

ارزیابی روش ذوب DNA مبتنی بر Real-time PCR جهت تشخیص انتروکوک فکالایس و انتروکوک فاسیوم در ایزوله های بالینی

بهروز زینی (MSc)^۱، محمدرضا عربستانی (PhD)^۱، رسول یوسفی مشعوف (PhD)^{۱*}، حامد طهماسبی (MSc)^۲

۱- گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان

۲- گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان

دریافت: ۹۵/۷/۲۸، اصلاح: ۹۵/۹/۶، پذیرش: ۹۵/۱۰/۲۶

خلاصه

سابقه و هدف: کندی و خطای انسانی در روش های معمول جهت تشخیص دو گونه انتروکوک فکالایس و انتروکوک فاسیوم که جزء مهمترین گونه های بیمارزا در انسان می باشند، وجود روشهای دقیقتر را ضروری کرده است. هدف از این مطالعه طراحی روشی دقیق و سریع با استفاده از تکنیک ذوب DNA با روش Real Time PCR جهت شناسایی و تفکیک این دو گونه از یکدیگر در ایزوله های بالینی می باشد.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی از ایزوله های موجود در بانک باکتریایی گروه میکروب شناسی دانشگاه علوم پزشکی همدان استفاده شد. طراحی پرایمرها با استفاده از نرم افزارهای اختصاصی و انتخاب ژن های *divIVA* برای تشخیص انتروکوک فکالایس و *Alanine racemase* برای تشخیص انتروکوک فاسیوم انجام شد. تشخیص ایزوله ها، با بکارگیری روش Real Time PCR و معیار قراردادن دمای ذوب DNA، مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته ها: حساسیت پرایمرهای طراحی شده برای ژنهای *divIVA* (اختصاصی انتروکوک فکالایس) و *Alanine racemase* (اختصاصی انتروکوک فاسیوم) ۱۵ CFU/ml باکتری بودند. اختصاصیت پرایمرهای طراحی شده با استفاده از آنالیز منحنی ذوب دمایی جهت شناسایی انتروکوک فکالایس ۶/۷۶ درجه سانتی گراد و جهت شناسایی انتروکوک فاسیوم ۹۳/۸۰ درجه سانتی گراد بود که در مقایسه با ارگانیزم های دیگر اختلاف قابل توجهی را نشان داد.

نتیجه گیری: بر اساس این مطالعه، پرایمرهای طراحی شده دارای حساسیت و اختصاصیت مناسبی جهت تشخیص و افتراق گونه های انتروکوک فاسیوم و انتروکوک فکالایس بودند. **کلمات کلیدی:** انتروکوک فکالایس، انتروکوک فاسیوم، Real-Time PCR.

مقدمه

انتروکوک ها کوکسی های گرم مثبتی می باشند که قادرند عفونتهای اندوکاردیت، ادراری، عفونت های خونی، مننژیت، عفونت های وابسته به نوزادان و عفونت های داخل شکمی و لگنی را ایجاد کنند (۱). در خانواده انتروکوک ها حداقل ۱۲ گونه باکتری وجود دارد که شیوع دو گونه بیماری زای انتروکوک فکالایس با بیش از ۷۰ درصد و انتروکوک فاسیوم با بیش از ۱۵ درصد، انتروکوک های جدا شده از انسان را تشکیل می دهند (۲). انتروکوک فکالایس یکی از مهمترین عوامل ایجاد کننده عفونت های بیمارستانی در سراسر جهان می باشد که دخالت اصلی این باکتری در بروز انتروکوک، اهمیت بالایی به این باکتری بخشیده است (۳). انتروکوک فاسیوم گرچه سهم کمتری را نسبت به انتروکوک فکالایس در بیماری زایی به خود اختصاص داده است (۳و۴). در عفونت های انتروکوک به ویژه در بیماران با کاتترهای ادراری یا داخل وریدی و در بیماران که برای مدت طولانی در بیمارستان بستری شده اند و آنتی بیوتیک وسیع الطیف دریافت کرده اند شایع می باشد (۵و۶). توانایی بالقوه این باکتری ها در انتقال مقاومت های آنتی بیوتیکی از طریق جهش یا دریافت عوامل ژنتیکی خارجی مثل پلاسمید یا ترانسپوزون، انتروکوک ها را به یک عامل جدی در بروز عفونت های مقاوم در سایر گونه های باکتریایی تبدیل کرده است (۷-۹). از رایج ترین روش ها

جهت تشخیص گونه های مختلف انتروکوک می توان به تست های بیوشیمیایی مبتنی بر مصرف قندها، کشت در محیط کشت های اختصاصی مانند Skim Milk Agar و یا استفاده از سیستم های تشخیص تجاری اشاره کرد (۳). چنین روش هایی از نظر زمان، پیچیدگی و همچنین بروز خطا در تشخیص اختصاصی سویه ها دچار مشکل هستند (۳) لذا تلاش برای تشخیص این باکتری بر مبنای روش های PCR برای توالی اختصاصی باکتری معطوف شده است (۱۰). در روش های مولکولی با هدف قرار دادن ژن های خاصی از باکتری بعنوان سایت هدف و طراحی پرایمرهای اختصاصی جهت شناسایی این ژن ها، می توان با حساسیت و اختصاصیت مناسبی گونه های باکتریایی را تشخیص داد (۱۱). یکی از این تست ها که از حساس ترین روش ها برای تشخیص سریع این باکتری هست، آنالیز نمودار ذوب DNA یا Melting Curve Analysis بواسطه تکنیک Real Time PCR می باشد (۱۲). در این تست تشخیص دقیق بر مبنای رابطه بین دما و محدوده دنا توره شدن DNA، استوار شده است. دنا توره شدن DNA با افزایش دما، منحنی ذوب را که معمولاً به شکل سیگموئید است، مشخص می کند (۱۳). برای ردیابی گونه های انتروکوک فکالایس و انتروکوک فاسیوم می توان با استفاده از ژن های اختصاصی که در مسیرهای ویژه ای فعالیت

این مقاله حاصل بخشی از پایان نامه بهروز زینی دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب شناسی و طرح تحقیقاتی با شماره ۹۳۱۲۲۶۱۹ دانشگاه علوم پزشکی همدان می باشد.

* مسئول مقاله: دکتر رسول یوسفی مشعوف

آدرس: همدان، خیابان مهدیه، دانشگاه علوم پزشکی، گروه میکروب شناسی. تلفن: ۰۸۱-۳۵۵۰۱۸۲

E-mail: yousefimash@yahoo.com

استخراج DNA ژنومی: استخراج DNA با استفاده از روش Boiling انجام گرفت. بدین ترتیب که یک کلنی از هر سویه باکتری در ۱۰۰ میکرولیتر محلول PBS استریل ورتکس شده به مدت ۱۵ دقیقه جوشانده شد. پس از سانتریفوژ نهایی، مایع رویی بعنوان DNA مورد استفاده قرار گرفت. غلظت و چگالی نوری DNA تخلیص شده در طول موجهای ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ (USA, BioRad) ND-1000 تعیین گردید (۱۵).

واکنش PCR: برای انجام واکنش PCR برای هر نمونه ۱۲ لاند از مستر میکس قرمز (Ampliqon آلمان) (شامل، Tris-Hcl PH8.5, (NH4)SO4، unit Ampliqon 2/0.4/ mMdNTP 4.3mMMgcl2, 0/2% Tween20 Insert red dye and stabilizer, polymeras) با ۱ لاند از DNA استخراج شده و ۱ لاند از هر پرایمر به غلظت ۱۰ پیکومولار داخل میکروتیوبهای RNAas/DNAas Free ۰/۲ (BioFil کره جنوبی) ریخته شد و برای رساندن حجم نهایی به ۲۵ لاند به آن آب مقطر اضافه گردید. برای تکثیر ژنهای مورد نظر از دستگاه ترموسایکلر Eppendorf (آلمان) با تنظیمات سیکل دمایی بصورت شوک حرارتی °C ۹۴ ۶۰ ثانیه و تعداد ۲۵ سیکل بصورت °C ۹۴ ۳۰ ثانیه و °C ۷۲ ۳۰ ثانیه اعمال شد، دمای آلنیک برای ژن *Alanine racemase* °C ۵۹ برای ژن *divIVA* °C ۵۹ هر دو بمدت ۶۰ ثانیه تعیین شد. طولیل شدن نهایی هم در °C ۷۲ بمدت ۷ دقیقه در نظر گرفته شد.

الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵ درصد: محصولات PCR توسط الکتروفورز با استفاده از ژل ۱/۵ درصد آگارز از یکدیگر جدا شدند به این صورت که ۵ میکرولیتر از محصول نهایی PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد در بافر X ۰/۵ الکتروفورز گردید. برای رنگ دهی به ژل، به آن ۲ میکرولیتر محلول Gel Red Biotium (آمریکا) اضافه و خوب هم زده شد.

برای تعیین اندازه محصولات از نشانگر (Marker) مولکولی فرمنتاز (Thermofisher دانمارک) با توالی ۱۰۰ جفت بازی استفاده شد. در نهایت از ژل حاصل توسط دستگاه ژل داک عکسبرداری شد.

تعیین توالی محصولات ژنهای *divIVA* و *alanine racemase*: بعد از طراحی پرایمرهای مورد نظر در این مطالعه، جهت اطمینان از صحت توالی های تعیین شده توسط پرایمرها، محصولات بدست آمده از PCR برای تعیین توالی توسط شرکت تکاپوزیست به شرکت کره ای ارسال شد. نتایج بدست آمده از تعیین توالی برای Allignment کردن و بررسی میزان همولوژی پرایمرهای مورد نظر در گونه های باکتریایی استفاده شد. همچنین نتایج بدست آمده از تعیین توالی پرایمرهای طراحی شده، بعنوان روش گلد استاندارد جهت تعیین اختصاصیت پرایمرها در نظر گرفته شد.

انجام واکنش Real time PCR: در این مطالعه از دستگاه Real ABI Onestep time (آمریکا) استفاده شد. برنامه دمایی دستگاه در سه مرحله انجام شد. مرحله اول که منجر به دناتوره شدن DNA الگو و فعال شدن آنزیم پلیمرز میگرد، در دمای °C ۹۵ و به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت. در مرحله دوم، واکنش تکثیری DNA در ۳۰ سیکل و با دمای °C ۹۵ به مدت ۱۵ ثانیه و دمای °C ۵۸ به مدت ۴۵ ثانیه ادامه یافت. مرحله پایانی جهت ترسیم منحنی تفکیک یا منحنی ذوب به صورت °C ۹۵ به مدت ۱۵ ثانیه، °C ۵۵ به مدت ۱ دقیقه و °C ۹۵ به مدت ۱۵ ثانیه انجام شد. واکنش های Real time PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر به صورت دوتایی در پلیتهای ۹۶ چاهکی انجام شدند. مخلوط

دارند، این گونه ها را شناسایی کرد. ژن *divIVA* یک ژن اختصاصی در *انتروکوک فکالیس* می باشد که در تقسیمات سلولی و جداسازی کروموزوم می باشد (۱۴). ژن *Alanine racemase* هم در *انتروکوک فاسیوم* در بیوستر پیتید و گلیکان و تبدلات L و D آلانین نقش مهمی دارد (۱۵). تمامی موارد ذکر شده در بالا سبب شده است که تشخیص این باکتری در عفونت های اولیه بیمارستانی از اهمیت ویژه ای برخوردار شود. طراحی یک روش دقیق، سریع و مقرون به صرفه می تواند در کنار شناسایی جنس باکتریایی، گونه هایی که از نظر همولوژی قرابت بالایی دارند را نیز مشخص کند.

هدف از انجام این مطالعه، طراحی روشی پایه ای مبتنی بر آنالیز نمودارهای مربوط به ذوب DNA برای تشخیص سریع و دقیق *انتروکوک فکالیس* و *انتروکوک فاسیوم* در جدایه های بالینی می باشد.

مواد و روش ها

طراحی پرایمرها: سایت های هدف انتخاب شده برای پرایمرهای *انتروکوک فکالیس* ژن *divIVA* (ژن مسئول در تقسیم دیواره سلولی) و برای *انتروکوک فاسیوم* ژن (*alanine racemase (alr)*) (ژن مسئول در سنتز اسید آمینه آلانین) تعیین شد. پس از انتخاب سایت هدف جهت طراحی پرایمر بانکهای اطلاعاتی مربوط به هر باکتری از سایت NCBI جستجو و تهیه گردید. جهت ارزیابی دمای Anneling و Tm پرایمرهای طراحی شده از نرم افزار ۶ Oligo، Oligoanalyzer و Gene Runner استفاده شد (جدول ۱). بعد از طراحی پرایمرهای ذکر شده به منظور اطمینان از اختصاصی بودن عملکرد آنها، دربانک اطلاعاتی NCBI عمل Blast کردن با نمونه های انسانی، قارچی، ویروسی و میکروارگانیسم های دیگر صورت پذیرفت.

جدول ۱. پرایمرهای طراحی شده جهت شناسایی *انتروکوک فکالیس* و

انتروکوک فاسیوم			
اندازه	طول توالی	ژن	باکتری
(bp)			
۱۲۳	F: ACGTGCTCTCCATCAACGCT	F. <i>divIVA</i>	<i>انتروکوک</i>
	R: ACTGCTGTATGTTTGTCTCCGA	R. <i>divIVA</i>	<i>فکالیس</i>
۲۴۸	F: ATCCCTCTGGGCACGCAC	F. <i>Alanine racemase</i>	<i>انتروکوک</i>
	R: ACATACACGCCCCAATCGTTTC	R. <i>Alanine racemase</i>	<i>فاسیوم</i>

میکروارگانیسم ها برای کنترل کیفی: جهت انجام آزمون های آنالیتیکی از سویه های استاندارد و کلینیکی باکتریهای *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 و سویه *Enterococcus faecium* (تایید شده توسط تعیین توالی) بعنوان کنترل مثبت و از DNA *Escherichia coli* ATCC 25922 و *Staphylococcus aureus* ATCC 29213، *A. baumannii* (ATCC 19606)، *P. aeruginosa* (ATCC 27853)، *pneumonia* (ATCC 13882) بعنوان کنترل منفی تهیه شده از مرکز کلکسیون میکروبی دانشگاه علوم پزشکی همدان، استفاده گردید.

آمار توصیفی (تعیین فراوانی و میانگین) استفاده شد. همچنین از نرم افزار Chromas نسخه ۵/۲ برای آنالیز نتایج حاصل از تعیین توالی پرایمرهای طراحی شده استفاده شد.

یافته ها

نتایج مربوط به تعیین حساسیت پرایمرها: با بدست آوردن غلظت در رقت های ۱۰^۱ تا ۱۰^۷ (نمودار ۱) مشخص شد که پرایمر طراحی شده برای انتروکوک فاسیوم قدرت شناسایی ۱۵CFU باکتری و پرایمر طراحی شده برای انتروکوک فکالایس قدرت شناسایی ۱۵CFU باکتری را دارا می باشد (شکل ۱).

نتایج مربوط به اختصاصیت پرایمرهای طراحی شده: منحنی حاصل از تکثیر ژن divIVA در انتروکوک فکالایس در همه رقت ها دمای °C ۷۶/۶ را نشان داد و منحنی های حاصل از تکثیر ژن Alanine racemase در انتروکوک فاسیوم دمای °C ۸۰/۹۳ را نشان داد. نتایج حاصل از بلست دمای پرایمرها که در پایگاه NCBI انجام گرفت، با نتایج دمایی که در پایان واکنش از منحنی های ذوب بدست آمد کاملاً برابری داشت. (نمودار ۳). برای کنترل منفی (نمودار استاندارد) از نمودار ذوب باکتری های استافیلوکوک اورئوس و اشریشیا کلی برای دو گونه مورد مطالعه استفاده شد. دماهای بدست آمده در پایان واکنش و منحنی های ایجاد شده، نشان دهنده عدم شناسایی پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه برای سایر باکتری بود (جدول ۲).

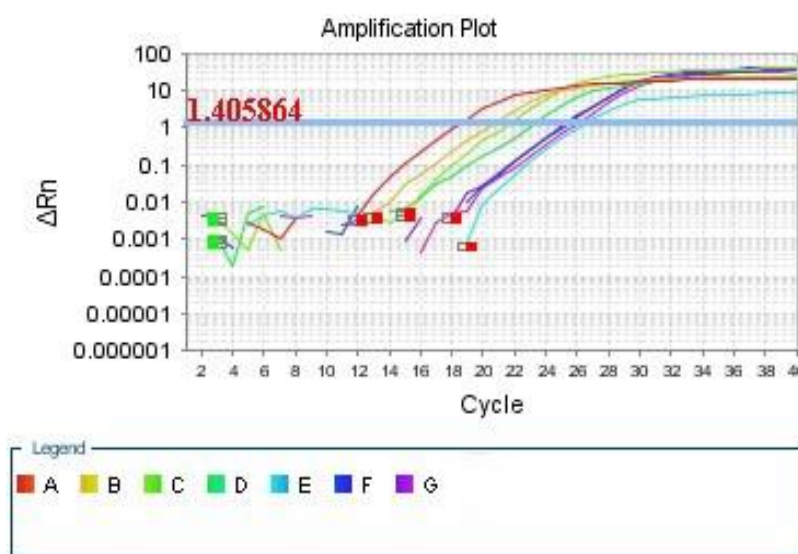
نتایج ژل الکتروفورز: جهت بررسی کیفیت قطعات ژنومی تکثیر شده در واکنش Real time PCR، محصولات واکنش در ژل الکتروفورز ۱ درصد بارگذاری شدند. از مارکر مولکولی با اندازه ۱۰۰ جفت بازی در واکنش فوق، استفاده شد و باندهایی به طول ۱۲۳ جفت مربوط به تکثیر موفقیت آمیز ژن divIVA انتروکوک فکالایس و طول ۲۴۸ جفت باز مربوط به تکثیر موفقیت آمیز ژن Alanine racemase انتروکوک فاسیوم به دست آمد (شکل ۱A و ۱B).

واکنش شامل TaKaRa, Japan) Mix Master PCR SYBR Green به میزان ۱۰ میکرولیتر، ۱ میکرولیتر (غلظت ۱۰ پیکومولار) از پرایمرهای مستقیم و معکوس، ۵ میکرولیتر DNA الگو، ۰/۴ میکرولیتر رنگ Rox و بقیه آن آب مقطر تا حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر اضافه شد.

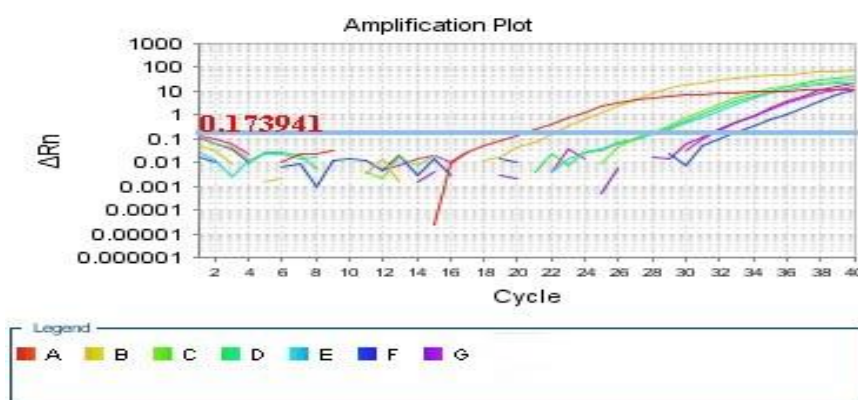
تعیین حساسیت پرایمرهای طراحی شده: برای انجام آزمون حساسیت پرایمرهای طراحی شده با استفاده از تهیه استاندارد باکتریایی با غلظت نیم مک فارلند (۵/۱×۱۰^۸ CFU/ml)، اقدام به تهیه رقت از ۱۰^۱ تا ۱۰^۷ باکتری شد. سپس از هر یک از رقت های بدست آمده بصورت مجزا استخراج DNA صورت گرفت و بصورت سه تایی (Triplicate) در سه روز متوالی برای رقت های تهیه شده آزمون Real Time PCR انجام شد و با استفاده از تکرار پذیری تست انجام شده، حساسیت آزمون طراحی شده به دست آمد.

تعیین اختصاصیت پرایمرهای طراحی شده: به منظور انجام آزمون اختصاصیت پرایمرهای تهیه شده از سویه DNA استاندارد Enterococcus faecalis ATCC 29212 بعنوان کنترل مثبت و از Escherichia coli ATCC 25922 و Staphylococcus aureus ATCC 29213، P. aeruginosa (ATCC 27853)، K. pneumonia (ATCC 13882)، baumannii (ATCC 19606)، به عنوان کنترل منفی استفاده شد. همچنین برای تایید نهایی آزمون اختصاصیت از DNA انتروکوک فاسیوم و پرایمر انتروکوک فکالایس و از DNA انتروکوک فکالایس برای انتروکوک فاسیوم استفاده شد. برای جداسازی گونه های مختلف انتروکوک از یکدیگر در آنالیز Melting curve مورد استفاده قرار گرفت. در پایان واکنش، منحنی استاندارد براساس لگاریتم غلظت DNA محور افقی (و سیکل آستانه) محور عمودی (ترسیم شد. از شیب منحنی استاندارد برای محاسبه راندمان واکنش تکثیری استفاده شد.

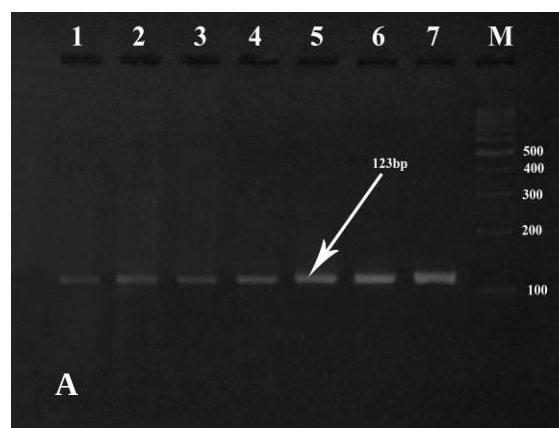
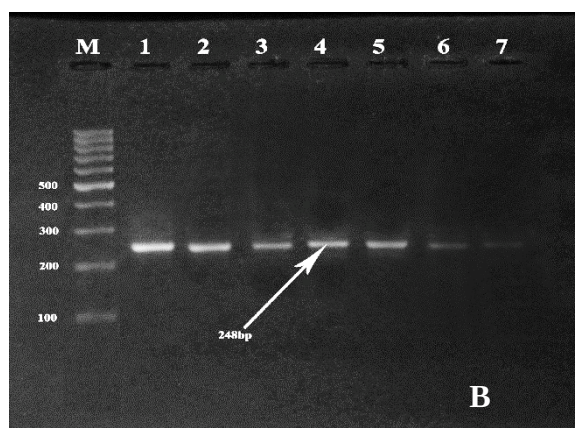
آنالیز و بررسی داده ها: داده های بدست آمده، با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۹ مورد بررسی، تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای این منظور از روش های



نمودار ۱. منحنی آستانه (ترشولدر) در رقت های مختلف برای تعیین حساسیت پرایمرهای مربوط به انتروکوک فکالایس. تعداد سیکلهای آستانه روی محور افقی و تغییر فلورسانس دریافتی (ΔRn) روی محور عمودی نشان داده شده است. نمودار A مربوط دمای حساسیت پرایمرهای طراحی شده در رقت ۱۰^۷ می باشد. B مربوط به رقت ۱۰^۶، C مربوط به رقت ۱۰^۵، D مربوط به رقت ۱۰^۴، E مربوط به رقت ۱۰^۳، F مربوط به رقت ۱۰^۲، G مربوط به رقت ۱۰^۱ باشد.



نمودار ۲. منحنی آستانه (ترشولدر) در رقت های مختلف برای تعیین حساسیت پرایمرهای مربوط به انتروکوک فاسیوم. تعداد سیکل های آستانه روی محور افقی و تغییر فلورسانس دریافتی (ΔRn) روی محور عمودی نشان داده شده است. نمودار A مربوط دمای حساسیت پرایمرهای طراحی شده در رقت 10^7 می باشد. B مربوط به رقت 10^6 ، C مربوط به رقت 10^5 ، D مربوط به رقت 10^4 ، E مربوط به رقت 10^3 ، F مربوط به رقت 10^2 ، G مربوط به رقت 10^1 باشد.



شکل ۱. A- تصویر ژل الکتروفورز (درصد مربوط به تکثیر ژن *divIVA* در باکتری *Enterococcus faecalis* با طول ۱۲۳ جفت باز. چاهک ۱ رقت 10^7 ، چاهک ۲ رقت 10^6 ، چاهک ۳ رقت 10^5 ، چاهک ۴ رقت 10^4 ، چاهک ۵ رقت 10^3 ، چاهک ۶ رقت 10^2 ، چاهک ۷ رقت 10^1 ، چاهک M مارکر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی. B- تصویر ژل الکتروفورز (درصد مربوط به تکثیر ژن *Alanine racemase* در باکتری *Enterococcus faecium* با طول ۲۴۸ جفت باز. چاهک ۱ رقت 10^7 ، چاهک ۲ رقت 10^6 ، چاهک ۳ رقت 10^5 ، چاهک ۴ رقت 10^4 ، چاهک ۵ رقت 10^3 ، چاهک ۶ رقت 10^2 ، چاهک ۷ رقت 10^1 ، چاهک M مارکر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی).

جدول ۲. نتایج حاصل از بررسی تعیین غلظت و OD در رقت های مختلف DNA باکتری های انتروکوک فاسیوم و انتروکوک فکالیز با استفاده از دستگاه نانودراپ

انتروکوک فاسیوم				انتروکوک فکالیز			
کنترل مثبت		کنترل منفی		کنترل مثبت		کنترل منفی	
انتروکوک فاسیوم		استافیلوکوک اورئوس		انتروکوک فکالیز		اشریشیاکلی	
Melt	CT	Melt	CT	Melt	CT	Melt	CT
۸۰/۹۳	۲۰/۳	۷۳/۰۹	۲۸/۳۴	۷۶/۶	۱۶/۱۴	۷۲/۴۴	۲۸/۳

شناسایی انتروکوک فاسیوم نبودند. در نهایت نتایج بصورت منحنی های ذوب با دماهای متفاوت بدست آمد بطوریکه در زمان استفاده از DNA انتروکوک فکالیز و پرایمر انتروکوک فاسیوم دمای غیر اختصاصی $77/04^{\circ}\text{C}$ بدست آمد و هنگامیکه از DNA انتروکوک فاسیوم و پرایمر انتروکوک فکالیز استفاده شد دمای غیر اختصاصی $78/84^{\circ}\text{C}$ بدست آمد. با توجه به دماهای بدست آمده از پرایمرهای انتروکوک فاسیوم ($80/93$) و انتروکوک فکالیز ($76/6$) که اختصاصیت پرایمرها تعیین شد (نمودار ۳).

نتایج حاصل از بلست محصولات ژن *divIVA* در باکتری *Enterococcus faecalis* و تکثیر ژن *Alanine racemase* در باکتری *Enterococcus faecium* در یک آزمون Real time برای تعیین اختصاصیت پرایمرهای، DNA باکتری های انتروکوک فکالیز و انتروکوک فاسیوم به همراه دو پرایمرهای طراحی شده بصورت جدا مورد استفاده قرار گرفت تا اختصاصیت پرایمرها برای گونه ها نیز بدست آید. در این مورد هم پرایمر انتروکوک فکالیز قادر به شناسایی انتروکوک فکالیز نبوده و پرایمر انتروکوک فکالیز قادر به

بالایی را مشاهده کرد (۱۶). این امر زمانی بیشتر خود را نشان می دهد که در برخی موارد بروز همولوژی های بین گونه ای در این خانواده تشخیص با استفاده از قندهای متعدد را نیز غیر ممکن می کند و می تواند نتایج منفی کاذب و مثبت کاذب فراوانی را در بر داشته باشد. در مطالعه حاضر حساسیت های پرایمرهای طراحی شده برای شناسایی هر دو گونه انتروکوک فکالایس و انتروکوک فاسیوم ۱۵CFU/ml بدست آمد. در مطالعاتی که Cha و همکاران جهت شناسایی سویه های انتروکوک های مقاوم به ونکومایسین با استفاده از آنالیز منحنی ذوب DNA انجام دادند، مشخص شده که با توجه به حساسیت این روش می توان از آن برای گروه بندی سویه های مقاوم در یک جنس و حتی در یک گونه استفاده کرد (۲۰).

ارزش تشخیصی روش آنالیز ذوب مبتنی بر Real time PCR در مواقعی که همولوژی های نزدیک بین گونه ایی وجود داشته باشد می تواند با تکیه بر حساسیت بالای خود، گونه هایی که دارای همولوژی نزدیک هستند را نیز از یکدیگر تفريق کند. این مورد در مطالعات Choong-Hwan Cha و همکاران بخوبی مشاهده شد که در نهایت موفق به شناسایی گونه های انتروکوک فاسیوم و فکالایس از یکدیگر شدند.

نتایج حاصل از این بررسی با نتایج حاصل از مطالعه حاضر کاملاً همخوانی داشت و نتایج مشابهی را می توان در هر دو مطالعه مشاهده کرد. البته این نکته را باید مد نظر قرار داد که در روش MCA مبتنی بر Real time باید به طراحی پرایمرها به دقت توجه داشت. در مطالعاتی که توسط Krawczyk و همکاران انجام گرفت طراحی پروفایل ذوب را در کنار روش PFGE مورد استفاده قرار گرفت تا حساسیت آن را افزایش دهد (۱۱).

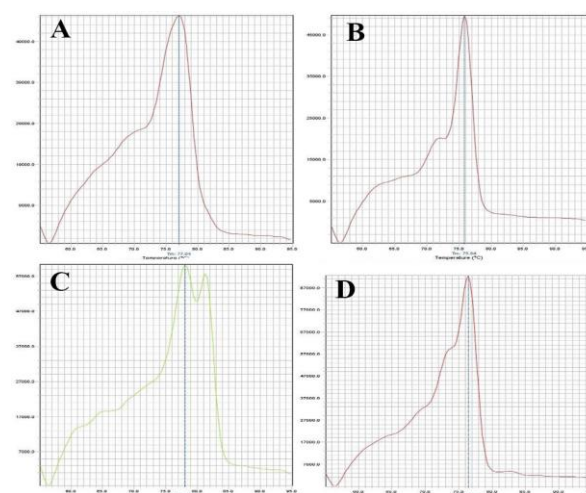
با توجه به نتایج بدست آمده از تعیین توالی پرایمرهای طراحی شده در مطالعه حاضر، می توان اذعان داشت که این پرایمرها از حساسیت و ویژگی قابل قبولی برخوردار هستند و به راحتی می توانند نمونه های DNA خالص شده گونه های مختلف انتروکوک را که دارای خصوصیات کشت و بیوشیمیایی بسیار نزدیک به هم هستند را نیز شناسایی کند.

در مطالعه ایی که Martín و همکاران بر روی گونه های مختلف انتروکوک داشتند با استفاده از روش آنالیز منحنی ذوب مبتنی بر آنزیم های محدود کننده سایت های ۱۶S و ۲۳S را به عنوان هدف قرار دادند که در برخی موارد بروز همولوژی های مشابه منجر به گزارش های منفی کاذب و مثبت کاذب شد (۱۲). در صورتیکه استفاده از تکنیکهای حساستر نظیر Real time PCR می تواند نتایج مثبت و منفی کاذب را بهبود بخشد (۲۱).

بر اساس نتایج بدست آمده در این مطالعه، میزان حساسیت پرایمرهای طراحی شده برای تشخیص گونه های مختلف انتروکوک که فرآیند خالص سازی DNA بر روی آنها صورت گرفته است، ارزش اطمینان نسبتاً قابل قبولی را کسب کردند. البته نباید از این نتیجه گیری چشم پوشی کرد که انتخاب یک سایت هدف مناسب در برآیند حاصل از این مطالعه نقش بسیار مهمی داشت.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی همدان جهت حمایت مالی از این تحقیق، تشکر و قدردانی می گردد.



نمودار ۳. منحنی ذوب DNA حاصل از واکنش Real Time PCR جهت تعیین اختصاصیت پرایمرهای طراحی شده. A: اشریشیاکلی جهت ارائه کنترل منفی برای اختصاصیت پرایمر انتروکوک فکالایس. B: استافیلوکوک اورئوس جهت ارائه کنترل منفی برای اختصاصیت پرایمر انتروکوک فاسیوم. C: انتروکوک فکالایس و پرایمر انتروکوک فاسیوم. D: انتروکوک فاسیوم و پرایمر انتروکوک فکالایس.

بحث و نتیجه گیری

با آنالیز نتایج بدست آمده از منحنی های ذوب مربوط به DNA های باکتری های انتروکوک فکالایس و انتروکوک فاسیوم بهترین دماها برای این دو باکتری به ترتیب $76/6^{\circ}\text{C}$ و برای انتروکوک فاسیوم $80/8^{\circ}\text{C}$ بدست آمد. همچنین این دما در پرایمرهای بلست شده کاملاً مطابقت داشت. در مطالعات مشابهی که صورت گرفته است، روش Melting-Curve Analysis مبتنی بر Real time یکی از حساس ترین و دقیق ترین روش های مورد استفاده در زمینه تشخیص می باشد (۱۶). اهمیت تشخیص انتروکوک ها به عنوان پاتوژن های مهم اکتسابی از جامعه و بیمارستانی (دومین عامل رایج عفونت بیمارستانی) بویژه در بخش های مراقبت ویژه، یکی از چالش های جدید به حساب می آید، این باکتری ها موجب عفونت هایی نظیر عفونت مجرای ادراری و زخم، باکتری می، سپسیس و اندوکاردیت می گردند (۱۸-۱۶).

روش رایج تشخیص این باکتری تستهای بیوشیمیایی شامل تشخیص اولیه با انواع محیط کشت و یا استفاده از سیستم های تشخیص تجاری می باشد. چنین روش هایی از نظر زمان، پیچیدگی و از نظر تشخیص اختصاصی سویه ها دچار مشکل هستند.

بنابراین برای غلبه بر این مشکل تلاش ها به سوی تشخیص این باکتری بر مبنای روش های PCR برای توالی اختصاصی باکتری معطوف شده است (۱۹). در بررسی های انجام شده توسط Woksepp و همکاران که از روش آنالیز منحنی ذوب DNA های باکتری های مختلف استفاده شد، دسته بندی باکتری مطابق با این روش با بالاترین حساسیت صورت گرفت. همچنین در این مطالعه با بهینه سازی روش MCA نتایج حاصل با روش MLST مقایسه شد که نتایج نسبتاً قابل قبولی را در برداشت (۱۹).

با توجه به نتایج بدست آمده از روش های فنوتیپی در تعیین گونه های انتروکوک فکالایس و انتروکوک فاسیوم، در کنار هزینه بالا، می توان خطای

Evaluation of Real-time PCR-based DNA melting method for detection of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in clinical isolates

B. Zeyni (MSc)¹, M.R. Arabestani (PhD)¹, R.Yousefi Mashuf (PhD)*¹, H.Tahmasebi(MSc)²

1. Department of Microbiology, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, I.R.Iran

2. Department of Microbiology, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 19(2); Feb 2017; PP: 26-33

Received: Oct 19th 2016, Revised: Nov 26th 2016, Accepted: Jan 15th 2017.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Human error and timeless in conventional techniques to identify species *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* are two species of the pathogenic species in humans, more accurate techniques is essential. The aim of this study is to design a method of quickly and accurately using DNA melting by Real Time PCR technique to identify and separate the two species in clinical isolates.

METHODS: In this experimental study, the bacterial isolates in the Department of Microbiology Bank of Hamadan University of Medical Sciences was used. Design of primers was done by proprietary software and selecting *DivIVA* gene for *Enterococcus faecalis* and *alanine racemase* for *Enterococcus faecium* was performed. Isolates identification was evaluated by using Real Time PCR test and melting curve temperature of DNA.

FINDINGS: Susceptibility of primers designed in *divIVA* gene (specific for *E. faecalis*) and *alanine-racemase* gene (specific for *E. faecium*) was 15CFU/ml per reaction. Specificity of designed primers by using DNA melting curve analysis was 76.6 for *E. faecalis* and 80.93 for *E. faecium* which showed considerable different in comparison with another microorganism.

CONCLUSION: Using the results obtained in this study, primers designed were sensitivity and specificity for diagnosis and differentiation of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* species in clinical isolates.

KEY WORDS: *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, Real Time PCR

Please cite this article as follows:

Zeyni B, Arabestani MR, Yousefi Mashuf R, Tahmasebi H. Evaluation of Real-time PCR-based DNA melting method for detection of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in clinical isolates. J Babol Univ Med Sci. 2017;19(2):26-33.

* Corresponding author: R. YousefiMashuf (PhD)

Address: Department of Microbiology, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, I.R.IRan

Tel: +98 81 35250182

E-mail: yousefimash@yahoo.com

References

1. Ryu H, Henson M, Elk M, Toledo-Hernandez C, Griffith J, Blackwood D, et al. Development of quantitative PCR assays targeting the 16S rRNA genes of *Enterococcus* spp. and their application to the identification of enterococcus species in environmental samples. *App Environmental Microbiol.* 2013;79(1):196-204.
2. Ferguson DM, Talavera GN, Hernandez LA, Weisberg SB, Ambrose RF, Jay JA. Virulence genes among enterococcus faecalis and enterococcus faecium isolated from coastal beaches and human and nonhuman sources in southern california and puertorico. *J Pathog.* 2016;201(6):3437214.
3. Rafati M, Farhadi R, Nemati-Hevelai E, Chabra A. Determination of frequency and antibiotic resistance of common bacteria in late onset sepsis at the neonatal ward in Boo Ali-Sinahospital of Sari, Iran. *J BabolUniv Med Sci.* 2014;16(6):64-71.[In Persian].
4. Owens CD, Stoessel K. Surgical site infections: epidemiology, microbiology and prevention. *J Hosp Infect.* 2008;70(2):3-10.
5. Diederich AK, Wobser D, Spiess M, Sava IG, Huebner J, Sakiotanc T. Role of glycolipids in the pathogenesis of *Enterococcus faecalis* urinary tract infection. *PLoS One.* 2014;9(5):96295.
6. Hill DM, Wood GC, Hickerson WL. Linezolid bladder irrigation as adjunctive treatment for a vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* catheter-associated urinary tract infection. *Ann Pharmacother.* 2015;49(2):250-3.
7. Kazemeini F, Amini K. Evaluation of the frequency of virulence genes in enterococcus faecalis isolates from fecal samples by multiplex PCR method. *J BabolUniv Med Sci.* 2016;18(3):62-8.[In Persian].
8. Shakouie S, Salem Milani A, Eskandarnejad M, Rahimi S, Froughreyhani M, Galedar S, et al. Antimicrobial activity of tetraacetylenediamine-sodium perborate versus sodium hypochlorite against *Enterococcus faecalis*. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects.* 2016;10(1):43-7.
9. El-Kersh TA, Marie MA, Al-Sheikh YA, Al-Agamy MH, Al Bloushy AA. Prevalence and risk factors of early fecal carriage of *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus* spp and their antimicrobial resistant patterns among healthy neonates born in a hospital setting in central Saudi Arabia. *Saudi Med J.* 2016;37(3):280-7.
10. Mahmoudpour A, Rahimi S, Sina M, Soroush MH, Shahi S, Asl-Aminabadi N. Isolation and identification of *Enterococcus faecalis* from necrotic root canals using multiplex PCR. *J Oral Sci.* 2007;49(3):221-7.
11. Krawczyk B, Leibner J, Stojowska K, Bronk M, Samet A, Kur J. PCR melting profile method for genotyping analysis of vancomycin-resistant enterococcus faecium isolates from hematological unit patients. *Polish J MicrobiolPolskie Towarzystwo Mikrobiologow Polish SocMicrobiol.* 2007;56(2):65-70.
12. Martin B, Garriga M, Aymerich T. Identification of *Enterococcus* species by melting curve analysis of restriction fragments. *J Microbiol Method.* 2008;75(1):145-7.
13. Tong SY, Giffard PM. Microbiological applications of high-resolution melting analysis. *J clin microbiol.* 2012;50(11):3418-21.
14. Ramirez-Arcos S, Liao M, Marthaler S, Rigden M, Dillon JA. *Enterococcus faecalis* divIVA: an essential gene involved in cell division, cell growth and chromosome segregation. *Microbiol.* 2005;151(5):1381-93.
15. Priyadarshi A, Lee EH, Sung MW, Nam KH, Lee WH, Kim EE, et al. Structural insights into the alanine racemase from *Enterococcus faecalis*. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2009;1794(7):1030-40.
16. Jung WK, Lim JY, Kwon NH, Kim JM, Hong SK, Koo HC, et al. Vancomycin-resistant enterococci from animal sources in Korea. *Int J Food Microbiol.* 2007;113(1):102-7.
17. Seo KS, Lim JY, Yoo HS, Bae WK, Park YH. Comparison of vancomycin-resistant enterococci isolates from human, poultry and pigs in Korea. *Vet Microbiol.* 2005;106(3):225-33.
18. Arabestani MR, Fazzeli H, Nasr Esfahani B. Identification of the most common pathogenic bacteria in patients with suspected sepsis by multiplex PCR. *J Infect Dev Ctries.* 2014;8(4):461-8.

19. Woksepp H, Ryberg A, Billstrom H, Hallgren A, Nilsson LE, Marklund BI, et al. Evaluation of high-resolution melting curve analysis of ligation-mediated real-time PCR, a rapid method for epidemiological typing of ESKAPE *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Enterobacter* Species pathogens. *J Clin Microbiol*. 2014;52(12):4339-42.
20. Cha C-H, An HK, Kim JU. Detection of vancomycin-resistant enterococci using Multiplex Real-time PCR Assay and Melting Curve Analysis. *Korean J Lab Med*. 2010;30(2):138-46.
21. Alonso M, Marin M, Iglesias C, Cercenado E, Bouza E, Garcia de Viedma D. Rapid identification of linezolid resistance in *Enterococcus* spp. based on high-resolution melting analysis. *J Microbiol Methods*. 2014;98(11):41-3.