱۹، شماره ۲/ خرداد و تیر ۱۳۹۶/ ۱۶-۶

مقاله پژوهشی

تشخیص اسینتوباکتر بائومانی با استفاده از روش PCR-ELISA

سوزان امینی راد[۱و۲]، جعفر امانی[۲*]، عباسعلی ایمانی فولادی[۲]، پردیس سعیدی[۲]، مهرداد موسی زاده مقدم[۳]

[۱]دانشجو، گروه زیست شناسی، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران؛ [۲]مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران؛ [۳]دانشجو، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۱/۲۴ تاریخ پذیرش: ۹۵/۵/۱۶

چکیده:

زمینه و هدف: **اسینتوباکتر بومانی عامل عفونت های دستگاه تنفسی، دستگاه ادراری، خون و زخم ها به خصوص در بخش مراقبت های ویژه می باشد و توانایی کسب مقاومت دارا می باشد. به منظور تشخیص به موقع و پیگیری فرایند درمان این عفونت ها، لازم است که تکنیک ها به طور مستمر اصلاح شوند. با توجه به اینکه تاکنون مطالعه ای در زمینه شناسایی و جداسازی این باکتری در نمونه های بالینی در ایران با روش PCR-ELISA انجام نشده است، این مطالعه با هدف جداسازی اسینتوباکتر بومانی با روش PCR-ELISA انجام شده است.**

روش بررسی: **در این تحقیق روش PCR-ELISA با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و پروب بر روی سویه استاندارد مورد بررسی قرار گرفت. بعد از تکثیر و نشاندار کردن توالی ژن *gltA*، محصول نشاندار در کف میکرو پلیت کوت گردید و با استفاده از آنتی بادی ضد دیگوکسی ژنین کانژوگه با پراکسیداز شناسایی شد.**

یافته ها: **بررسی توالی bp722 از بخش حفظ شده ژن *gltA* اسینتوباکتر بائومانی و نتایج حاصل از مطالعه بر روی این باکتری با استفاده از روش PCR-ELISA و به کارگیری آغازگرها و پروب نشان داد که این روش علاوه بر دقت و حساسیت، برای تشخیص سریع باکتری مناسب است.**

نتیجه گیری: **نتایج حاصل، حاکی از حساسیت بیشتر و سرعت بالای روش PCR-ELISA در مقایسه با PCR معمولی است. این تکنیک همچنین علاوه بر سهولت بررسی تعداد بیشتر نمونه، از خطر کمتری نسبت به روش PCR معمولی برخوردار است.**

واژه های کلیدی: **اسینتوباکتر بومانی، ژن *gltA*، PCR-ELISA.**

مقدمه:

اسینتوباکتر به عنوان یک پاتوژن بیمارستانی در اواخر دهه ۱۹۷۰ به دلیل استفاده گسترده از آنتی بیوتیک ها ظهور پیدا کرد. این باکتری، کوکو باسیل گرم منفی، اکسیداز منفی، غیر متحرک و هوازی اجباری است که به طور شایع در عفونت های بیمارستانی به ویژه در بخش مراقبت های ویژه نقش دارد (۳-۱). اندازه کلنی آن بین ۱ تا ۲ میلی متر، بدون پیگمان و صاف تا موکوئیدی است (۴). بر روی محیط آگار خون دار معمولاً همولیز ایجاد می کند و در دمای ۴۴ درجه سانتی گراد رشد می نماید. در مرحله رشد لگاریتمی شکل باسیل دارد، ولی در مرحله سکون به صورت کوکو باسیل دیده می شود. این باکتری از گروه باکتری های غیر تخمیری محسوب می شود (۳). گونه های مختلف این باکتری در طبیعت انتشار وسیعی دارند و می توانند از آب، خاک، پوست انسان، غذا و فاضلاب جدا شوند (۵). برای زندگی محیط های مرطوب را ترجیح می دهد و در شرایط نامساعد مثل محیط خشک و یا محیط های آبی می تواند به مدت طولانی زنده بماند (۳).

نویسنده مسئول: *تهران- دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)- مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی- تلفن: ۰۹۱۲۴۰۶۶۹۶۴، E-mail:jafar.amani@gmail.com*

جنس اسینتوباکتر شامل ۲۳ گونه با نام معتبر و ۱۱ گونه بی نام (ژنومیک) می باشد (۶). با این حال، به دلیل این که شناسایی روتین در آزمایشگاه میکروب شناسی بالینی هنوز امکان پذیر نیست، در سه گروه اصلی طبقه بندی شده اند: مجموعه اسینتوباکتر *calcoaceticus* و *baumannii*. گلوکز، اکسیداسیون غیر همولیتیک. (*A.b* توسط OXA-51 شناخته می شود). اسینتوباکتر *lwoffii*: گلوکز منفی، غیر همولیتیک، اسینتوباکتر *haemolyticus*: همولیتیک (۷).

اسینتوباکتر به علت ویژگی کلینیکی و توانایی آن در کسب مقاومت دارویی، به عنوان یکی از میکرو ارگانیسم های تهدید کننده نسبت به درمان با داروهای ضد میکروبی در نظر گرفته می شود (۸). اسینتوباکتر بومانی، مهم ترین گونه از این جنس می باشد که عامل عفونت های دستگاه تنفسی، خون، دستگاه ادرار و زخم ها می باشد (۹). این باکتری به طور معمول بیماران بستری شده در بیمارستان، افرادی که از نظر پوستی دچار آسیب شده اند و یا اختلالی در مسیر تنفسی شان دارند را مورد هدف قرار می دهد (۸)، اما به ندرت باعث عفونت در افراد با سطح ایمنی نرمال می شود و همچنین کمتر به عنوان فلور طبیعی بدن شخص سالم شناخته شده است (۳). در سال های گذشته گونه های اسینتوباکتر به اکثر آنتی بیوتیک ها مقاوم گردیده اند و به دلیل مقاومت چند دارویی در این باکتری، درمان عفونت های بیمارستانی ناشی از آن با دشواری روبرو شده است(۹،۱۰). اسینتوباکتر بومانی توانایی اتصال به تمام سطوح بیولوژیک و غیر بیولوژیک را داشته و تشکیل بیو فیلم می دهد. این توانایی، ویژگی پاتولوژیک مهمی در بسیاری از باکتری ها می باشد و باعث گسترش مقاومت آنتی بیوتیکی و تهاجم به سیستم ایمنی بدن میزبان می شود (۱۱،۴). با توجه به مطالب ارائه شده فوق شناسایی اسینتوباکتر بومانی در نمونه های بالینی دارای اهمیت زیادی است. روش های مختلفی جهت تشخیص باکتری ها وجود دارد، اما روش هایی که بر پایه ژنوم و DNA هستند تکنیک های بهتری جهت تشخیص می باشند (۶). استفاده از روش های مولکولی حساس تر و دقیق تر از روش های مرسوم باکتریولوژیک است. همچنین این روش ها در مقایسه با روش های متداول آزمایشگاهی اختصاصی تر هستند. روش های مولکولی از نظر تشخیص قطعی گونه باکتری نسبت به روش های متداول آزمایشگاهی ارجحیت دارند (۱). PCR روشی سریع و حساس است که در دهه های اخیر بسیار مورد توجه دانشمندان علوم زیستی قرار گرفته است. این روش به علت کارایی بالا به طور گسترده ای در تشخیص سریع پاتوژن ها به کار گرفته می شود. PCR قادر است که تعداد نسخه اندکی از DNA هدف را تا سطحی که توسط ژل الکتروفورز قابل تشخیص باشد، تکثیر نماید (۱۲،۶،۱). در سال های اخیر با استفاده از روش های تشخیص سریع و پیشرفته مولکولی، امکان تعیین سویه باکتری و نیز انتخاب آنتی بیوتیک مناسب در فاصله زمانی حدود ۳ تا ۴ ساعت مهیا شده است. این امر هم برای پزشک و هم برای بیمار بسیار ارزشمند است (۱۴،۱۳). گرچه این روش دارای مزایای بسیاری است، اما محدودیت هایی نیز دارد (استفاده از مواد سرطان زا، هزینه بالا) (۱۲،۶). به همین دلیل جهت رفع این مشکلات روشی به کار گرفته شد که بتواند تا حدودی معایب روش های مبتنی بر PCR را به حداقل برساند. با توجه به اینکه تاکنون مطالعه ای در زمینه شناسایی و جداسازی اسینتو باکتر بومانی در نمونه های بالینی در ایران با روش PCR-ELISA انجام نشده است. این مطالعه با هدف جداسازی اسینتوباکتر بومانی با روش PCR-ELISA انجام شده است. در این روش از پروب های اختصاصی ناحیه مشخصی از ژن هدف که در ناحیه '5 با بیوتین برچسب گذاری شده اند و نیز نوکلئوتیدهای DIG-dUTP یا digoxigenin-11-dUTP جهت استفاده در سنتز ناحیه مشخصی از ژن هدف و همچنین آنتی بادی Anti-DIG proxidase جهت شناسایی نهایی میان کنش بین پروب و محصول PCR با استفاده از روش الایزا استفاده می گردد. در این روش پروب بیوتینه با استفاده از میانکنش تمایلی بیوتین و

استرپتواویدین در کف پلیت الایزا پوشش گزاری می شود.

در این تحقیق از ژن *gltA* که کد کننده سیترات سنتاز و از ژن های housekeeping می باشد استفاده شد. این آنزیم در چرخه متابولیک تری کربوکسیلیک اسیدها نقش دارد و با تجمیع استیل کوانزیم آ و اگزالواستات تولید سیترات و کوانزیم آ می کند. در واقع محصول این ژن در احیاء نوکلئوتیدهای پورین موثر در تولید انرژی که وابسته به زنجیره انتقال الکترون حاصل از میان کنش های فسفرولاسیون می باشند نقش اساسی دارد (۱۵). مقایسه توالی *gltA* می تواند به عنوان یک بخش محافظت شده برای این باکتری در کنار روش تعیین توالی 16s rDNA برای استنتاج تکامل باکتری مورد استفاده قرارگیرد، به ویژه هنگامی که مدل های فیلوژنتیک ناپایدار از توالی ریبوزومی به دلیل سطح بالایی از شباهت توالی بین این باکتری ها ایجاد شود، این ژن می تواند نقش تعیین کننده ای داشته باشد (۱۶،۱۵).

روش بررسی:

در این تحقیق از آزمایشگاه مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی بقیه الله (عج) سویه باکتری *Acinetobacter baumannii* تهیه و تست های بیوشیمیایی مربوط به آن قبلاً انجام و باکتری به صورت تأیید نهایی شده تحویل گردید.

استخراج DNA ژنومی باکتری به دو روش Boiling و CTAB صورت گرفت.

در روش Boiling یک کلنی تک از محیط کشت باکتری به محیط کشت LB مایع تلقیح و ۱۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. سپس از محیط فوق برداشته شده و سانتریفوژ گردید. پس از آن مایع رویی دور ریخته شد و به رسوب حاصل، بافر TE اضافه گردید و در آب جوش جوشانده شد. سپس سانتریفوژ گردید تا اجزاء سلولی ته نشین شوند، مایع رویی به یک میکروتیوب استریل منتقل گردید. در نهایت مقدار غلظت DNA در طول موج ۲۶۰ در دستگاه نانودراپ اندازه گیری شد.

در روش CTAB، تک کلنی باکتری به محیط LB مایع منتقل و به مدت ۱۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد.

سپس از محیط کشت فوق برداشته و سانتریفوژ گردید. رسوب حاصل در بافر TE حل شد. به این مخلوط بافر SDS ۱۰٪ و آنزیم ۲۰ میلی گرم بر میلی لیتر Proteinase K اضافه و در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. سپس به آن نمک ۵ مولار NaCl و محلول CTAB/NaCl اضافه و در ۶۵ درجه سانتی گراد گرمادهی شد. هم حجم آن، مخلوط کلروفرم- ایزوآمیل الکل اضافه و مخلوط حاصل در ۴ درجه سانتی گراد و سانتریفوژ شد. فاز رویی را برداشته و هم حجم آن مخلوط فنل- کلروفرم- ایزوآمیل الکل اضافه و به آرامی تکان داده شد (۳۰-۱۵ ثانیه) تا دو فاز با هم ترکیب شوند. مخلوط حاصل در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ گردید. فاز رویی به تیوپ دیگری منتقل شده و هم حجم آنایزوپروپانول اضافه و در دمای ۷۰- درجه ی سانتی گراد نگهداری شد. بعد از سانتریفیوژ در دمای ۴ درجه سانتی گراد، به رسوب حاصل اتانول ۷۰٪ اضافه شد و مجدداً محلول در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ گردید. رسوب حاصل در دمای آزمایشگاه خشک و به آن بافر TE اضافه شد. سپس برای حذف RNA احتمالی، آنزیم RNase A به محلول اضافه و به مدت ۱ ساعت در۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

پس از این مرحله طراحی پرایمر (فرادست: 5-AATTTACAGTGGCACATTAGGTCCC-3 و فرودست 5-GCAGAGATACCAGCAGAGATACACG-3) و پروب (Biotin- 5'- ATGGTTGGTGTAGTAGGCGC- 3') برای ژن *gltA* که اختصاصی اسینتوباکتر بومانی می باشد، انجام گرفت (۱۷). قسمت حفظ شده این ژن به وسیله Multiple Sequence Alignments با استفاده از BLAST بررسی شد و پرایمرها با استفاده از سرور

Primer 3 plus طراحی شدند. همچنین پروب بیوتینیله مکمل بخشی از سکانس داخلی ژن، به کمک نرم افزارهای بیوانفورماتیک طراحی و برای سنتز به شرکت ژن فن آوران سفارش داده شد.

واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر تهیه شد که شامل ۲ میکرولیتر DNA الگو، ۱ میکرولیتر کلرید منیزیم، ۱ میکرولیتر dNTP، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR 10X، ۰/۵ میکرولیتر معادل یک یونیت آنزیم Taq DNA Polymerase پلیمراز، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر و ۱۶ میکرولیتر آب مقطر دو بار استریل (DDW) بود. جدول شماره ۲ مقادیر واکنش PCR را نشان می دهد. PCR قطعه مورد نظر در ۳۰ سیکل انجام شد که زمان بندی آن به صورت ۱ دقیقه زمان واسرشت در ۹۵ سانتی گراد، ۱ دقیقه زمان اتصال در ۵۵ سانتی گراد و ۱ دقیقه زمان طویل شدن در ۷۲ سانتی گراد بود. جدول شماره ۳ زمان بندی مراحل PCR که قطعه ۷۲۲ جفت بازی را تکثیر می کند، نشان می دهد. جهت بررسی محصول PCR از الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ در بافر TBE استفاده شد. (برای تهیه ی ۲۵۰ میلی لیتر بافر TBE، ۲۵ گرم تریس باز با ۱۳/۷۵ گرم بوریک اسید و ۱۰ میلی لیتر EDTA ی ۰/۵ میلی مولار با PH=۸ مخلوط گردید و سپس حجم آن با آب مقطر دو بار تقطیر به ۲۵۰ میلی لیتر رسانده شد. محلول حاضر 10X بوده و برای مصرف به نسبت ۱ به ۹ رقیق گردید).

برای بررسی حساسیت پرایمرهای طراحی شده از ژنوم سریال رقت ۱/۲ تا ۱/۲۵۶ تهیه شد. بدین صورت که ۲ میکرولیتر از نمونه مثبت با ۲ میکرولیتر آب مقطر تزریقی مخلوط گردید و از مخلوط حاصل به عنوان رقت ۱/۲ استفاده شد. سپس از رقت ۱/۲، ۲ میکرولیتر برداشته، با ۲ میکرولیتر آب مقطر تزریقی مخلوط کرده و رقت ۱/۴ به دست آمد. این کار تا رقت ۱/۲۵۶ تکرار شد. سپس واکنش PCR طبق دستورالعمل فوق انجام گرفت و محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱٪ ارزیابی گردید.

سپس برای بررسی اختصاصی بودن پرایمرهای طراحی شده، واکنش PCR با ژنوم تخلیص شده از باکتری های خانواده موراکسلاسه انجام شد. سپس محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱٪ ارزیابی شد.

برای انجام واکنش PCR-ELISA ابتدا ۳ میکرولیتر (۳ میکروگرم) استرپتواویدین با ۹۷ میکرولیتر بافر پوششی به چاهک A، ۰/۰۰۶۲ میکروگرم محصول PCR نشاندار شده با دیگوکسی ژنین با ۹۵ میکرولیتر بافر پوششی در چاهک B، ۰/۰۰۳۷ میکروگرم محصول PCR عادی (غیر نشاندار) با ۹۷ میکرولیتر بافر پوششی در چاهک C و D (چاهک D بدون آنتی بادی) و ۱۰۰ میکرولیتر بافر پوششی (Ag-) به چاهک E اضافه و به مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. سپس چاهک ها ۳ بار با PBST (فسفات سالین حاوی توئین ۲۰٪) شستشو داده شد. در مرحله بعد به همه چاهک ها ۱۰۰ میکرولیتر Blocking buffer اضافه و ۱ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شد. مجدداً چاهک ها با PBST ۳ بار شستشو داده شد. همزمان با مرحله بلاکینگ، ۵ میکرولیتر از محصول نشاندار شده با DIG (Digoxigenin) در ۹۵ میکرولیتر بافر دو رگه سازی SSC 1X ریخته و به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده و ۵ دقیقه روی یخ قرار داده شد. سپس ۱۰ میکرولیتر پروب بیوتینه ۲۰ پیکومول به آن اضافه گردید و ۱ ساعت در ۵۹ درجه سانتی گراد قرار داده شد. سپس این مخلوط به چاهک A اضافه و ۱ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. بعد از ۳ بار شستشو با PBST، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر آنتی بادی ضد DIG نشاندار با پر اکسیداز با رقت ۱/۲۰۰۰ به همه چاهک ها به جز D اضافه و ۱ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شد. پس از شستشوی مجدد با PBST، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول سوبسترا شامل ۴ میلی گرم OPD در ۱ میلی لیتر بافر سیترات فسفات به همراه ۱۰ میکرولیتر آب اکسیژنه ۳۰٪ به چاهک ها اضافه گردید و ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار داده شد. برای توقف واکنش از

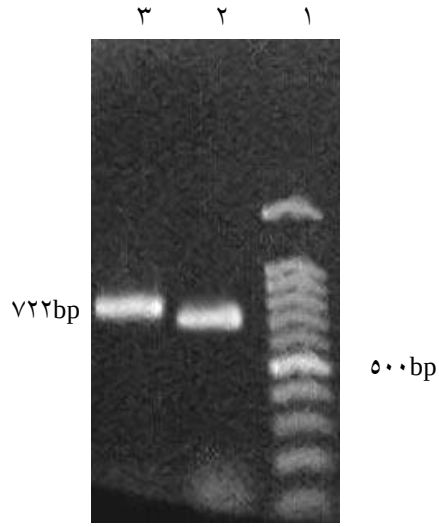
۱۰۰ میکرولیتر اسید سولفوریک ۲/۵ مولار استفاده شد. سپس جذب نوری در طول موج ۴۹۲ نانومتر با دستگاه ELISA Reader (DYNEX Technologies) خوانده شد.

برای بررسی حساسیت روش PCR-ELISA از محصول PCR ژن *gltA* نشاندار، پس از تعیین غلظت با استفاده از جذب نوری در ۲۶۰ نانومتر، سریال رقت از ۱/۲ تا ۱/۱۲۸ تهیه شد و جهت تعیین حساسیت با روش PCR-ELISA مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها:

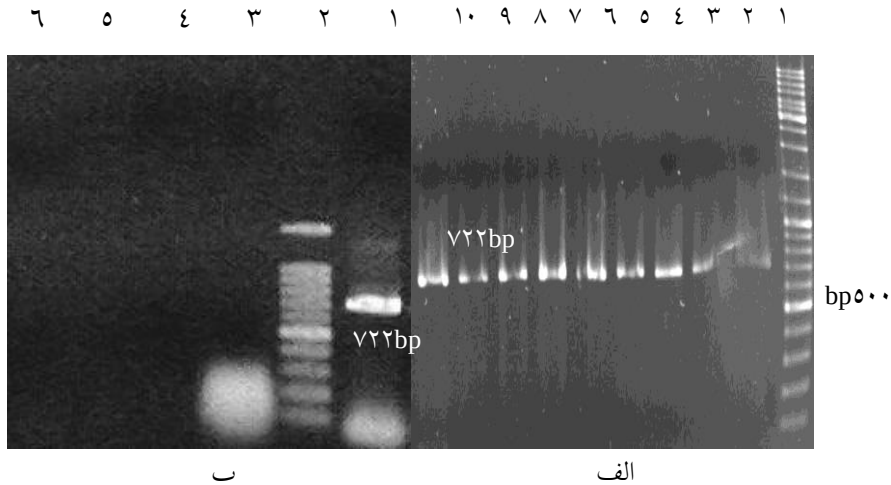
DNA ژنومی باکتری با دو روش Boiling و CTAB استخراج گردید. مقدار غلظت DNA تخلیص شده در طول موج ۲۶۰ نانومتر در دستگاه نانو دراپ ۱۲۴۵ نانوگرم بر میکرولیتر محاسبه شد.

جهت واکنش PCR یک جفت پرایمر جهت تکثیر ژن *gltA* انتخاب گردید که با بهینه سازی واکنش PCR منجر به تکثیر قطعه bp ۷۲۲ ژن مورد نظر شد. در واکنش PCR-ELISA جهت شناسایی محصول PCR و به منظور تأیید ژن تکثیر یافته، با کمک نرم افزارهای بیوانفورماتیک، پروب مناسب برای توالی داخل ژن طراحی گردید (تصویر شماره ۱).



تصویر شماره ۱: ژل آگارز مربوط به محصول PCR ژن *gltA*

*ستون ۱) نشانگر اندازه **DNA** (**100bp Ladder**)؛ ستون ۲) محصول واکنش **PCR** ژن **gltA** ستون ۳) محصول واکنش **PCR** نشاندار شده با دیگوکسی ژنین.*

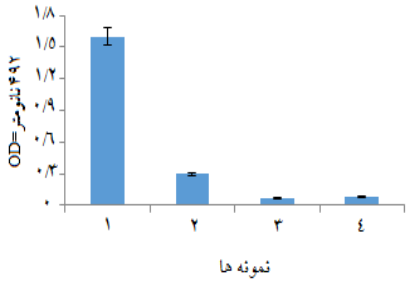


تصویر شماره ۲: تعیین حساسیت و اختصاصیت واکنش PCR

*الف) تعیین حساسیت واکنش **PCR**: ۱) نمونه رقیق نشده، ۲ تا ۹) به ترتیب رقت ۱/۲ (غلظت ۳۲۵ نانوگرم بر میکرولیتر) تا رقت ۱/۲۵۶ (غلظت ۲/۵ نانوگرم بر میکرولیتر)، ۱۰) نشانگر اندازه **DNA** (**Mix Ladder bp**)؛ ب) بررسی اختصاصیت واکنش **PCR**: ۱) اسینتوباکتر بومانی، ۲) نشانگر اندازه **DNA** (**100bp Ladder**)، ۳) کنترل منفی، ٤) اشرشیاکلی، ٥) شیگلا، ٦) کلبسیلا.*

تصویر شماره ۲ الف، واکنش PCR سریال رقت، بررسی حساسیت پرایمرها را نشان می دهد. سریال رقت از ۱/۲ (غلظت ۳۲۵ نانوگرم بر میکرولیتر) تا ۱/۲۵۶ (غلظت ۲/۵ نانوگرم بر میکرولیتر) تهیه گردید. نتایج بررسی اختصاصیت واکنش PCR نشان دهنده اختصاصی بودن پرایمرهای طراحی شده بود، به طوری که برای باکتری ها تست شده در آزمایشگاه (*اشرشیاکلی*، *شیگلا*، *کلبسیلا*) هیچ باندی بر روی ژل آگارز مشاهده نشد (تصویر شماره ۲ ب). سپس نتایج محصول PCR با الایزا بررسی شد. جذب نوری اسینتوباکتر بومانی بیش از حد مقادیر کنترل های واکنش بود، در حالی که برای سایر باکتری ها کمتر از مقادیر کنترل به دست آمد.

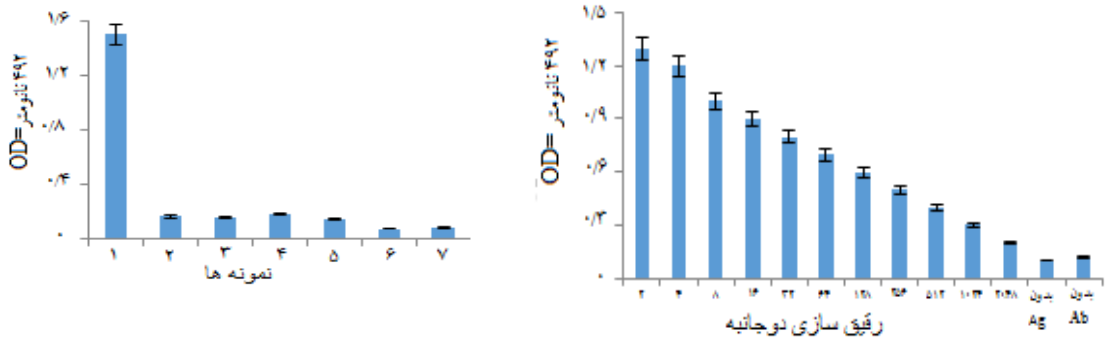
پس از نشاندار نمودن محصولات PCR حاصل از ژن *gltA*، آزمایش الایزا انجام گرفت و جذب آن در ۴۹۲ نانومتر قرائت گردید. میزان OD قرائت شده محصول PCR نشاندار شده ژن برابر یک بوده که این میزان OD قرائت شده در حد قابل قبولی بود. نتایج در تصویر شماره ۳ ارائه شده است.



تصویر شماره ۳: آشکارسازی پلیت های میکروتیتر حاوی PBS

*۱) محصول **PCR** نشانگذاری شده با **DIG-Dutp**؛ ۲) محصول **PCR** نشانگذاری نشده؛ ۳) کنترل بدون **Ag**؛ ٤) کنترل بدون **Ab***

برای بررسی حساسیت روش PCR-ELISA و تعیین حداقل غلظت DNA ژنومی توسط این تکنیک، از DNA ژنوم، سریال رقت تهیه و با استفاده از روش PCR-ELISA مورد ارزیابی قرار گرفت (تصویر شماره ۴الف).



الف ب

تصویر شماره ۴: تعیین حساسیت و اختصاصیت روش PCR-ELISA

*الف) تعیین حساسیت روش **PCR-ELISA** ۲) رقت ۱/۲ (غلظت ۳۲۵ نانوگرم بر میکرولیتر)؛ ٤) رقت ۱/٤ (غلظت ۱٦۲/۵ نانوگرم بر میکرولیتر)؛ ۸) رقت ۱/۸ (غلظت ۸۱ نانوگرم بر میکرولیتر)؛ ۱٦) رقت ۱/۱٦ (غلظت ٤۰/٦ نانوگرم بر میکرولیتر)؛ ۳۲) رقت ۱/۳۲ (غلظت ۲۰/۳ نانوگرم بر میکرولیتر)؛ ٦٤) رقت ۱/٦٤ (غلظت ۱۰/۱ نانوگرم بر میکرولیتر)؛ ۱۲۸) رقت ۱/۱۲۸ (غلظت ۵ نانوگرم بر میکرولیتر)؛ ۲۵٦) رقت ۱/۲۵٦ (غلظت ۲/۵ نانوگرم بر میکرولیتر)؛ ۵۱۲) رقت ۱/۵۱۲ (غلظت ۱/۲٦ نانوگرم بر میکرولیتر)؛ ۱۰۲٤) رقت ۱/۱۰۲٤ (غلظت ۰/٦۳٤ نانوگرم بر میکرولیتر)؛ ۲۰٤۸) رقت ۱/۲۰٤۸ (غلظت ۰/۳۱۷ نانوگرم بر میکرولیتر)؛ – فاقد آنتی ژن؛ – فاقد آنتی بادی. ب) تعیین اختصاصیت روش **PCR-ELISA** ۱) اسینتوباکتر بومانی، ۲) کنترل منفی، ۳) اشرشیاکلی، ٤) شیگلا، ۵) کلبسیلا، ٦) کنترل فاقد آنتی ژن، ۷) کنترل فاقد آنتی بادی.*

نتایج به دست آمده در تصویر شماره ۴ الف نشان دهنده معنی دار و قابل قبول بودن جواب ها در OD=۰/۳ برابر با رقت ۱/۱۰۲۴ (غلظت ۰/۶۳۴ نانوگرم بر میکرولیتر) می باشد؛ همچنین نتایج بررسی اختصاصیت روش PCR-ELISA نشان دهنده ی اختصاصی بودن پرایمرهای طراحی شده بود، به طوری که برای سایر باکتری ها هیچ باندی بر روی ژل آگارز مشاهده نشد (تصویر شماره ۴ ب). سپس نتایج به دست آمده با روش PCR-ELISA به صورت نمودار زیر حاصل شد. OD نمونه ی اسینتوباکتر بومانی بیش از حد مقادیر کنترل های واکنش بود، در حالی که جذب نوری برای باکتری های دیگر کمتر از کنترل واکنش بود.

بحث:

بسیاری از بیماری های خطرناک و کشنده انسان، از طریق عفونت های بیمارستانی به دنبال جراحی، ضعف سیستم ایمنی افراد، جراحات در بیمارستان، احتمال آلودگی و عفونت های ثانویه با باکتری های بیماری زای فرصت طلب، افزایش می یابد (۱۸). اسینتوباکتر بومانی یک پاتوژن فرصت طلب بیمارستانی است که در بخش مراقبت های ویژه باعث بروز عفونت های شدید می شود (۲،۱). به علت مقاومت دارویی این باکتری، مشکلات بزرگی در درمان بیماران به وجود آمده است (۲۰-۱۸). به طوری که علاوه بر اثرات نامطلوب بالینی موجب افزایش هزینه های درمانی شده است (۲۱). روش های متداولی که جهت شناسایی این میکروارگانیسم به کار برده می شوند شامل روش های کشت باکتری، بیو شیمیایی و ایمونولوژیک می باشند که این روش ها عمدتاً زمان بر هستند، به طوری که متوسط در حدود ۳ روز زمان نیاز دارند (۲۲). روش های تشخیصی زیادی بر پایه مولکولی برای باکتری ها وجود دارد از جمله: PCR، Multiplex PCR و Real Time PCR که هر کدام دارای مزایا و معایبی می باشند (۲۳). در این تحقیق با استفاده از روش PCR-ELISA سعی در برطرف نمودن بسیاری از معایب روش های دیگر از قبیل زمان بر بودن، محدودیت در بررسی همزمان تعداد نمونه های بالا و کار با مواد سرطان زا صورت گرفته است. تکنیک PCR-ELISA همچنین سرعت و اختصاصیت قابل قبولی را در تشخیص مقادیر اندک توالی های اختصاصی ژن فراهم آورده است (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱: مقایسه بین سه روش تشخیص PCR، PCR-ELISA و qPCR

مقایسه	PCR	PCR-ELISA	qPCR
مواد مورد نیاز	تجهیزات استاندارد آزمایشگاه	تجهیزات استاندارد آزمایشگاه	نیاز به تجهیزات فلورسانس
هزینه مواد	پایین	متوسط	بالا
حد تشخیص	۱۰-۱ نانوگرم بر میکرولیتر	۰/۰۱ نانوگرم بر میکرولیتر	۰/۲۵ نانوگرم بر میکرولیتر
توانایی کمی شدن	خیر	نیمه کمی	کمی

عدم نیاز به دستگاه ژل داکت، اتاق تاریک، امکان آلودگی کم نسبت به روش های لکه گذاری ساترن و عدم استفاده از مواد گران قیمت که در روش Real-time به کار می روند، از دیگر محاسن این تکنیک محسوب می شوند. از آنجا که این روش در مدت زمان کوتاه قابل اجرا می باشد، روشی نسبتاً سریع بوده و به راحتی هم استاندارد می گردد، در ضمن ریسک آلودگی برای پرسنل آزمایشگاه کاهش می یابد.

Chiang و همکاران برای اولین بار همانند عفونت های ریوی ناشی از اسینتو باکتر بومانی از روش PCR جهت شناسایی این باکتری در تراشه های حلق ۱۱۴ بیمار بستری در بخش مراقبت های ویژه استفاده کردند. نتایج این بررسی مجدداً حساسیت ۱۰۰ درصدی این روش را در تشخیص سریع اسینتو باکتر بومانی نشان داد (۲۴). Nomanpour و همکاران برای شناسایی اسینتوباکتر بومانی در نمونه های تنفسی ۳۶۱ بیمار مبتلا به ذات الریه، تکنیک Taqman RT-PCR را بر پایه توالی ژن bla oxa-51 طراحی کردند که اختصاصی باکتری فوق می باشد (۲۶،۲۵). هدف آن ها از این مطالعه، ایجاد یک روش سریع و حساس برای شناسایی مستقیم اسینتو باکتر بومانی در نمونه های تنفسی بود.

نتایج بررسی های Nomanpour و همکاران نشان داد که RT-PCR یک روش سریع و حساس برای تشخیص می باشد. البته باید متذکر گردید که روش RT-PCR در مقایسه با روش PCR معمولی به زمان بیشتری نیاز دارد، همچنین PCR به دلیل آلودگی و جواب های مثبت و منفی کاذب حساسیت و اختصاصیت کمتری در مقایسه با RT-PCR دارد (۲۵). همان طور که در جدول شماره ۱ توضیح داده شده است روش PCR اگرچه روشی ارزان است و می توان به طور ساده آن را در بسیاری از آزمایشگاه های تشخیصی استفاده نمود، اما کمی نبودن نتایج که خصوصاً در تشخیص اولیه عفونت های باکتریایی دارای اهمیت است و نیز پایین بودن نسبی حساسیت آن نسبت به دیگر روش های مبتنی بر تکثیر ژن، از معایب آن است. از طرفی RT-PCR روشی کاملاً حساس و کمی است، اما از مهم ترین معایب آن هزینه های بالای انجام آن و نیاز به داشتن آزمایشگاه ویژه است که در همه نقاط نمی تواند به عنوان یک روش آزمایشگاهی ساده استانداردسازی و مورد بهره برداری قرار گیرد. همان طور که در جدول هم به آن اشاره شده است، حساسیت این روش نسبت به PCR معمولی در حدود ۱۰۰ برابر است و از طرفی به عنوان یک روش کمی نیز می تواند مورد استفاده قرار گیرد. همچنین در مقایسه با RT-PCR می توان آن را در بسیاری از آزمایشگاه های تشخیص با هزینه قابل قبولی اجرایی نمود. بر این اساس در سال های اخیر محققان بسیاری از تکنیک PCR-ELISA برای شناسایی برخی باکتری ها استفاده نموده اند.

به عنوان مثال Gomes و همکاران برای تشخیص شیستوزومیازیس از روش PCR-ELISA استفاده کردند (۲۱). محققین برای تشخیص مستقیم سودوموناس آئروجنوزا از کشت خون از این تکنیک نمودند (۲۷). در این مطالعه نیز برای اولین بار شناسایی اسینتوباکتر بومانی با استفاده ار روش PCR-ELISA مورد ارزیابی قرار گرفته است. این مطالعه نشان داد که می توان ژنوم این باکتری را در حد ۳۰۰ فمتوگرم در میکرولیتر مورد شناسایی قرار داد که نسبت به روش PCR حساسیت بسیار بالایی را نشان می دهد. همچنین با توجه به عدم شناسایی ژنوم باکتری های دیگر که در این مطالعه به عنوان کنترل مورد استفاده قرار گرفته بودند اختصاصیت پرایمرهای طراحی شده و همچنین روش فوق مورد تأیید قرار گرفت.

نتیجه گیری:

در مقایسه با روش های تشخیصی که توسط دیگر محققان انجام شده است، نتایج این بررسی نشان داد که حساسیت روش PCR-ELISA برای شناسایی اسینتوباکتر بومانی به مراتب بسیار بیشتر است، به طوری که قادر است تعداد نسخه اندکی از DNA هدف را تشخیص دهد. استفاده از پرایمرهایی که بر اساس ژن *gltA* طراحی شده اند، کارایی بالایی در تشخیص اسینتوباکتر بومانی با روش PCR-ELISA دارند، زیرا این ژن در همه اسینتوباکتر بومانی ها وجود دارد (میزان بروز بالایی دارد). طبق نتایج به دست آمده، استفاده از ژن *gltA* جهت طراحی پرایمر باعث اختصاصی شدن روش PCR-ELISA نیز شده است، به طوری که سویه های دیگر باکتری های مورد ارزیابی با استفاده از این آغازگرها قابل تشخیص نیستند. همچنین به دلیل استفاده از پروب، اختصاصیت این تکنیک به میزان بسیار زیادی افزایش یافته است.

تشکر و قدردانی:

این تحقیق حاصل پایان نامه مصوب در تاریخ ۱۳۹۲ بوده و بدینوسیله از مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی برای تأمین منابع مالی، امکانات آزمایشگاهی و شرایط انجام این تحقیق سپاسگزاری می شود.

منابع:

1. Brenner F, Villar R, Angulo F, Tauxe R, Swaminathan B. Salmonella nomenclature. J Clin Microbiol. 2000;38(7):2465-7.
2. Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H. An increasing threat in hospitals: Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Nat Rev Microbiol. 2007; 5(12): 939-51.
3. Khosrishahi N, Sharifi M. Isolation of carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* (CRAB) strains from patients and equipments of Intensive care units (ICUs) at Qazvin between 2005-2006. Iran J Med Microbiol. 2007;1(3): 33-8.
4. Qi C, Scheetz MH, Malczynski M. Characterization of *Acinetobacter baumannii* genotypes recovered from patients with repeated colonization or infection. Diagn Microbiol Infect Dis. 2009; 65(1): 1-6.
5. Glew RH, Moellering RC, Jr., Kunz LJ. Infections with *Acinetobacter calcoaceticus* (Herellea vaginicola): Clinical and laboratory studies. Medicine. 1977; 56(2): 79-97.
6. Visca P, Seifert H, Towner KJ. Acinetobacter infection: An emerging threat to human health. IUBMB Life. 2011; 63(12): 1048-54.
7. Nemec A, Krizova L, Maixnerova M, Sedo O, Brisse S, Higgins PG. Acinetobacter seifertii sp. nov., a member of the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex isolated from human clinical specimens. Int J Syst Evol Microbiol. 2015; 65(Pt 3): 934-42.
8. Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, et al. Real-time PCR in clinical microbiology: Applications for routine laboratory testing. Clin Microbiol Rev. 2006; 19(1): 165-256.
9. Tsakris A, Poulou A, Pournaras S, Voulgari E, Vrioni G, Themeli-Digalaki K, et al. A simple phenotypic method for the differentiation of metallo-beta-lactamases and class A KPC carbapenemases in Enterobacteriaceae clinical isolates. J Antimicrob Chemother. 2010; 65(8): 1664-71.
10. Tornieporth NG, John J, Salgado K, de Jesus P, Latham E, Melo MC, et al. Differentiation of pathogenic Escherichia coli strains in Brazilian children by PCR. J Clin Microbiol. 1995; 33(5): 1371-4.
11. Zarrilli R, Crispino M, Bagattini M, Barretta E, Di Popolo A, Triassi M, et al. Molecular epidemiology of sequential outbreaks of *Acinetobacter baumannii* in an intensive care unit shows the emergence of carbapenem resistance. J Clin Microbiol. 2004; 42(3): 946-53.
12. Ataee R, Mehrabi Tavana A, Safiri Z, Karami A, Izadi M, Hossaini M. Advatages of Rapid diagnosis of BacterialMeningitis By PCR in compare with Direct Microscopy and culture. Iran J Med Microbiol. 2007; 1(1): 61-6.
13. Figueroa-Bossi N, Bossi L. Inducible prophages contribute to Salmonella virulence in mice. Mol Microbiol. 1999; 33(1): 167-76.
14. Weile J, Knabbe C. Current applications and future trends of molecular diagnostics in clinical bacteriology. Anal Bioanal Chem. 2009; 394(3): 731-42.
15. Eikmanns BJ, Thum-Schmitz N, Eggeling L, Ludtke KU, Sahm H. Nucleotide sequence, expression and transcriptional analysis of the Corynebacterium glutamicum gltA gene encoding citrate synthase. Microbiology. 1994; 140 (Pt 8): 1817-28.
16. Roux V, Rydkina E, Eremeeva M, Raoult D. Citrate synthase gene comparison, a new tool for phylogenetic analysis, and its application for the rickettsiae. Int J Syst Bacteriol. 1997; 47(2): 252-61.
17. Speers DJ. Clinical applications of molecular biology for infectious diseases. Clin Biochem Rev. 2006; 27(1): 39-51.

18. Kurupati P, Kumarasinghe G, Laa Poh C. Direct identification of Pseudomonas aeruginosa from blood culture bottles by PCR-enzyme linked immunosorbent assay using oprI gene specific primers. Mol Cell Probes. 2005; 19(6): 417-21.
19. Curtis LT. Prevention of hospital-acquired infections: Review of non-pharmacological interventions. J Hosp Infect. 2008; 69(3): 204-19.
20. Lagamayo EN. Antimicrobial resistance in major pathogens of hospital-acquired pneumonia in Asian countries. Am J Infect Control. 2008; 36(4 Suppl): S101-8.
21. Gomes LI, Dos Santos Marques LH, Enk MJ, de Oliveira MC, Coelho PM, Rabello A. Development and evaluation of a sensitive PCR-ELISA system for detection of schistosoma infection in feces. PLoS Negl Trop Dis. 2010; 4(4): e664.
22. Coelho J, Woodford N, Turton J, Livermore DM. Multiresistant acinetobacter in the UK: How big a threat? J Hosp Infect. 2004; 58(3): 167-9.
23. Guerrieri E, Bondi M, Sabia C, de Niederhausern S, Borella P, Messi P. Effect of bacterial interference on biofilm development by Legionella pneumophila. Curr Microbiol. 2008; 57(6): 532-6.
24. Chiang MC, Kuo SC, Chen YC, Lee YT, Chen TL, Fung CP. Polymerase chain reaction assay for the detection of *Acinetobacter baumannii* in endotracheal aspirates from patients in the intensive care unit. J Microbiol Immunol Infect. 2011; 44(2): 106-10.
25. Nomanpour B, Ghodousi A, Babaei A, Abtahi H, Tabrizi M, Feizabadi M. Rapid, cost-effective, sensitive and quantitative detection of *Acinetobacter baumannii* from pneumonia patients. Iran J Microbiol. 2011; 3(4): 162-9.
26. Parvizi P, Ready PD. Nested PCRs and sequencing of nuclear ITS-rDNA fragments detect three Leishmania species of gerbils in sandflies from Iranian foci of zoonotic cutaneous leishmaniasis. Trop Med Int Health. 2008; 13(9): 1159-71.
27. Kumar A, Arora V, Bashamboo A, Ali S. Detection of Salmonella typhi by polymerase chain reaction: implications in diagnosis of typhoid fever. Infect Genet Evol. 2002; 2(2): 107-10.

Journal of Shahrekord University of Medical Sciences
(J Shahrekord Univ Med Sci) 2017; 19(2): 6-16. ***Original article***

Detection of *Acinetobacter baumannii* by PCR-ELISA method

Amini Rad S[1,2], Amani J[2]*, Imani Fooladi AA[2], Saeedi P[3], Moosazadeh Moghadam M[3]
[1]Student, Biology Dept., Zanjan Branch, Zanjan Azad University, Zanjan, I.R. Iran;[2] Applied Microbiology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, I.R. Iran;
[3]Student, Applied Microbiology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, I.R. Iran.
Received: 13/Feb/2016 Accepted: 6/Aug/2016

Background and aims: *AcinetobacterBaumannii* causes infections such as respiratory tract, urinary tract and blood and wounds infections; especially in intensive care units around the world and it has ability to acquire drug resistance. In order to recognize and track the treatment of these infections, techniques should continuously be modified. Up to now the investigation has not done on the identification and isolation of the bacteria in clinical samples by PCR-ELISA method in Iran, this study was performed to isolate *Acinetobacterbaumannii* by PCR-ELISA method.
Methods: In this study, standard strains were evaluated using specific primers and probes by PCR-ELISA method. After amplification and labeling *gltA* gene, labeled products were coated in micro plates and detected using antibodies against digoxigenin conjugated with peroxidase.
Results: The results of PCR-ELISA method showed that 722 bp fragment from conserved *gltA* gene. This method is a rapid and sensitive method for the detection of bacteria by using specific primer and probs.
Conclusion: The results indicated that PCR-ELISA possesses a greater sensitivity faster in comparison with conventional PCR. This technique also facilitates the investigation more samples easily and the risk of applying this methods is lower than conventional PCR.

***Key words: Acinetobacter baumannii, gltA* gene, PCR-ELISA.**

Cite this article as: Amini Rad S, Amani J, Imani Fooladi AA, Saeedi P, Moosazadeh Moghadam M. Detection of *Acinetobacter baumannii* by PCR-ELISA method. J Shahrekord Univ Med Sci. 2017; 19(2): 6-16.

*Corresponding author:
Applied Microbiology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, I.R. Iran; Tel: 00989124066964, E-mail: jafar.amani@gmail.com