مقاله پژوهشی

طراحی واکنش زنجیره‌ای پلی مراز جهت تشخیص مولکولی باکتری‌های عامل اصلی پریودنتایتیس

محمد سلیمانی[۱،۲]، محمدرضا ذوالفقاری[۳]، عباس مروتی[۴*]

۱- گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارتش، تهران، ایران
۲- مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی تسنیم، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ارتش، تهران، ایران
۳- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران
۴- گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۹/۰۲/۰۱ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۹/۰۴/۲۳

چکیده

زمینه و هدف: بیماری پریودنتال باعث بیماری التهابی در دهان و دندان می‌شود که ممکن به‌صورت حاد یا مزمن به بخش‌های بافت‌های نرم و سخت دندان آسیب برساند. هدف از این مطالعه طراحی تکنیک PCR برای تشخیص این عوامل است.

مواد و روش‌ها : طراحی پرایمرهای اختصاصی برای هر یک از این عوامل باکتریایی *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*، *Porphyromonas gingivalis*، *Prevotella intermedia*، *Tannerella forsythensis* و *Treponema denticola* انجام گردید. سپس برای هر باکتری پس از کلون کردن تست‌های حساسیت و اختصاصیت گذاشته شد.

نتایج: بر اساس پرایمرهای اختصاصی برای باکتری‌های ژن *Aggregatibacter actinomycetemcomitans hbpA*، ژن *Porphyromonas gingivalis fimA*، ژن 16s rRNA باکتری *Prevotella intermedia*، *Tannerella forsythensis* 16s rRNA و ژن 16s rRNA *Treponema denticola* به ترتیب باندهای ۱۶۱ *bp*، ۱۶۲ *bp*، ۲۸۳ *bp*، ۲۵۰ *bp* و ۱۷۳ *bp* بر روی ژل دیده شد و پس از کلونینگ، تست‌های حساسیت و اختصاصیت انجام گرفت.

نتیجه‌گیری: جهت بررسی و تشخیص بیماری‌های پریودنتال با استفاده از تکنیک PCR، می‌توان با اختصاصیت و حساسیت بالا این عوامل را شناسایی کرد.

کلمات کلیدی: واکنش زنجیره‌ای پلی مراز، پریودنتایتیس، تشخیص مولکولی

مقدمه

حفره دهان به دلیل دارا بودن شرایط خاص فیزیولوژیک، بستر مناسبی برای رشد میکروارگانیسم‌های مختلف است؛ اما برخی از مکانیسم‌های طبیعی حفره دهان، مانند عمل جویدن، ترشح مداوم بزاق و مایع شیار لثه‌ای (حاوی آنزیم‌ها و مواد پروتئینی مانند لیزوزیم و لاکتوفرین) و نیز فعالیت سیستم ایمنی، محیط دهان را جهت سکون و کلونیزه شدن باکتری‌ها نامناسب می‌نمایند؛ لذا میکروارگانیسم‌ها ناگزیرند در نواحی حفاظت‌شده دهان مانند حفره‌ها و شیارهای دندان مستقر شوند. اغلب ضایعات عفونی دهان و دندان‌ها ناشی از فعالیت فرصت‌طلبانه فلور میکروبی دهان است که در این شیارها ساکن می‌شوند و با فعالیت متابولیکی ضایعات و صدمات زیادی را ایجاد می‌نمایند؛ چنان‌که اسید تولیدشده توسط باکتری‌ها، لایه محافظ دندان را حل می‌کند و شرایط فعالیت برای باکتری‌های عامل پوسیدگی را به وجود می‌آورد (۱). با افزایش رشد میکروب‌ها، توده متراکم و پیچیده‌ای در سطح دندان‌ها تشکیل می‌شود که پلاک دندانی نام دارد. این پلاک در حفره‌ها و شیارهای موجود در سطوح جونده و نیز در شیار لثه و پاکت پریودنتال به وجود می‌آید. بافت‌های نگه‌دارنده اطراف دندان می‌توانند به انواع مختلفی از بیماری‌ها مبتلا شوند که همگی در اثر عفونت باکتریایی لثه‌ها، استخوان و رباط‌هایی که از دندان حمایت کرده و آن‌ها را در داخل آرواره نگه می‌دارند، به وجود می‌آیند. بیماری‌های بافت‌های نگه‌دارنده

*نویسنده مسئول: **عباس مروتی**، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران
Email: Abbasmorovvati@gmail.com
https://orcid.org/0000-0002-9221-7084

اطراف دندان معمولاً بدون درد بوده و ممکن است پیشرفتی آهسته یا کاملاً سریع داشته باشند. شکل‌های مختلفی از بیماری‌های لثه‌ای و بافت‌های اطراف دندانی وجود دارد که شایع‌ترین آن‌ها عبارت‌اند از: التهاب لثه (Gingivitis) و التهاب بافت‌های نگه‌دارنده اطراف دندان (Periodontitis) التهاب لثه اولین مرحله بیماری بافت‌های اطراف دندان بوده و قابل‌برگشت است. بااین‌وجود، در صورت عدم معالجه ممکن است به بیماری وخیم‌تری منجر شود (۵-۲).

عامل اصلی بیماری‌های دندان و پریودنتال یک‌لایه (پلاک میکروبی) است که روی دندان‌ها تجمع پیدا می‌کند حفره دهان بالقوه حاوی بیش از ۴۰۰ گونه میکروبی است که در صورت رعایت نکردن بهداشت و با تکثیر این میکروب‌ها که از نوع گرم منفی نیز هستند، بافت‌های نگه‌دارنده دندان آسیب می‌بینند (۵، ۶). باکتری‌ها عامل اصلی عفونت‌های پریودنتال و لثه هستند، برای مثال:

Actinobacillus actinomycetemcomitans, Bacteroides gingivalis, B. intermedius, Eikenella corrodens, Wolinella recta, Fusobacterium nucleatum, Prevotella intermedia, Prevotella nigrescens Treponema denticola, Tannerella forsythia (Bacteroides forsythus), Porphyromonas gingivalis, Eikenella corrodens, Campylobacter rectus, Micromonas micros, Fusobacterium spp, Dialister pneumosintes and enteric rods

تقریباً ۱۲ باکتری دهانی در ارتباط با بیماری‌های پریودنتال هستند اما اخیراً اطلاعات به‌دست‌آمده نشان داده است (۶-۹) تکنیک‌هایی مثل روش‌های آنزیمی، آزمایش‌های ایمونولوژیکی و پروب‌های نوکلئیک اسید برای شناسایی این باکتری‌ها توسعه پیداکرده‌اند. روش‌های نامبرده نیازمند تقریباً حدود 10^3 تا 10^5 باکتری برای هر نمونه است. در روش PCR با تعداد کمتر می‌توان این باکتری‌ها را تشخیص داد در سال‌های اخیر علاقه بسیار زیادی برای بررسی و جستجوی باکتری‌ها با کمک بخش کوچکی از ژن *16s rRNA* به وجود آمده است (۹-۱۲)؛ بنابراین یک روش آسان و حساس برای بررسی و تشخیص بیماری ایجادشده نیاز است. روش‌های شناسایی شامل کشت، بررسی با میکروسکوپ فلورسانس، پروب DNA و PCR برای تحقیقات باکتری‌های عفونی در زخم‌های لثه به کار می‌روند. استفاده از روش‌های کشت و میکروسکوپ فلورسانس برای نمونه‌های کلینیکی استفاده می‌شوند اما نیاز به‌وقت، زحمت و هزینه زیاد دارند. ضمن اینکه با این روش‌ها در بیشتر افراد آلوده، دو باکتری *T.denticola* و *B.forsythus* را نمی‌توان تشخیص داد. مطالعات اخیر به کمک روش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، شناسایی این باکتری‌ها را بدون هیچ مشکلی میسر کرده است. در پاراگراف‌های زیر شرح مختصری از باکتری‌های مهم در این بیماری و ژن‌های آن‌ها آورده شده است (۱۲-۱۴). روش طراحی و معرفی‌شده در این مطالعه با مزایایی مانند سرعت، حساسیت و ویژگی خیلی بالا نقش مهمی در کنترل و مدیریت بیماری‌های پریودنتال دارد. مزایای طراحی روش تشخیص مولکولی باکتری‌های مؤثر در پریودنتیت به شرح زیر است: تشخیص با سرعت، حساسیت و ویژگی بالای این باکتری‌ها در نمونه‌های زیرلثه‌ای موجب شناسایی سریع بیماران در معرض خطر خواهد شد ضمن اینکه اطلاعات مهمی برای چگونگی درمان آن‌ها ارائه می‌کند. در طی بیماری پریودنتال، این تست میزان موفقیت درمان و همچنین زمان توقف درمان را مشخص خواهد کرد. با انجام منظم این تست بر روی نمونه‌های پاکت‌های لثه‌ای، تشخیص عود بیماری آسان‌تر می‌گردد. قبل از انجام روش‌های ایمپلت های دندانی، انجام این تست اطلاعات مهمی ازنظر احتمال شکست و غیر موفقیت‌آمیز بودن کاشت دندان ارائه خواهد کرد. نتایج انجام این تست باعث افزایش انگیزه بیماران و درنتیجه توجه بیشتر به بهداشت دندان و دهان خود خواهد گردید.

مواد و روش‌ها

در شروع این مطالعه تحقیقاتی ابتدا با بررسی متون کتب، پایگاه‌های اطلاعاتی و مقالات، ژن‌های دارای ارزش تشخیصی پنج باکتری عامل اصلی پریودنتایتیس مشخص شدند. بررسی پیشینه تحقیق استفاده محققان از ژن‌های مختلف را نشان داد و با انجام مطالعه مقایسه‌ای بین آن‌ها نتیجتاً ژن‌های *hbpA* برای باکتری *A. actinomycetemcomitans*، ژن *fimA* برای *P.gingivalis*، از ژن *16s rRNA* برای باکتری‌های *P. intermedia*، *T.forsythensis* و *T. denticola* انتخاب گردید.

طراحی پرایمرهای تشخیصی

طراحی پرایمر برای ژن‌ها با استفاده از نرم‌افزار CLC Main Workbench version 5.5 سکانس‌های ژن‌های موردنظر این باکتری‌ها از دیتابیس gene bank استخراج و استخراج گردید. در ادامه برای جستجوی نواحی حفاظت‌شده در همه ترادف‌ها از alignment آن‌ها به کمک نرم‌افزار CLC استفاده شد. از نرم‌افزار AlleleID version 7.60 برای طراحی پرایمر استفاده شد. با قرار

دادن کل سکانس موردنظر در برنامه، چندین زوج پرایمر با ویژگی‌های مشخص طبق فرضیات برنامه قابل جستجو است. بهترین زوج پرایمرها با توجه به فاکتورهای بااهمیت همچون دمای ذوب پرایمر (Tm)، طول محصول (Product length)، درصد سیتوزین- گوانین (GC%)، وزن مولکولی پرایمرها، عدم احتمال تشکیل (Hair pin loop) بین نوکلئوتیدهای دو پرایمر، عدم احتمال ایجاد دایمر پرایمر و تشکیل حلقه‌های داخلی مستحکم و پایدار (internal loop)، انتخاب شدند. برای اطمینان از ویژگی پرایمرها از سرویس BLAST و Primer BLAST پایگاه NCBI استفاده گردید. در این مطالعه برای تشخیص مولکولی باکتری‌های اصلی مولد پریودنتایتیس تعداد پنج جفت پرایمر طراحی گردید (جدول ۱).

جدول ۱- پرایمرهای مورداستفاده در این مطالعه

Bacterium	Target gene	Primer name	Primer sequence	Tm (°C)	Product length (bp)
A. actinomycetemcomitans	hbpA	F-Aggrega- hbpA	AGACCCAATGCAAAAGTAACG	۶۵/۵	۱۶۱
		R- Aggrega- hbpA	GCAGTTCTGGGCTGAATTG	۶۵/۶	
P. gingivalis	fimA	F- Porphy-fimA	ACAGCAGGAAGCCATCAA	۵۶/۶	۱۶۲
		R- Porphy-fimA	GCAGTCAGTTCAGTTGTCAA	۶۴/۷	
P. intermedia	16s rRNA	F- Pre 16	GAGGCAGCAGTGAGGAATA	۶۵/۴	۲۸۳
		R- Pre 16	GCAAGGTAGATGTTGAGCAC	۶۵/۳	
T. forsythensis	16s rRNA	F- Tan-16	GCATGTACCTTGTGAATAAGCA	۶۵/۳	۲۵۰
		R- Tan-16	CTTCGCAATCGGAGTTCTG	۶۵	
T.denticola	16s rRNA	F- Tre-16	CAAGGCAACGATGGGTATC	۶۴/۸	۱۷۳
		R- Tre-16	CTGCAAAAGAATTTTACAACCTTTC	۶۴/۱	

در این پروژه به‌منظور راه‌اندازی واکنش PCR برای تکثیر ژن‌های هدف از ژنوم سوش‌های استاندارد *A.actinomycetemcomitans* با شماره دسترسی ۵-*۷۰۰۶۸۵D*، *T.Forsythus* با شماره دسترسی ۵-۴۳۰۳۷D، *P.gingivalis* با شماره دسترسی ۵-۳۳۲۷۷D، باکتری *P.intermedia* با شماره دسترسی ۵-۲۵۶۱۱D و باکتری *T.denticola* با شماره دسترسی ۵-۳۵۴۰۵D به‌عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. واکنش PCR در حجم ۲۵ µl (۲ میلی مولار یون منیزیم، ۰/۲ میلی مولار dNTPs، ۰/۵ میکرومولار از پرایمرهای جلو زن و عقب زن، ۲ میکرولیتر از ژنوم هر یک از باکتری‌های پنج‌گانه با غلظت ۳۵ ng/µl و یک واحد آنزیم Taq DNA polymerase) انجام شد. از برنامه دمایی به‌صورت واسرشت اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه، واسرشت ثانویه در دمای ۹۵ درجه به مدت ۱ دقیقه، اتصال پرایمرها به ترتیب در دمای ۶۰، ۶۰، ۶۳، ۴۹ و ۴۹/۴ درجه سانتی‌گراد برای ژن‌های *Aggregatibacter*، *Tannerella*، *Prevotella*، *Treponema* و *Porphyromonas* به مدت ۴۵ ثانیه، طویل شدن در ۷۲ درجه به مدت ۴۵ ثانیه در ۳۵ سیکل و سپس دمای ۷۲ درجه به مدت ۴۵ ثانیه به‌صورت جداگانه انجام شد. در هر بار آزمایش، یک نمونه کنترل منفی مشابه شرایط آزمون ولی بدون افزودن الگو استفاده گردید. به‌منظور بررسی حضور تکثیر قطعات موردنظر، محصولات واکنش در ژل آگارز ۲٪ الکتروفورز شدند. به‌منظور طراحی تکنیک دقیق برای محصولات PCR، از متد کلونینگ استفاده شد پس از تخلیص نمونه‌ها با

کیت Bionner (کره) برای آماده‌سازی نمونه‌ها و خلوص آن‌ها نمونه با استفاده از پروتکل کیت کلونینگ Fermentas (کانادا) واکنش T کلونینگ برای هر ژن از باکتری‌ها انجام گرفت. پس از آماده‌سازی باکتری پذیرا E.*coli* JM 107 واکنش ترانسفورماسیون انجام و باکتری‌های پذیرا در محیط کشت Luria Bertani agar (مرک-آلمان) که دارای X-Gal (مرک-آلمان)، IPTG(مرک-آلمان) و آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین و نالیداکسیک اسید است کشت داده شد. بررسی اولیه تست با غربالگری پرگنه‌های سفید و آبی و تست کلنی PCR برای هر یک از ژن‌ها موردنظر انجام گرفت. برای تائید نهایی کلون‌های حاوی ژن موردنظر پس از استخراج از پلازمیدها با استفاده از کیت استخراج پلازمید شرکت Bionner (کره) انجام گرفت. سپس جهت تعیین تست‌های حساسیت برای هر یک از ژن‌ها از رقت‌های 10^{-1} تا 10^{-10} از پلازمیدها تهیه و انجام واکنش PCR بر روی پلازمیدها انجام گرفت تا حد تشخیص تعیین شود. برای بررسی میزان اختصاصیت تست‌ها از ژنوم باکتری‌های کنترل منفی *Staphylococcus aureus* با شماره دسترسی ۲۵۹۲۳، باکتری *Bacillus subtilis* با شماره دسترسی ۶۰۵۱، باکتری *Shigella sonnei* با شماره دسترسی ۹۲۹۰، *Enterobacter aerogenes* با شماره دسترسی ۲۵۹۲۲ و *Klebsiella pneumoniae* با شماره دسترسی ۷۸۸۱ از انستیتو پاستور ایران تهیه شد.

نتایج

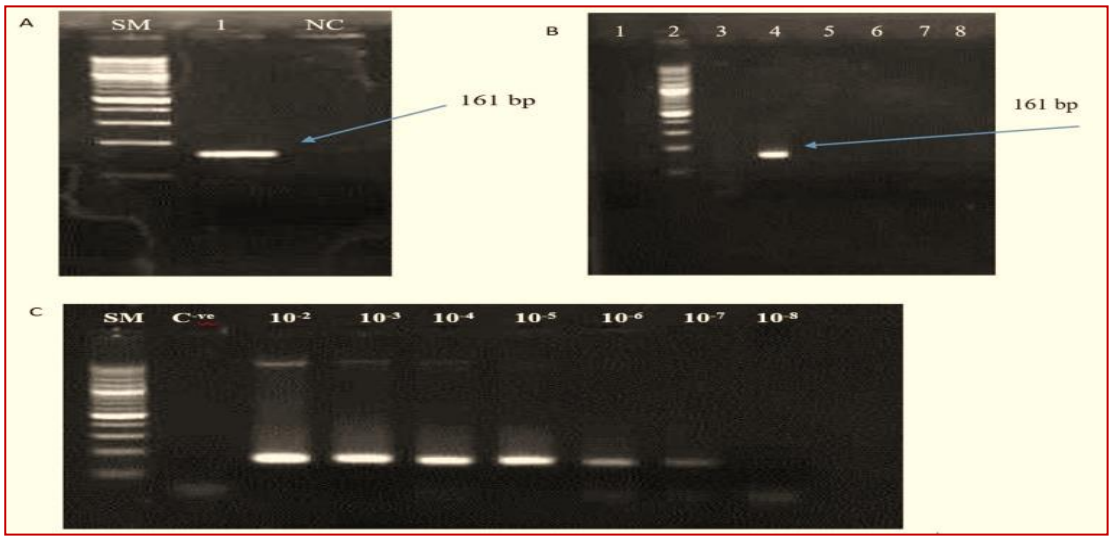
نتایج اخذ سکانس‌های ژن *hbpA* از بانک ژنی و طراحی پرایمرهای اختصاصی باکتری *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* تعداد ۸۳ ترادف ثبت‌شده، *fimA* باکتری *Porphyromonas gingivalis* تعداد ۲۷ ترادف ثبت‌شده، ژن *16s rRNA* باکتری *Prevotella intermedia* تعداد ۲۷ ترادف، ژن *16s rRNA* باکتری *Tannerella forsythensis(Bacteroides forsythus)* تعداد ۱۰ ترادف، ژن *16s rRNA* باکتری *Treponema denticola* تعداد ۴۶ ترادف ثبت‌شده این ژن استخراج گردید.

تکثیر نمونه‌ها

پس از تکثیر ژن *hbpA* با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی مراز و الکتروفورز محصول بر روی ژل آگاروز ۲٪، مطابق انتظار باندی برابر ۱۶۱ جفت باز به دست آمد. شکل ۱A نتیجه این الکتروفورز را نشان می‌دهد.

نتایج تعیین ویژگی واکنش PCR ژن *hbpA*

تعیین ویژگی روش با استفاده از انجام PCR به کمک پرایمرهای ژن هدف و البته در حضور ژنوم پانلی از باکتری‌های کنترل منفی انجام گرفت. انجام PCR بر روی ژنوم باکتری‌های کنترل منفی هیچ باند مشخصی ایجاد نکرد که نشان‌دهنده ویژگی کامل روش است (شکل ۱B).



شکل ۱A- SM: *سایز مارکر مولکولی* 100 bp plus *شماره ۱ محصول* PCR *ژن* hbpA.NC: *کنترل منفی*. ***شکل ۱B***. *چاهک شماره ۱: ژنوم* E.coli، *۲: سایز مارکر* ۱۰۰bp، *شماره ۳: کنترل منفی، ۴: کنترل مثبت، شماره ۵ تا ۸: به ترتیب ژنوم باکتری‌های* B.subtilis، E.faecalis، S.aureus، P.aerogenosa. ***شکل ۱C***. *نتایج تعین حساسیت و حد تشخیص ژن* hbpA

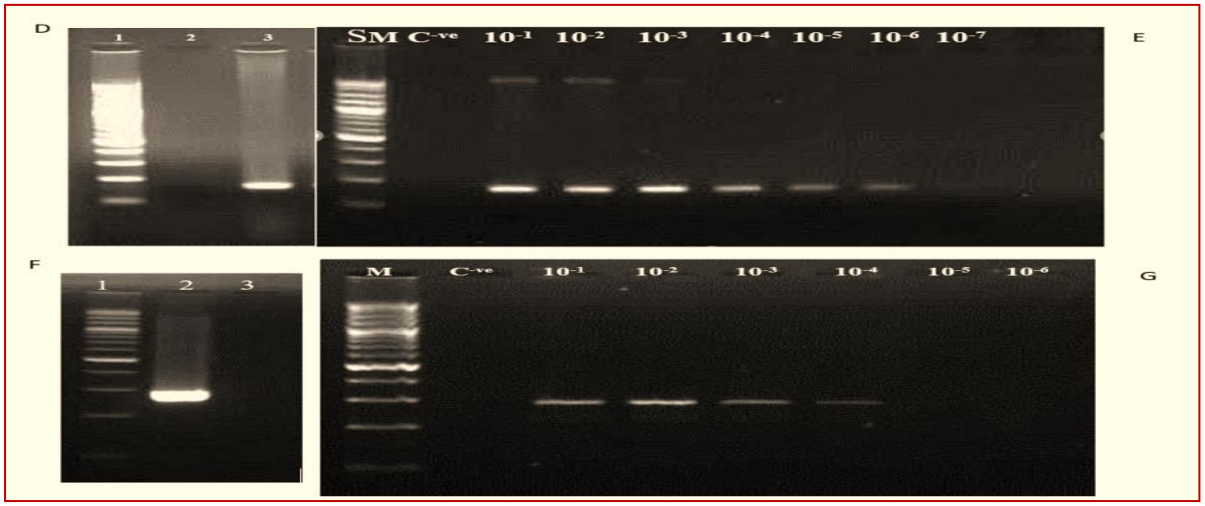
نتایج تعیین حساسیت و حد تشخیص (LOD) واکنش PCR ژن *hbpA*

آخرین رقتی از پلاسمید حامل ژن *hbpA* که باند قابل مشخص را ایجاد نمود $۱۰^{-۷}$ (۱۷/۴fg) بود (شکل 1C). کمترین تعداد کپی قابل‌تشخیص مربوط به این ژن عدد ۵۲۰۰ تعیین گردید. این عدد نشان می‌دهد که پرایمرهای طراحی‌شده قادر به ردیابی ۵۲۰۰ کپی از ژنوم در یک واکنش PCR ۲۵ میکرولیتری هستند. نتایج به‌دست‌آمده از ست آپ واکنش PCR، کلونینگ و استخراج پلاسمید دارای ژن *fimA* باکتری *Porphyromonas gingivalis* با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی مراز و الکتروفورز محصول بر روی ژل آگاروز ۲٪، مطابق انتظار باندی برابر ۱۶۲ جفت باز به دست آمد. شکل 2D نتیجه این الکتروفورز را نشان می‌دهد. نتایج تعیین ویژگی واکنش PCR ژن *fimA* با استفاده از انجام PCR به کمک پرایمرهای ژن هدف و البته در حضور ژنوم پانلی از باکتری‌های کنترل منفی انجام گرفت. انجام PCR بر روی ژنوم باکتری‌های کنترل منفی هیچ باند مشخصی ایجاد نکرد که نشان‌دهنده ویژگی کامل روش است.

نتایج تعیین حساسیت و حد تشخیص (LOD) واکنش PCR ژن *fimA*

آخرین رقتی از پلاسمید حامل ژن *fimA* که باند قابل مشخص را ایجاد نمود $۱۰^{-۶}$ (۴۰/۶۳ fg) بود (شکل 2E). کمترین تعداد کپی قابل‌تشخیص مربوط به این ژن عدد ۱۲۰۰۰ تعیین گردید. این عدد نشان می‌دهد که پرایمرهای طراحی‌شده قادر به ردیابی ۱۲۰۰۰ کپی از ژنوم در یک واکنش PCR ۲۵ میکرولیتری هستند.

نتایج به‌دست‌آمده از ست آپ واکنش PCR، کلونینگ و استخراج پلاسمید دارای ژن 16s rRNA باکتری P. intermedia با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی مراز و الکتروفورز محصول بر روی ژل آگاروز ۲٪، مطابق انتظار باندی برابر ۲۸۳ جفت باز به دست آمد. شکل 2F نتیجه این الکتروفورز را نشان می‌دهد. نتایج تعیین ویژگی واکنش PCR ژن 16s rRNA *باکتری* P.intermedia با استفاده از انجام PCR به کمک پرایمرهای ژن هدف و البته در حضور ژنوم پانلی از باکتری‌های کنترل منفی انجام گرفت.



شکل 2D- چاهک شماره ۱ سایز مارکر 100 bp شماره ۲ کنترل منفی، شماره ۳ محصول PCR ژن *fimA* شکل شماره 2E نتایج تعین حساسیت و حد تشخیص ژن *fimA* شکل2F: چاهک شماره ۱ سایز مارکر 100 bp شماره ۲ محصول PCR شماره ۳ کنترل منفی شکل G ۲: نتایج تعین حساسیت و حد تشخیص ژن 16s rRNA *باکتری P.intermedia*

نتایج تعیین حساسیت و حد تشخیص (LOD) واکنش PCR ژن *16s rRNA* باکتری *P.intermedia*

آخرین رقتی از پلاسمید حامل *ژن 16s rRNA باکتری P.intermedia* که باند قابل مشخص را ایجاد نمود $۱۰^{-۴}$ (۳۸ fg) بود (شکل 2G). کمترین تعداد کپی قابل‌تشخیص مربوط به این ژن عدد ۱۱۰۰۰ تعیین گردید. این عدد نشان می‌دهد که پرایمرهای طراحی‌شده قادر به ردیابی ۱۱۰۰۰ کپی از ژنوم در یک واکنش PCR ۲۵ میکرولیتری هستند.

نتایج به‌دست‌آمده از ست آپ واکنش PCR، کلونینگ و استخراج پلاسمید دارای ژن *16s rRNA* باکتری

T .forsythensis با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی مراز و الکتروفورز محصول بر روی ژل آگاروز ۲٪، مطابق انتظار باندی برابر ۲۵۰ جفت باز به دست آمد. شکل ۳*H* نتیجه این الکتروفورز را نشان می‌دهد.

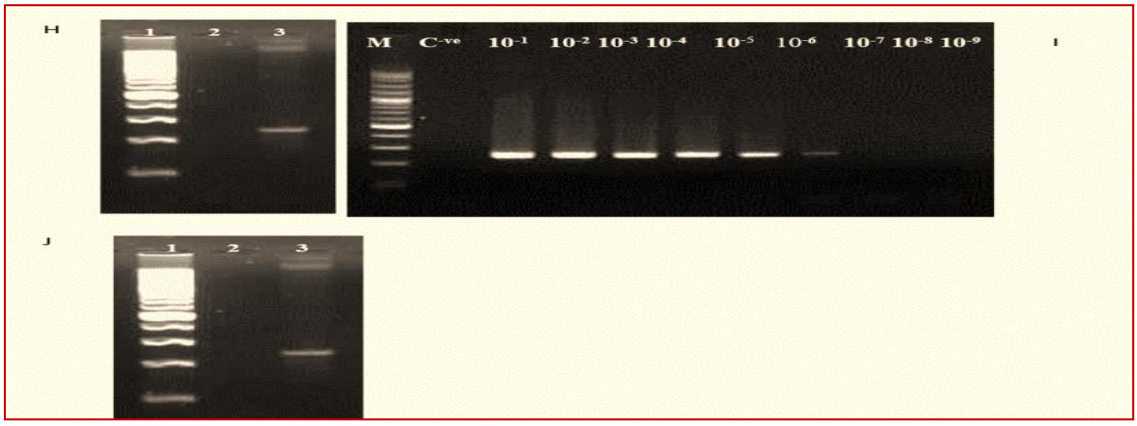
نتایج تعیین ویژگی واکنش PCR ژن 16s rRNA *باکتری T .forsythensis* تعیین ویژگی روش با استفاده از انجام PCR به کمک پرایمرهای ژن هدف و البته در حضور ژنوم پانلی از باکتری‌های کنترل منفی انجام گرفت.

نتایج تعیین حساسیت و حد تشخیص (LOD) واکنش PCR ژن 16s rRNA باکتری *T. forsythensis*

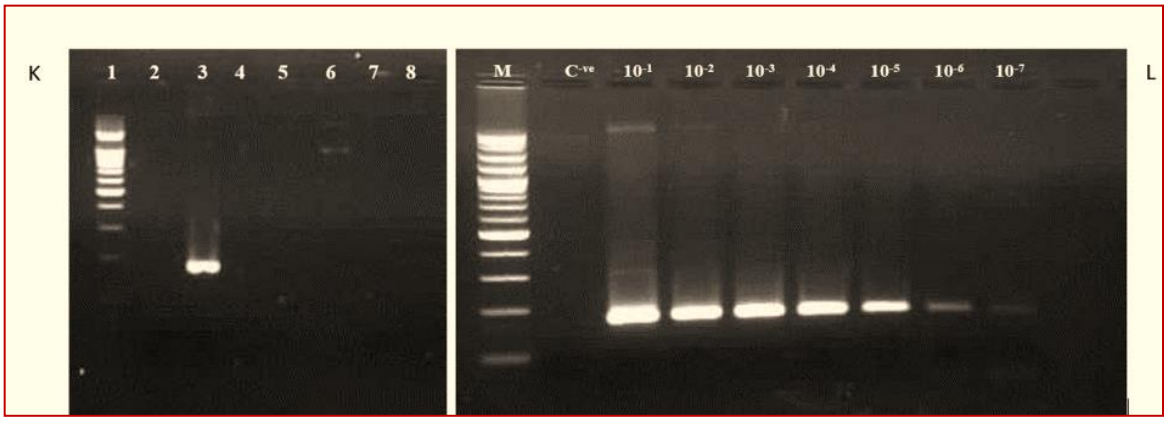
آخرین رقتی از پلاسمید حامل ژن *16s rRNA باکتری T.forsythensis* که باند قابل مشخص را ایجاد نمود 10^{-5} (f g ۴/۲) بود (شکل ۳I). کمترین تعداد کپی قابل‌تشخیص مربوط به این ژن عدد ۱۲۰۰ تعیین گردید. این عدد نشان می‌دهد که پرایمرهای طراحی‌شده قادر به ردیابی ۱۲۰۰ کپی از ژنوم در یک واکنش PCR ۲۵ میکرولیتری هستند. نتایج به‌دست‌آمده از واکنش PCR، کلونینگ و استخراج پلاسمید دارای ژن 16s rRNA باکتری *T.denticola* از واکنش زنجیره‌ای پلی مراز و الکتروفورز محصول بر روی ژل آگاروز ۲٪، مطابق انتظار باندی برابر ۱۷۳ جفت باز به دست آمد. شکل ۳J نتیجه این الکتروفورز را نشان می‌دهد.

نتایج تعیین ویژگی واکنش *PCR* ژن *16s rRNA باکتری T.denticola*

تعیین ویژگی روش با استفاده از انجام PCR به کمک پرایمرهای ژن هدف و البته در حضور ژنوم پانلی از باکتری‌های کنترل منفی انجام گرفت (شکل ۴K).



شکل **۳H**- چاهک شماره ۱ سایز مارکر 100 bp شماره ۲ کنترل منفی. شماره ۳ محصول PCR ژن *16s rRNA* شکل **۳I**. نتایج تعین حساسیت و حد تشخیص ژن 16s rRNA باکتری *forsythensis* شکل **۳J**. چاهک شماره ۱ سایز مارکر 100 bp شماره ۲ محصول PCR



شکل ۴K- چاهک شماره ۱: سایز مارکر ۱۰۰bp، شماره ۲: کنترل منفی،۳: کنترل مثبت باند ۱۷۳ جفت بازی مربوط به تکثیر ژن *16s rRNA*، شماره ۴ تا ۸: به ترتیب ژنوم باکتری‌های *B.subtilis*، *E.faecalis*، *S.aureus*، *P.aerogenosa*، *E.coli* **شکل ۴L**. نتایج تعین حساسیت و حد تشخیص ژن *16s rRNA* باکتری *T.denticola*

نتایج تعیین حساسیت و حد تشخیص (LOD) واکنش PCR ژن 16s rRNA باکتری T.denticola

آخرین رقتی از پلاسمید حامل ژن *16s rRNA باکتری T.denticola* که باند قابل مشخص را ایجاد نمود 10^{-6} (۳۵ fg) بود (شکل 4L). کمترین تعداد کپی قابل‌تشخیص مربوط به این ژن عدد ۱۰۰۰۰ تعیین گردید. این عدد نشان می‌دهد که پرایمرهای طراحی‌شده قادر به ردیابی ۱۰۰۰۰ کپی از ژنوم در یک واکنش PCR ۲۵ میکرولیتری هستند.

بحث

میکروب‌هایی که در حفره دهانی تکثیر می‌کنند شامل گروه‌های متنوعی از باکتری‌ها هستند که هر یک از گونه‌ها نیازهای فیزیکی ـ شیمیایی و تغذیه‌ای خود را برای رشد طلب می‌کنند. برای باکتری‌های دهان که با موفقیت در آزمایشگاه رشد داده می‌شود، شرایط نگهداری آن‌ها باید طوری باشد که نیازهای مختلف آن‌ها را پاسخ دهد اما مطالعات میکروسکوپی اولیه بیان می‌داشت که بخش عمده‌ای از این باکتری‌ها را نمی‌توان در آزمایشگاه کشت داد. معرفی روش‌های نوکلئیک اسیدی که نیازی به کشت نداشتند طیف وسیع‌تری از باکتری‌های دهانی را شناسایی کرد. در میکروبیولوژی دهان شناسایی و تعیین مشخصه کردن ارگانیسم‌های مختلف درگیر در عفونت‌های مختلف دهان ضروری است. بدون شک چنین اطلاعاتی برای پیگیری پیشرفت بیماری مفید است (۱۵، ۱۶). روش‌های سریع و مطمئن شناسایی میکروارگانیسم‌ها برای بررسی ارتباط بین باکتری‌های حفره دهانی و بیماری‌های پریودنتال مفید است. تکنیک‌های رایج برای تشخیص این عوامل شامل کشت، روش‌های ایمونولوژیک و مولکولی است. روش‌های کشت وقت‌گیر و گران هستند و ممکن است در رشد برخی از ارگانیسم‌های مهم شکست بخورند (۱۷). یکی از مشکلات نسبی تشخیص میکروارگانیسم‌های دهانی تهیه نمونه کلینیکی است که گاهی اوقات به تکنیک‌های خاصی نیاز دارد. در سال ۲۰۰۷ Khalil Boutaga و همکاران نمونه‌های ساب ژنژیوال و شستشوی دهان را برای تشخیص و شمارش پاتوژن‌های پریودنتال به‌وسیله تکنیک Real time PCR مقایسه کردند و نشان دادند که علاوه بر وقت‌گیر نبودن تهیه نمونه شستشوی دهان، این نمونه برای تشخیص این میکروارگانیسم‌ها کاملاً مناسب است (۱۸). در سال ۲۰۰۳ Khalil Boutaga و همکاران روش‌های کشت و Real-time PCR را برای تشخیص Porphyromonas gingivalis در نمونه پلاک‌های ساب ژینژیوال مقایسه کردند. آن‌ها نتیجه گرفتند علاوه بر اینکه Real-time PCR نتایج کشت کمی را تائید می‌کند مزایایی مانند سرعت و حساسیت برای تشخیص این باکتری را نیز دارد (۱۹-۲۱). اخیراً روش‌های Real-time PCR برای تشخیص انواعی از میکروارگانیسم‌ها شامل باکتری‌ها، انگل‌ها و ویروس‌های بیماری‌زای انسانی مورداستفاده قرارگرفته است (۲۲-۲۵). واکنش Real-time PCR با استفاده از سیستم Taq-man موجب اندازه‌گیری پیوسته محصولات در یک تیوب بسته می‌شود (با استفاده از فعالیت اگزونوکلئازی ′۵→′۳ آنزیم Taq DNA polymerase و با کمک پروب) (۴). در سال ۱۹۹۶ Ashimoto A و همکاران برای تعیین شیوع باکتری‌های مرتبط با بیماری‌های پریودنتال از روش PCR مبتنی بر ژن 16s rRNA استفاده کردند. آن‌ها در این مطالعه شیوع باکتری‌های *Actinobacillus actinomycetemcomitans, Bacteroides forsythus, Campylobacter rectus, Eikenella corrodens, Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia, Prevotella nigrescens* و *Treponema denticola* را در ۵۰ بیمار مبتلا به پریودنتایتیس پیشرفته، ۵۰ فرد بالغ با ژنژیوایتیس جزئی و ۵۰ کودک مبتلا به ژنژیوایتیس جزئی بررسی کردند. مطالعه آن‌ها مفید بودن روش PCR مبتنی بر ژن 16s rRNA را برای تشخیص میکروارگانیسم‌های مهم ساب ژنژیوال را نشان داد، همچنین نتایج آن‌ها ارتباط قوی بین گونه‌های موردبررسی و بیماری پریودنتال را نشان داد (۵). در سال ۲۰۰۲ Yasuyuki Asai و همکاران از روش‌های PCR اختصاصی گونه برای تشخیص ترپونماهای دهانی مانند *Treponema denticola, Treponema vincentii, Treponema medium* در نمونه‌های پلاک ساب ژنژیوال انسانی استفاده کردند. آن‌ها همچنین تعداد هر ارگانیسم را با استفاده از روش Taqman Real-time PCR اندازه‌گیری کردند (۴). در سال ۲۰۰۳ Mario Julio از روش PCR برای شناسایی چهار عامل پریودنتوپاتوژن در نمونه‌های کلینیکی استفاده کرد. او نشان داد که محصول PCR هر یک از ژن‌های هدف یک باند منفرد ایجاد می‌کند و این روش می‌تواند با حساسیت مناسب برای شناسایی ارگانیسم‌های پریودنتال در نمونه‌های کلینیکی بکار رود (۲۶). محققی به نام Wahlfors و همکاران یک واکنش MPCR طراحی کرده‌اند که توانایی شناسایی ۵ تا ۵۰ عدد از باکتری‌های *Actinomycetemcomitans* و *P.gingivalis* را دارد (۲۷). در

سال‌های اخیر دانشمندی به نام Garcia و همکاران از مکزیک موفق به شناسایی پاتوژن‌های پریودنتال مثل *A.actinomycetemocomitans*، *P.gingivalis* و *Prevotella.intermedia* شدند. هرچند روشی که آن‌ها استفاده کردند قادر به شناسایی *B.forsythus* نبود (۲۸). در سال ۲۰۰۰ در مرکز میکروبیولوژی و دانشکده دندانپزشکی در توکیو با استفاده از MPCR در بین ۶۰ بیمار با استفاده از 16s rRNA، باکتری‌های *B.forsythus, T.denticolla, P.gingivalis* را در سنین مختلف بررسی کردند در این مطالعه به بررسی نسبت این باکتری‌ها با سنین مختلف و به رابطه بیماری با سن پرداختند. همچنین در تحقیقاتی که به‌منظور رابطه سن و بیماری پریودنتال انجام شد Rodenburg و همکاران گزارش دادند که سن یکی از فاکتورهای خطر برای عفونت *P.gigivalis* است (۲۹). سال ۲۰۰۶ در بخش میکروب‌شناسی پزشکی در دانشگاه چین با دو روش M-PCR به شناسایی ژن‌های 16SrRNA و ژن‌های *prtc, fimA,* از *P.gigivalis* و همچنین 16SrRNA و ژن‌های *lkta, fap* *A.actinomycetemcomitans* پرداختند. در مطالعاتی مشابه در بوستون ایالات‌متحده توسط F.Foshi و همکاران در سال ۲۰۰۶ بر روی *Treponema denticola*، با ایجاد عفونت در موش با این باکتری بعد از ۲۱ روز متوجه عفونت شدید در موش‌ها شدند و توانستند از کبد و قلب چند بخش دیگر این باکتری را جدا کنند (۲۶، ۲۷). در یک مطالعه Mitchell-Lewis و همکاران عنوان نمودند که میزان پاتوژن‌های ایجادکننده بیماری پریودنتال از قبیل *Campylobacter. rectus, Tanerela.forsitus* در پلاک میکروبی و زیرلثه‌ای مادرانی که زایمان زودرس داشته و نوزادانی با وزن کمتر از حد طبیعی به دنیا آوردند بیشتر بوده است (۳۲-۲۹).

Roberts SA, Shore KP, Paviour SD, Holland D, Morris AJ طی مطالعات مختلفی از سال ۱۹۹۰ تا ۲۰۰۷ نشان داده‌اند که نمونه‌های تهیه‌شده از حفره دهان عمدتاً به‌صورت چند میکروبی بوده و تقریباً حدود ۳۰ تا ۳۸ درصد ارگانیسم‌های جداشده شامل بی‌هوازی اجباری است (۳۳). در مطالعه حاضر برای دستیابی به روش‌های تشخیص سریع، دقیق و حساس پاره‌ای از مهم‌ترین باکتری‌های پاتوژن دهانی، روش مولکولی PCR برای هر یک از آن‌ها طراحی گردید. انتخاب ژن هدف تشخیصی در روش‌های مولکولی سنگ بنای اصلی طراحی محسوب می‌گردد. یک ژن دارای ارزش تشخیصی علاوه بر منحصر بودن برای باکتری هدف بایستی در تمام سویه‌های باکتری هدف حفاظت‌شده باشد. بررسی متون و مقالات مختلف نشان داد که ژن *hbpA* برای باکتری *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*و ژن *fimA* برای باکتری *Porphyromonas gingivalis*، اختصاصی بوده و دارای ارزش تشخیصی است. همچنین بررسی متون نشان داد که می‌توان از نواحی حفاظت‌شده ژن‌های *16s rRNA* در باکتری‌های *Prevotella intermedia*، *Tannerella forsythensis* و *Treponema denticola* برای تشخیص استفاده نمود. برای اطمینان از اینکه هر یک از روش‌های طراحی‌شده قادر به تشخیص همه‌سویه‌های مربوطه است همه سکانس‌های مربوطه از پایگاه اطلاعاتی GeneBank استخراج و تراز بندی و قسمت‌های محافظت‌شده با استفاده از نرم‌افزار معتبر CLC Main Workbench 5.5 version به دست آمد و نهایتاً طراحی پرایمر با نرم‌افزار معروف AlleleID version 7.60 انجام شد. سرانجام برای اطمینان از ویژگی پرایمرها از سرویس BLAST و Primer BLAST مربوط به NCBI استفاده گردید. مسیر فوق تضمین می‌نماید که پرایمرهای فوق ازهرجهت صلاحیت استفاده در تشخیص میکروارگانیسم مربوطه را دارند.

نتیجه‌گیری

دو خصوصیت مهم روش‌های تشخیصی که نشان‌دهنده کارایی آن‌ها است حساسیت و ویژگی آنالیتیکال است. گرچه روش‌های مختلفی برای تعیین آن‌ها معرفی‌شده است اما هر یک از آن‌ها دارای نقاط ضعفی است. در این پروژه برای به دست آوردن بهترین نتیجه از روش‌های معتبری که توصیه‌شده توسط CLSI است استفاده‌شده است. برای مثال برای تعیین حد تشخیص از کلونینگ ژن هدف در وکتور پلاسمیدی و تهیه رقت سریال استفاده‌شده که همان‌طور که قبلاً ذکر شد از دقت بالاتری نسبت به سایر روش‌ها برخوردار است.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از مسئولین دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم که شرایط اجرای فعالیت‌های پژوهشی برای انجام این طرح با کد ۵۱۵۴۳۸۸۰۸۰۶۰۰۹ را فراهم آوردند صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده‌اند.

References

1. Dumitrescu AL, Inagaki K, Kawamura M. Etiology and pathogenesis of periodontal disease: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2010. DOI: 10.1007/978-3-642-03010-9
2. Busscher HJ, Evans LV. Oral Biofilms and Plaque Control: 1 edition;American, CRC Press;1998 ISBN-10: 9057023911.
3. Dumitrescu AL, Kobayashi J. Genetic Variants in Periodontal Health and Disease. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2010. ISBN: 978-3-642-00679-1
4. Asai Y, Jinno T, Igarashi H, Ohyama Y, Ogawa T. Detection and quantification of oral treponemes in subgingival plaque by real-time PCR. Journal of clinical microbiology. 2002;40(9):3334.
5. Ashimoto A, Chen C ,Bakker I, Slots J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. Oral microbiology and immunology. 1996;11(4):266-73.
6. Avila-Campos MJ. PCR detection of four periodontopathogens from subgingival clinical samples. Brazilian Journal of Microbiology. 2003;34(1):81-4.
7. Boutaga K, Savelkoul PHM, Winkel EG, van Winkelhoff AJ. Comparison of subgingival bacterial sampling with oral lavage for detection and quantification of periodontal pathogens by real-time polymerase chain reaction. Journal of periodontology. 2007;78(1):79-86.
8. Boutaga K, Van Winkelhoff AJ, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Savelkoul PHM. Comparison of real-time PCR and culture for detection of Porphyromonas gingivalis in subgingival plaque samples. Journal of clinical microbiology. 2003;41(11):4950.
9. Boutaga K, Winkelhoff AJ, Vandenbroucke Grauls CMJE, Savelkoul PHM. Periodontal pathogens: A quantitative comparison of anaerobic culture and real time PCR. FEMS Immunology & Medical Microbiology. 2005;45(2):191-9.
10. Duarte PM, Tezolin KR, Figueiredo LC, Feres M, Bastos MF. Microbial profile of ligature-induced periodontitis in rats. Archives of Oral Biology. 2010;55(2):142-7.
11. Paster BJ, Olsen I, Aas JA, Dewhirst FE. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. Periodontology. 2006;42(1):80-7.
12. Kielty P. Oral biology: molecular techniques and applications. British Dental Journal. 2011;211(1):4.7
13. Dumitrescu AL, Kobayashi J. Genetic variants in periodontal health and disease: Springer Verlag; 2009. ISBN: 978-3-642-00679-1
14. Ausubel FM, Brent R, Kingston R, Moore D, Seidman J, Smith J, et al. Short protocols in molecular biology: a compendium of methods from current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons library; 2002. ISBN 0-471-13781-2.
15. Chen BY, Janes HW. PCR cloning protocols: Part of the Methods in Molecular Biology™ book series, volume 192,Humana PuertoRico Inc; 2002. pp 19-29
16. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. Molecular Cloning A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2012, ISBN 978-1-936113-41-5
17. Škulj M, Okršlar V, Jalen Š, Jevševar S, Slanc P, Štrukelj B, et al. Improved determination of plasmid copy number using quantitative real-time PCR for monitoring fermentation processes. Microbial cell factories. 2008;7(1):6.
18. Khalil Boutaga ,Paul H.M. Savelkoul ,Edwin G. Winkel ,Arie J. van Winkelhoff, Comparison of Subgingival Bacterial Sampling With Oral Lavage for Detection and Quantification of Periodontal Pathogens by Real-Time Polymerase Chain Reaction, journal of periodontology,2007,14(25): 79-86
19. Khalil Boutaga,Arie Jan van Winkelhoff,Christina M J E Vandenbroucke-Grauls,Paul H M Savelkoul, Comparison of Real-Time PCR and Culture for Detection of Porphyromonas gingivalis in Subgingival Plaque Samples.Journal of Clinical Microbiology.2003;41(11):4950-4

20. Abdul-Careem MF, Hunter BD, Nagy E, Read LR, Sanei B, Spencer JL, et al. Development of a real-time PCR assay using SYBR Green chemistry for monitoring Marek's disease virus genome load in feather tips. Journal of Virology Methods. 2006;133(1):34-40. Epub 2005/11/23.
21. Amer HM, Almajhdi FN. Development of a SYBR Green I based real-time RT-PCR assay for detection and quantification of bovine coronavirus. Molecular Cell Probes. 2011;25(2-3):101-7. Epub 2011/03/23.
22. Andresen K, Dargis R, Kemp M, Christensen JJ. Detection of Burkholderia pseudomallei by SYBR green real time PCR. The Open Pathology Journal. 2009;3:30-2.
23. Anniballi F, Auricchio B, Delibato E, Antonacci M, De Medici D, Fenicia L. Multiplex real-time PCR SYBR Green for Detection and Typing of Group III Clostridium botulinum. Veterinary microbiology, 2011;154(3-4):332-338
24. Beuret C. Simultaneous detection of enteric viruses by multiplex real-time RT-PCR. Journal of virological methods. 2004;115(1):1-8.
25. Bustin S, Mueller R. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. Clinical Science. 2005;109:365-79.
26. Dash PK, Boutonnier A, Prina E, Sharma S, Reiter P. Development of a SYBR green I based RT-PCR assay for yellow fever virus: application in assessment of YFV infection in Aedes aegypti. Virology journal. 2012;9(1):27.
27. Wahlfors J, Meurman J, Väisänen P, Alakuijala P, Korhonen A, Torkko H, et al. Simultaneous detection of Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis by a rapid PCR method. Journal of dental research. 1995;74(11):1796-801.
28. Garcia L, Tercero JC, Legido B, Ramos JA, Alemany J, Sanz M. Rapid detection of Actinobacillus actinomycetemcomitans, Prevotella intermedia and Porphyromona gingivalis by multiplex PCR. Journal of periodontal research. 1998;33(1):59-64.
29. Rodenburg J, Winkelhoff A, Winkel E, Goene R, Abbas F, Graaff J. Occurrence of Bacteroides gingivalis ,Bacteroides intermedius and Actinobacillus actinomycetemcomitans in severe periodontitis in relation to age and treatment history. Journal of clinical periodontology. 1990;17(6):392-9.
30. Foschi F, Izard J, Sasaki H, Sambri V, Prati C, Müller R, et al .Treponema denticola in disseminating endodontic infections. Journal of dental research. 2006;85(8):761.
31. Foschi F, Cavrini F, Montebugnoli L, Stashenko P, Sambri V, Prati C. Detection of bacteria in endodontic samples by polymerase chain reaction assays and association with defined clinical signs in Italian patients. Oral microbiology and immunology, 2005;20(5):289-95.
32. Mitchell-Lewis D, Engebretson SP, Chen J, Lamster IB, Papapanou PN. Periodontal infections and pre-term birth: early findings from a cohort of young minority women in New York. European Journal of Oral Sciences, 2001;109(1):34-9.
33. Morris A, Steele J, White D. Adult dental health survey: the oral cleanliness and periodontal health of UK adults in 1998. British Dental Journal, 2001.191(4):92-186

Original Article

Designing Polymerase Chain Reaction for Molecular Diagnostics of the Primary Bacterial Cause of Periodontitis

Soleimani M[1, 2], Zolfaghari MR[3], Morovvati A[4*]

1. Department of Microbiology, Faculty of Medicine, AJA University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2. Tasmin Biotechnology Research Center (TBRC), Faculty of Medicine, AJA University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3. Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran
4. Department of Microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran

Received: 21 Apr 2020 Accepted: 13 Jul 2020

Abstract

Background & Objective: Periodontal disease, which can become a chronic condition, is an inflammatory disease that upsets the soft and hard structures supporting the teeth. The aim of the present study was to design and develop an in-house PCR Method, to detect putative periodontitis-related bacterial pathogens.

Materials & Methods: The PCR method was launched using specific primers of the five bacteria including *Aggregatibacter actinomycetemcomitans, Prevotella intermedia, Tannerella forsythia, Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola*. Then, the sensitivity and specificity tests were performed for each bacterium after cloning.

Results: Basic specific Primer: *hbp Aggregatibacter actinomycetemcomitans ,fimA Porphyromonas gingivalis* ,gene 16s rRNA *Prevotella intermedia* 16s rRNA *Tannerella forsythensis* gene and 16s rRNA *Treponema denticola* 161 bp ,162 bp, 282 bp, 280 bp,173 bp and the sensitivity and specificity tests were performed for this gene.

Conclusion: In order to evaluate and diagnose periodontal diseases using PCR technique, these factors can be identified with high specificity and sensitivity.

Keywords: Polymerase chain Reaction, Periodontal, Molecular diagnostics

***Corresponding Author: Morovati Abbass**, Department of Microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran
Email: Abbasmorovvati@gmail.com
https://orcid.org/0000-0002-9221-7084

Journal of Fasa University of Medical Sciences 10 (2020): 2567-2577