مقاله پژوهشی

تشخیص *کلبسیلا پنومونیه* از طریق توالی اختصاصی 16S rDNA با استفاده از تکنیک PCR-ELISA

فاطمه طیبه[۱،۲]، جعفر امانی[۱*]، مهدی مرادیار[۲]، سید علی میر حسینی [۱]

۱- مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران.

۲- گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد دامغان، دامغان، ایران.

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۰۵/۱۵ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۱۰/۱۴

چکیده

زمینه و هدف: *کلبسیلا پنومونیه* از اعضای خانواده‌ی انتروباکتریاسه یکی از مهم ترین عامل‌های عفونت‌های بیمارستانی می‌باشد که بعد از *Escherichia coli* دومین عامل باکتریمی بیمارستانی ناشی از باکتری‌های گرم منفی است. در این تحقیق هدف شناسایی این باکتری از طریق ژن اختصاصی 16SrDNA با به کارگیری تکنیک PCR-ELISA می باشد.

مواد و روش‌ها: در این روش با استفاده از dNTP نشان‌دار شده با دیگوکسی ژنین برای تکثیر ژن اختصاصی استفاده شد. کف پلیت الایزا استرپتوآویدین بارگذاری کرده سپس با استفاده از پروب اختصاصی که قسمت ابتدای آن بیوتینه شده بود جهت اتصال به ژن تکثیر شده استفاده گردید. بیوتین متصل به پروب به استرپتوآویدین متصل شده، همچنین ژن تکثیر یافته نیز به پروب اختصاصی متصل شده در نهایت از آنتی بادی ضد دیگوکسی ژنین برای شناسایی محصول استفاده شد و واکنش با دستگاه نور سنج اندازه گیری شد.

نتایج: با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن 16SrDNA *کلبسیلا پنومونیه* تکثیر شد که نتیجه آن یک قطعه به طول ۲۶۰ bp بود. نتایج حاصل از PCR-ELISA نشان داد که این تکنیک هیچ واکنش متقاطعی با با کتری‌های هم خانواده خود ندارد، همچنین میزان حساسیت آن ۰/۶ نانوگرم ارزیابی شد.

نتیجه‌گیری: تکنیک PCR-ELISA روشی حساس و دقیق بوده که برای شناسایی عوامل بیماری‌زا با استفاده از ژن اختصاصی آن باکتری به کار می‌رود. این تکنیک می‌تواند جایگزین مناسبی برای تکنیک‌های زمان بر، با حساسیت کمتر و هزینه بیشتر، همچون روش‌های کشت باکتری در محیط‌های بلاد آگار و مک کانکی آگار، Realtime PCR ، تست‌های بیوشیمیایی افتراقی که امروزه در آزمایشگاه‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد، باشد.

کلمات کلیدی : **انتروباکتریاسه، *کلبسیلا پنومونیه* ، *16SrDNA* ، PCR-ELISA**

مقدمه

کلبسیلا پنومونیه یک پاتوژن فرصت طلب گرم منفی و از اعضای خانواده انتروباکتریاسه و یکی از ۷ گونه موجود در جنس کلبسیلا می‌باشد (۱، ۲). *کلبسیلا پنومونیه* دارای رابطه‌ی ژنتیکی نزدیکی با سایر جنس‌های این خانواده نظیر اشریشیا، سالمونلا، شیگلا و یرسینیا می‌باشد.کلبسیلا از جمله باکتری‌های مقاوم به آنتی بیوتیک است (۳) . باکتری *کلبسیلا پنومونیه* امروزه به عنوان یک پاتوژن فرصت طلب و یکی از مهم ترین باکتری‌های دخیل در عفونت‌های بیمارستانی مطرح می‌باشد و عفونت‌های ناشی از آن در بخش کودکان و مراقبت‌های ویژه معضل بزرگی ایجاد می‌نماید (۴، ۵). میزان مرگ و میر ناشی از این باکتری بالا بوده و باعث بیماری‌های مختلفی مانند عفونت دستگاه ادراری (۶)، باکتریمی، سپتی سمی (۷)، اسهال، پنومونی، ایجاد آبسه در کبد، اندوفتالیت و مننژیت در بیماران بستری در بخش‌های مختلف بیمارستان می‌شود (۸-۱۰). بیماران بستری با نقص سیستم ایمنی و مبتلا به بیماری‌های زمینه‌ای از جمله دیابت ملیتوس، اختلالات ریوی مزمن و نوزادان به دلیل نداشتن

*نویسنده مسئول: **جعفر امانی**، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران.
Email: Jafar.amani@gmail.com

سیستم ایمنی کامل، اهداف عمده این باکتری هستند (۱۱). *کلبسیلا پنومونیه* دومین عامل باکتریمی بیمارستانی ناشی از باکتری‌های گرم منفی پس از اشرشیاکلی گزارش گردیده است (۱۲) . در تشخیص عفونت‌ها در نمونه‌های بالینی، شناسایی عامل عفونی وتشخیص دقیق آن در زمانی بسیار کوتاه، در سلامت و بهبودی بیمار از اهمیت زیادی برخوردار است و چنین روش و پاسخی خواست همه‌ی متخصصان آزمایشگاه و پزشکان است. تاکنون شناسایی کلبسیلا با استفاده از روش‌های میکروبیولوژیک از جمله رنگ آمیزی گرم، انجام تست‌های بیوشیمیایی، استفاده از محیط‌های افتراقی و اختصاصی، واکنش زنجیره پلیمراز و دیگر تکنیک‌های همراه با آن از جمله (Restriction fragment length polymerase) RFLP، Quellung Test (واکنش اختصاصی آنتی بادی با کپسول باکتری) و Real Time PCR صورت می‌گرفت (۱۳-۱۵). این روش‌ها دارای معایب خاص خود از قبیل صرف زمان، هزینه نسبتا زیاد و محدودیت در تعداد نمونه‌های تشخیصی هستند. علاوه بر این در روش‌های مبتنی بر PCR به دلیل استفاده از آگارز و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید (Diamino-5-ethyl-6-phenanthridinium-38-bromid) خطر آلودگی پرسنل آزمایشگاهی و همچنین محیط بالا می‌رود. طراحی و انجام یک روش مولکولی که در زمان کوتاه، وجود عفونت باکتریایی را تعیین کرده و گونه‌ی باکتری بیماری‌زا را تعیین می‌نماید، هدف این مطالعه می‌باشد (۱۶).

روش PCR-ELISA سرعت و حساسیت تشخیص را بالا برده و می‌تواند مقادیر اندک توالی‌های اختصاصی ژن بیماری‌زا را در زمانی کوتاه شناسایی کند. بررسی هم زمان تعداد بیشتری از نمونه‌ها در این روش نسبت به روش‌های فوق الذکر امکان پذیر است، که باعث افزایش سرعت در کار میشود. استفاده کردن از دیگوکسی ژنین غیر رادیو اکتیو برای نشاندار کردن محصولات PCR (Digoxigenin-11-dUTP,alkali-labile)، به جهت نشان‌دار کردن محصول PCR، در توالی DNA جایگزین دزوکسی یوراسیل شده) از دیگر مزایای این روش بوده که خطر استفاده از مواد رادیواکتیو که مسلما جهش زا بوده را کاهش می‌دهد (۱۷). در نهایت در روش PCR-ELISA با طراحی پرایمر و تکثیر ژن مورد نظر و سپس طراحی پروب نشاندار شده با بیوتین، حاوی توالی مکمل اختصاصی ژن تکثیر یافته، امکان خطا بسیار کاهش می‌یابد. در واقع اگر پرایمرها توالی غیر اختصاصی را تکثیر کرده باشند، به وسیله پروب نشاندار می‌توان به نتیجه‌ی آزمایش اطمینان حاصل کرد (۱۸).

در این تحقیق با طراحی پرایمر اختصاصی برای ژن *16SrDNA* و تکثیر آن با DIG-dUTP با استفاده از واکنش زنجیره پلیمراز (PCR) تکثیر انجام گرفت، سپس با استفاده از آنتی بادی ضد دیگوکسی ژنین محصول PCR نشان‌دار با استفاده از PCR-ELISA تشخیص داده شد. این تکنیک یک روش سریع و حساس و با معایب کمتر نسبت به روش‌های اشاره شده برای شناسایی کلبسیلا می‌باشد.

مواد و روش‌ها

کشت باکتری و استخراج ژنوم: برای انجام این پروژه ابتدا سویه باکتری *کلبسیلا پنومونیه* ، بدون کد بین‌المللی از آزمایشگاه رفرانس تهیه و در محیط LB کشت داده شد. برای این منظور مقداری از باکتری را از استوک موجود برداشته در محیط LB حل و به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷°C در شیکر انکوباتور قرار داده شد. پس از کشت *کلبسیلا پنومونیه* در محیط LB، ۱/۵ میلی لیتر از آن را سانتیریفوژ کرده، سپس به روش نمک زدایی (C-TAB) ژنوم استخراج گردید. ۵ میکرولیتر از محصول را روی آگارز برده تا از تخلیص ژنوم اطمینان حاصل شود (۱۹).

طراحی پرایمر و پروب: توالی اختصاصی ژن 16 SrDNA به عنوان توالی هدف انتخاب و با استفاده از نرم افزار Oligo 7 و primer 3 plus پرایمرها و پروب طراحی شد (جدول ۱) و دمای اتصال، دایمر و لوپ آغازگرها مورد بررسی قرار گرفت. پرایمر

جدول ۱. پرایمرها و پروب طراحی شده از ژن 16S rDNA

Primer/Probe	Sequence
Forward	5’-GCAAGTCGAGCGGTAGCACAG-3’
Reverse	5’-CAGTGTGGCTGGTCATCCTCTC-3’
Probe	5´-Biotin- TAATACCGCATAACGTCGCA-3´

Forward و پرایمر Reveres برای تکثیر قطعه ۲۶۰ bp استفاده شد. پروب برای تایید محصول PCR طراحی گردید.

واکنش PCR: واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر صورت گرفت. واکنش شامل ۲/۵ ماکرولیتر ۱۰X PCR buffer، ۱/۵ میکرولیتر $MgCl_2$، ۱/۵ میکرولیتر از dNTP نشان‌دار با Digoxigenini، ۱/۵میکرولیتر از هر پرایمر، ۱ میکرولیتر ژنوم استخراج شده و ۰/۲ میکرولیتر آنزیم Taq DNA polymerase می‌باشد. در انتها با استفاده از آب مقطر حجم نمونه به ۲۵ میکرلیتر رسانده شد. واسرشتگی اولیه در دمای ۹۵°C به مدت ۵ دقیقه، سپس ۳۰ چرخه شامل ۴۵ ثانیه دمای ۹۵°C واسرشتگی، ۴۵ ثانیه دمای ۹۵°C اتصال و ۱ دقیقه ۷۲°C تکثیر انجام گرفت. دمای تکثیر نهایی ۷۲ درجه سانتی گراد و به مدت ۵ دقیقه در نظر گرفته شد. نهایتا محصول PCR را بر روی آگارز برده و با نشانگر ۱۰۰ bp اندازه محصول به دست آمده با ژن مورد نظر که ۲۶۰bp می‌باشد، مقایسه گردید.

PCR-ELISA: برای شناسایی محصولات نشان‌دار شده با دیگوکسی ژنین از کیت شناسایی DIG Detection، PCR-ELISA استفاده شد. کف چاهک‌ها با استرپتو اویدین پوشانیده، سپس با PBST سه مرتبه شستشو انجام شد. برای تهیه Blocking، ۳۰ میلی گرم skim milk در ۱ میلی لیتر PBST حل کرده و به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر اضافه گردید.کیت الایزا به مدت ۴۵ دقیقه در ۳۷°C قرار گرفت. بعد از آن پروب بیوتینه را افزوده، محصول PCR به وسیله جوشاندن تک رشته و داخل چاهک‌ها منتقل گردید و در نهایت Anti-DIG اضافه شد. به مدت ۱ ساعت در ۳۷°C قرار گرفت. سه مرتبه با PBST شستشو انجام شد. سپس ۱۰۰µl سوبسترا به هر چاهک افزوده، به محض رنگ گرفتن نمونه با استفاده از اسید سولفوریک ۱/۵ مولار واکنش متوقف و با استفاده از دستگاه ELISA Reader در طول موج ۴۵۰ نانومتر OD محاسبه گردید (۲۰، ۲۱)

تعیین حساسیت تکنیک PCR-ELISA : برای این منظور، از محصولات PCR ژن 16SrDNA نشان‌دار پس از تعیین غلظت سریال رقت بر حسب نانو گرم تهیه و یک چاهک به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد و بقیه مراحل همانند بند ۴ انجام و توسط دستگاه خوانندهٔ الایزا (ELISA reader) اندازه گیری شد.

تعیین میزان اختصاصیت تکنیک PCR-ELISA : برای بررسی اختصاصیت از دیگر اعضای خانواده انتروباکتریاسه از جمله Escherichia coli، Shigella، pseudomonas aeruginosa و Enterotoxigenic Escherichia coli O157:H7 به وسیله پرایمرهای طراحی شده PCR و سپس PCR-ELISA انجام شد.

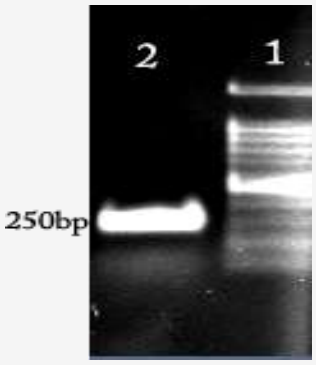
نتایج

بررسی اختصاصیت آغازگرها و کاوشگر: بررسی قطعه ژنی 16SrDNA *کلبسیلا پنومونیه* نشان داد که این ژن با سایر گونه‌های کلبسیلا هم‌خوانی ندارد. برای این منظور از NCBI BLAST استفاده شد. Accession Number ژن مورد نظر را در Nucleotide Blast وارد کرده و مشاهده شد این قطعه اختصاصی *کلبسیلا پنومونیه* می‌باشد. توالی این ژن در Gene Bank نیز بررسی شد. از این رو پرایمرهای Forwards و Reverse از روی این ژن طراحی گردید. به منظور طراحی پروب سعی شد که توالی آن تقریبا در وسط قطعه‌ی انتخاب شده قرار گیرد تا اختصاصیت آن بالا رود. استفاده از پرایمرها منجر به تکثیر قطعه‌ی ۲۶۰ bp گردید. پرایمر Forwards به طول ۲۱ bp در ناحیه ۵۰-۳۰ قطعه مورد نظر و پرایمر Reveres به طول ۲۲ bp در ناحیه ۲۹۰-۲۶۸ قرار دارند. پروب نیز در موقعیت ۱۶۰-۱۴۱ قطعه مورد نظر می‌باشد.

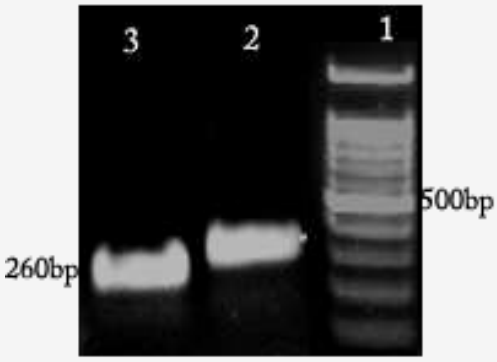
بررسی محصول PCR: پس از استخراج ژن، در جهت تکثیر قطعه‌ی ۲۶۰bp با استفاده از پرایمرهای طراحی شده، PCR انجام گرفت. به منظور تایید محصول PCR، ۵ µl از آن را روی ژل آگارز برده و با رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید و ۱۰۰ ladder از صحت قطعه ۲۶۰ bp و پرایمرهای طراحی شده اطمینان حاصل گردید (شکل ۱).

برای تایید محصول PCR DIG-labeled، هر دو PCR معمولی و DIG-labeled را بر روی آگارز برده شد. قطعه نشان‌دار شده باید

به خاطر وزن مولکولی بیشتر اندکی بالاتر از PCR معمولی قرار گیرد (شکل ۲).



شکل ۱. ژل آگارز مربوط به محصول PCR معمولی همراه با Ladder ۱۰۰، ستون ۱ نشانگر اندازه‌ی 100bp plus DNA، ستون ۲ محصول واکنش PCR ژن 16srDNA



شکل ۲. ژل آگارز مربوط به محصول PCR معمولی و DIG-labeled، ستون ۱ نشانگر اندازه‌ی 100bp plus DNA، ستون ۲ محصول PCR DIG-labeled، ستون ۳ محصول PCR معمولی

بررسی اندازه گیری PCR-ELISA: در جهت اندازه گیری دقت PCR-ELISA، از هر دو محصول PCR معمولی و DIG-labeled استفاده گردید. همچنین دو نمونه کنترل گذاشته شد که یکی منهای محصول PCR و دیگری منهای Anti-DIG بود. به محض رنگ گرفتن کنترل‌ها، همه‌ی نمونه‌ها متوقف شد. نمونه‌های DIG-labeled تقریبا جذب نوری، ۲ برابر بیشتر از نمونه‌های عادی نشان دادند. میل ترکیبی بالای آنتی بادی ضد دیگوکسی ژنین سبب استفاده گسترده این ماده در آزمایشات ایمونولوژی گردیده. آنتی بادی به راحتی محصول PCR، DIG-labeled را شناسایی می‌کند و در نتیجه سبب افزایش دقت اندازه گیری می‌شود.

بررسی حساسیت PCR-ELISA : برای بررسی حساسیت این تکنیک از روش رقیق سازی استفاده شد. این آزمایش کمترین میزان آلودگی را تعیین می‌کند. برای این منظور محصول PCR نشان دار شده به نسبت ۱/۲ رقیق شد و ۷ رقت مختلف از DNA ژنومی تهیه گردید. حداقل میزان DNA که قابل اندازه گیری بود، از طریق دستگاه نور سنجی تعیین غلظت گردید. نمودار ۱ بیانگر نتایج به دست آمده از این مرحله می‌باشد.

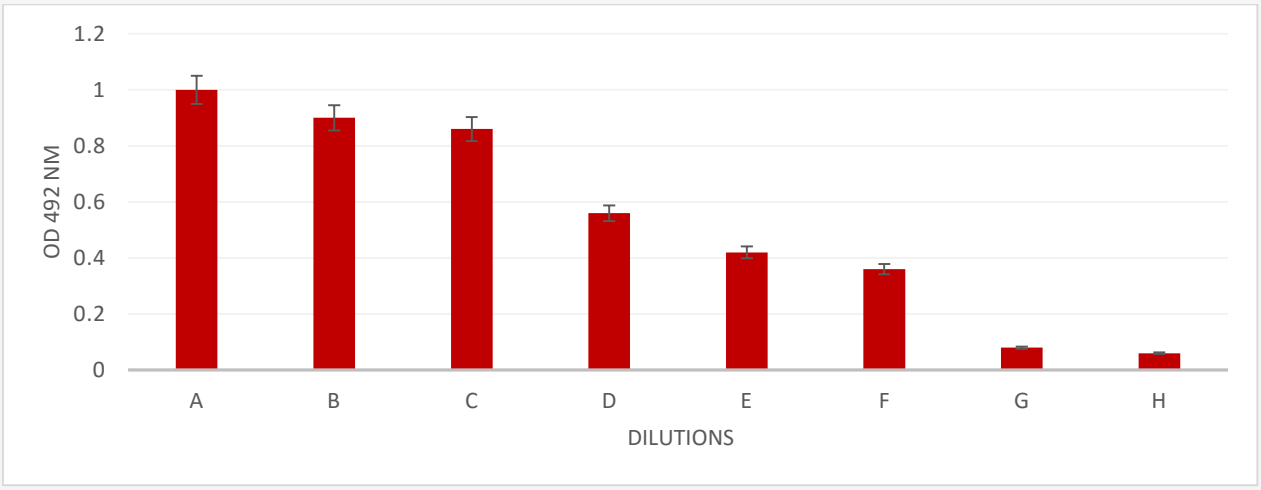
همان طور که در نمودار ۱ نشان داده شده است، با کاهش غلظت میزان OD کاهش یافته به طوری که آلودگی DNA تا ۰/۶۲ نانوگرم نیز قابل شناسایی بود. میزان سنجش در این جا با بهره گیری از نمونه‌های کنترل صورت گرفته است.

بررسی اختصاصیت PCR-ELISA: به منظور بررسی اختصاصیت پرایمرهای طراحی شده برای این باکتری، ژنوم باکتری‌های مختلف از جمله *E. coli*، شیگلا، سودوموناس، *E. coli* O157 و همچنین همراه با خود کلبسیلا استخراج گردید. PCR-ELISA مطابق روش ارائه شده انجام شد که نتایج ارائه شده در نمودار ۲ نشان دهنده عدم واکنش بود.

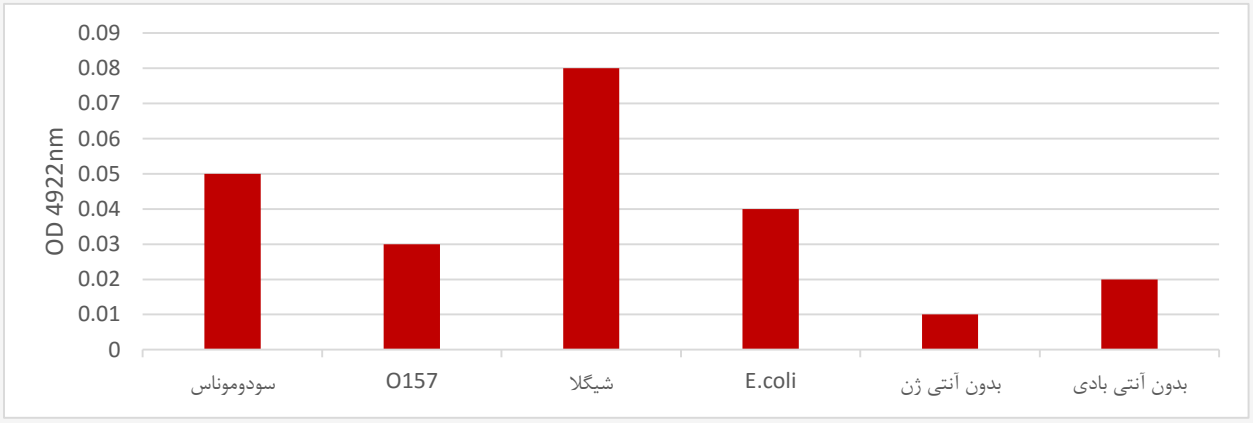
سطح قابل قبول برای تشخیص وجود *کلبسیلا پنومونیه* ، از نمونه‌های کنترل قابل اندازه گیری می‌باشد. از آنجا که محصولات واکنش PCR ژنوم سایر اعضای این خانواده سطح کمتری رانشان می‌دهد، می‌توان به اختصاصیت پرایمرهای طراحی شده اطمینان حاصل کرد.

پس از بررسی اختصاصیت با توجه به نمودار ۲ می‌توان اطمینان حاصل کرد که توالی ژنی انتخاب شده در سایر اعضای این خانواده تکرار نشده است. نتیجه‌ی حاصل از این آزمایش با اطمینان خاطر بیشتری بیان خواهد شد.

تایید تکنیک PCR-ELISA: در نهایت ۱۰ نمونه‌ی باکتری بدون کد بین‌المللی از آزمایشگاه رفرانس تهیه و استخراج ژنوم



نمودار ۱. تعیین حساسیت PCR-ELISA با روش رقت سازی 16SrDNA
A-G: به ترتیب محصول PCR ۰/۶۲، ۱/۲۵، ۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ نانوگرم



نمودار ۲. نتیجه حاصل از قرائت OD محصول PCR ژنوم باکتری‌های مختلف

صورت گرفت. پس از انجام PCR با استفاده از ۵ µl محصول PCR، ELISA گذاشته شد. نمونه‌های کنترل منفی فاقد آنتی بادی و ژنوم نیز در کنار سایر نمونه‌ها حضور داشتند. نتایج حاصل با استفاده از نرم افزار SPSS مورد تایید و بررسی قرار گرفت.

بحث

باکتری *کلبسیلا پنومونیه* امروزه به عنوان یک پاتوژن فرصت طلب و یکی از مهم‌ترین باکتری‌های دخیل در عفونت‌های بیمارستانی مطرح می‌باشد و عفونت‌های ناشی از آن در بخش کودکان و مراقبت‌های ویژه معضل بزرگی ایجاد می‌نماید (۴، ۵). میزان مرگ و میر ناشی از این باکتری بالا بوده و با عث بیماری‌های مختلفی مانند عفونت دستگاه ادراری، باکتریمی، سپتی سمی، اسهال، پنومونی، ایجاد آبسه در کبد، اندوفتالیت و مننژیت در بیماران بستری در بخش‌های مختلف بیمارستان می‌شود (۸-۱۰). کلبسیلا از جمله باکتری‌های مقاوم به آنتی بیوتیک است (۳). بسیاری از تحقیقاتی که بر روی این باکتری انجام شده به منظور بررسی حضور ژن مقاومت آنتی بیوتیکی

صورت گرفته از جمله بررسی SHV-1 شایع‌ترین بتالاکتاماز در ایزوله‌های کلینیکی کلبسیلا و بتالاکتاماز TEM-1 در بسیاری از سویه‌های دیگر کلبسیلا، به تنهایی یا همراه با SHV-1 می‌باشد (۲۲، ۲۳). پس از بررسی‌های انجام شده معلوم شد اکثر ژن‌های مقاومت آنتی بیوتیکی بر روی عناصر متحرک ژنتیکی از جمله پلاسمیدها، ترانسپوزون‌ها و اینتگرون‌ها حضور دارند که بین باکتری‌های گرم منفی قابل انتقال می‌باشند و نقش مهمی در مقاومت آنتی بیوتیکی ایفا می‌کند (۲۴). این مسئله نشان می‌دهد ژن‌های مقاومت آنتی بیوتیکی اختصاصی نبوده و نه تنها بین گونه‌ی کلبسیلا بلکه بین خانواده انتروباکتریاسه قابل ترانسفرما سیون می‌باشد. در بسیاری از تحقیقات انجام شده بر روی *کلبسیلا پنومونیه* ، شناسایی باکتری توسط متدهای روتین آزمایشگاه‌ها صورت گرفته. از جمله به کارگیری تست حساسیت میکروبی، MIC، E-test، تست‌های مولکولی از جمله PCR و LCRمی‌باشد (۲۵). هدف از این تحقیق شناسایی اختصاصی *کلبسیلا پنومونیه* با استفاده از تکنیک PCR-ELISA می‌باشد. ما در اینجا ژن کاملا اختصاصی *16SrDNA* را انتخاب کردیم.

اخیرا تحقیقاتی بر روی سایر اعضای خانواده‌ی انتروباکتریاسه ازجمله سالمونلا، شیگلا، ویبریوکلرا و *E.coli* از طریق تکنیک PCR-ELISA انجام گرفته است (۲۶، ۲۷) ولی تاکنون گزارشی مبنی بر شناسایی *کلبسیلا پنومونیه* از طریق این تکنیک اعلام نشده است. همچنین تحقیقاتی در زمینه تشخیص با استفاده از متد PCR-ELISA انجام گرفته است که نمونه‌هایی از آن‌ها ذکر می‌گردد. Jones و همکاران در سال ۱۹۹۸برای تشخیص زود هنگام عفونت تهاجمی آسپرژیلوس ریوی در بیماران نوتروپنی از تکنیک PCR-ELISA استفاده کردند. Machado و همکاران در سال ۱۹۹۸ همچنین Laoboonchai و همکاران در سال ۲۰۰۱ برای تشخیص نمونه‌های مالاریا در تایلند از روش PCR-ELISA استفاده کردند (۲۸). Zhan و همکاران در سال ۲۰۰۰ مطالعاتی در تشخیص DNA هپاتیت B از سرم انسانی با استفاده از روش PCR-ELISA انجام دادند (۲۹). Zhan و همکاران در سال ۲۰۰۲ مطالعات بر روی DNA آدنوویروس به روش PCR-ELISA انجام دادند (۳۰). Beifuss و همکاران در سال ۲۰۱۱ تشخیص مستقیم از پنج گونه درماتوفیت شایع در نمونه‌های بالینی در ۲۴ ساعت با استفاده از روش PCR-ELISA انجام دادند. Kim و همکاران در سال ۱۹۹۸ حضور DNAمایکوپلاسما در بافت سرطان تخمدان را توسط تکنیک PCR-ELISA تشخیص دادند. Nasiri و همکاران در سال ۲۰۰۴ نیز روش PCR-ELISA را برای تحقیق خود به کار بردند، آن‌ها روش allotyping را برای تشخیص ۴ گروه از آلل‌های HLA DRB1*01 با استفاده از PCR و محلول هیبریداسیون در ظرف‌های میکروتیتر توسعه دادند (۳۱). شناسایی پاپیلوویروس با به کارگیری این تکنیک، در سال ۲۰۱۱ در ایران انجام گرفت، آن‌ها نشان دادند که PCR-ELISA روشی حساس تر و دقیق تری در مقایسه با PCR به تنهایی، می‌باشد (۳۲). همچنین اختصاصیت *16SrDNA* در حدی می‌باشد که گزارشات حاکی از استفاده این ژن برای ترسیم درخت فیلوژنی بوده است. این قطعه ژنی به عنوان یک نشانگر عالی فیلوژنی شناخته شده می‌باشد (۳۳). هدف نهایی این تحقیق با توجه به مطالب فوق الذکر، ارائه مسیر سریع و دقیق برای شناسایی *کلبسیلا پنومونیه* می‌باشد. با توجه به افزایش روز افزون عفونت‌های بیمارستانی و همچنین مشکلات پیش رو در جهت درمان باکتری‌های حاوی ژن مقاومت آنتی بیوتیکی (۳۴)، شناسایی سریع آن در مقادیر بسیار ناچیز و به منظور جلوگیری شیوع بیشتر، بسیار حائز اهمیت می‌باشد.

نتیجه‌گیری

PCR-ELISA در مقایسه با تکنیک‌هایی که تا به امروز به کار برده می‌شود بسیار دقیق تر و حساس تر بوده است. در این روش خطر استفاده از اتیدیوم براماید که در PCR معمولی به کار می‌رود وجود ندارد. استفاده از میکروپلیت امکان بررسی چندین نمونه را به طور هم زمان فراهم می‌آورد. زمان آزمایش برای رسیدن به نتیجه مطلوب در مقایسه با استفاده از محیط کشت بسیار کاهش میابد که این موضوع در آزمایش‌های بالینی بسیار حائز اهمیت می‌باشد و از سوی دیگر هیبرید شدن توالی ژنی با پروب اختصاصی، باعث افزایش چشمگیر صحت نتیجه‌ی کار خواهد شد. از مزیت‌های این تکنیک هزینه‌ی کمتری نسبت به Real time-PCR را متحمل شده، نیازی به استفاده از دستگاه ژل داک و اتاق تاریک نیست و آلودگی نسبت به روش لکه گذاری ساترن کمتر می‌باشد. دقت اندازه گیری ۱۰۰ برابر بیشتر از استفاده از ژل الکتروفورز است. در نهایت PCR-ELISA روشی سریع، دقیق و با حساسیت و اختصاصیت بسیار بالا برای تشخیص

کلبسیلا پنومونیه از طریق ژن 16SrDNA می‌باشد. طراحی کیت‌های تشخیصی بر پایه‌ی روش ارائه شده می‌تواند راهی سریع و نوین به منظور جلوگیری از گسترش بیشتر باکتری مذکور، به ویژه در عفونت‌های بیمارستانی باشد. همچنین با استفاده از مولتی کیت‌ها می‌توان در زمانی بسیار کوتاه عامل عفونت را شناسایی کرد. هدف نهایی این پروژه طراحی نوینی در جهت شناسایی سریع عامل عفونی *کلبسیلا پنومونیه* می‌باشد، که امروزه نقش بزرگی در عفونت‌های بیمارستانی ایفا می‌کند. برخورداری این تکنیک از کلی مزیت‌های فوق الذکر، PCR-ELISA را روشی مناسب برای به کارگیری در مراکز تشخیصی و بیمارستان خواهد ساخت.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر بخشی از طرح و پایان نامه مصوب مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) می‌باشد که بدین وسیله از مسئولین به جهت تهیه امکانات و بودجه طرح تقدیر و قدردانی می‌شود.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده اند.

References

1. Tsai YK, Fung CP, Lin JC, Chen JH, Chang FY, Chen TL et al. Klebsiella pneumoniae outer Membrane Porins OmpK35 and OmpK36 Play Roles in Both Antimicrobial Resistance and Virulence. Antimicrob Agents Chemother. 2011; 55(4):1485-93.
2. Khoshkhoo PH, Peighambari SM. Characteristics of Escherichia coli isolated from cases of avian colibacillosis. Can J Vet Res.1993; 57(3) 146-151.
3. Babypadmini S, Appalaraju. B. Extended spectrum β-lactamases in Urinary Isolates of Esherishia Coli and Klebsiella pneumoniae-prevalenceand susceptibility pattern in a Territory Care Hospitals Indian J Med Microbiol. 2004; 22(3):172.
4. Essack SY. Treatment options for extended spectrum beta-lactamase-producers. FEMS Microbiol Lett. 2000;190(2):181-4
5. Kovtunovych G, Lytvynenko T, Negrutska V, Lar O, Brisse S, kozyrovska N. Identification of klebsiella oxytoca using a speacific PCR assay the polygalacturonase peh X gene. Res Microbiol. 2003; 154(8):587-92.
6. A Ronald. The etiology of urinary tract infection: Traditional and emerging pathogens. Disease-a-Month.2003;49(2):71-82
7. Amraie H, Shakib P, Rouhi S, Bakhshandeh N, Zamanzad B. Prevalence assessment of magA gene and antimicrobial susceptibility of Klebsiella pneumoniae isolated from clinical specimens in Shahrekord, Iran. Iran J Microbiol. 2014; 6(5):311-6.
8. Paterson DL, Hujer KM, Hujer AM, Yeiser B, Bonomo MD, Rice LB, et al. Extended-spectrum beta-lactamases in Klebsiella pneumoniae blood stream isolates from seven countries. International Klebsiella Study Group. Antimicrob Agents Chemother. 2003; 47(11): 3554-3360.
9. Luo Y, Yang J, Zhang Y, Ye L, Wang L, Guo L. Prevalence of β-lactamases and 16S rRNA Methylase Genes Amongst Clinical Klebsiella pneumoniae Isolates Carrying Plasmid-mediated Quinolone Resistance Determinants. Int J Antimicrob Agents. 2011; 37(4): 352-355.
10. Padilla E, Llobet E, Doménech-Sánchez A, Martínez-Martínez L, Bengoechea JA, Albertí S. Klebsiella pneumonia AcrAB Efflux Pump Contributes to Antimicrobial Resistance and Virulence. Antimicrob Agents Chemother. 2010; 54(1): 177-183.
11. Lubell Y, Ashley EA, Turner C, Turner P, White NJ. Susceptibility of Community-acquired Pathogens to Antibiotics in Africa and Asia in Neonates-an Alarmingly Short Review. Trop Med Int Health. 2011; 16(2):145-51.
12. Henshke-Bar-Meir R, Yinnon AM, Rudensky B, Attias D, Schlesinger Y, Raveh D. Assessment of the clinical significance of production of extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) by Enterobacteriaceae. Infection 2006; 34:66-74.

13. Raghunathan A, Samuel J, Tibbetts R. Evaluation of a Real-Time PCR Assay for the Detection of the Klebsiella pneumoniae Carbapenemase Genes in Microbiological Samples in Comparison with the Modified Hodge Test. Am J Clin Pathol. 2011; 135(4)566-571.
14. Zamani A, Yousefi Mashouf R, Ebrahimzadeh Namvar AM, Yousef Alikhani M. Detection of magA Gene in Klebsiella spp. Isolated from Clinical Samples. Iran J Basic Med Sci. 2013; 16(2). 173-176.
15. Fevre1 C, Passet V, Deletoile A, Barbe V, Frangeul L, Almeida A et al. PCR-Based Identification of Klebsiella pneumonia subsp. rhinoscleromatis, the Agent of Rhinoscleroma. PLoS Negl. 2011; 5(5): e1052.
16. Munch M, Nielsen L, Handberg K, Jørgensen P. Detection and subtyping (H5 and H7) of avian type an influenza virus by reverse transcription-PCR and PCR-ELISA. Arch Virol. 2001; 87-97.
17. Gomes L, Marques L, Johannes M, Cla´udia M, Coelho P, 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) 664.
18. Raji N, Sadeghizadeh M, Tafreshi K, Jahanzad E. Detection of human Papillomavirus 18 in cervical cancer samples using PCR-ELISA (DIAPOPS). Iran J Microbiol. 2011;3(4): 177-182.
19. Musavi SL, Salimiyan J, Karimi A, Amani J, Nazarian SH, Ardestani H. A rapid and specific PCR–ELISA for detecting Salmonella typhi. Iran J Clinic Infect Dis. 2006; 1(3):113-119.
20. Tahka H, Leea M, Bum Leea K, Cheonb D, Choi Ch. Development of duplex RT-PCR-ELISA for the simultaneous detection of hepatitis A virus and hepatitis E virus. J Virol Methods. 2011; 175: 137– 140.
21. Cabrera L, De Witte J, Victor B, Vermeiren L, Zimic M, Brandt J, Geysen D. Specific detection and identification of African trypanosomes in bovine peripheral blood by means of a PCR-ELISA assay. Vet Parasitol. 2009; 164: 111–117.
22. Schwaber MJ, Navon-Venezia S, Schwartz D, Carmeli Y. High levels of antimicrobial coresistance among extended spectrum lactamase producing enterobacteriaceae. Antimicrob Agents Chemother. 2005; 49(5):2137-9.
23. Urban C, rahal J. Klebsiella and extended spectrum β-lactamases Int. Int J Antimicrob Agents.2002; 6(1):125-9.
24. Boucher Y, Labbate M, Koenig J, Stokes H. Integrons: mobilizable platforms that promote genetic diversity in bacteria. Trends Microbiol.2007; 15(7): 301-309.
25. Lytsy B, Sandegren L, Tano E, Torell E. The first major extended-spectrum β-lactamase outbreak in Scandinavia was caused by clonal spread of a multiresistant Klebsiella pneumoniae producing CTX-M-15. APMIS.2008; 116(4): 302-8.
26. Ardestani H, Mousavi Gargari S, Nazarian S, Amani J. Rapid and Specific Detection of Salmonella typhimurium by PCR-ELISA. Modares J Med Sci Pathobio. 2007; 10(1):51-62.
27. Rajkhowa S, Hussain I, Rajkhowa C. Detection of heat stable and heat labile enterotoxin genes of Escherichia coli in diarrhoeic faecal samples of mithun (Bos frontalis) calves by polymerase chain reaction. J Appl Microbiol.2009; 106(2):455-8.
28. Laoboonchai A. PCR-based ELISA technique for malaria diagnosis of specimens from Thailand. Trop Med Int Health. 2001; 6(6): 458-462.
29. Zhan Q. Studies on the detection of HBV DNA from human serum by PCR-ELISA technique. J Progress Biotechnol. 2001; 21(6): 54-56.
30. Zhan Q. Studies on the adenovirus DNA by PCR-ELISA technique. J Hebei Medicine.2003; 9(5): p. 385-387.
31. Nasiri H. Development of PCR-ELISA technique for determination of HLA DRB101 group alleles. Iranian J Biotech. 2004; 2(3):164
32. Raji N, Sadeghizadeh M, Tafreshi K, Jahanzad E. Detection of human Papillomavirus 18 in cervical cancer samples using PCR-ELISA (DIAPOPS). Iran J Microbiol. 2011; 3(4): 177–182.
33. Gregory Caporaso J, Christian L, William A, Berg-Lyons D, Lozupone C, Turnbaugh P. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. www.pnas.org. 2011. 4516–4522.
34. Yigit H, Queenan A, Gregory J. Novel Carbapenem-Hydrolyzing b-Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of Klebsiella pneumonia. Antimicrob Agents Chemother. 2001; 45(4):1151–1161.

Original Article

Detection of *Klebsiella Pneumoniae* 16s rDNA Specific Gene by PCR-ELISA Technique

Tayebeh F[1, 2], Amani J[1*], Moradyar M[2], Mirhossaini SA[1]

1- Applied Microbiology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
2- Department of Biology, Damghan Azad University, Damghan, Iran.

Received: 06 Aug 2015 Accepted: 04 Jan 2016

Abstract

Objective: *Klebsiella Pneumoniae* is one of the most important infection bacteria of the Enterobacteriaceae family. It is also the second factor of hospital bacteremia due to the gram negative bacteria after Escherichia coli. In this research, this bacterium with the private 16SrDNA gene, was identified through PCR-ELISA technique.

Materials and Methods: In this method the dNTP labeled with Digoxigenin was used for amplifying the specific gene. Streptavidin was loaded in ELISA plate, and then the specific Biotinylated probe was used to connect the Polymerase Chain Reaction (PCR) product. Biotinylated probe was connected to the streptavidin and the amplified gene was attached to the probe. Finally, the digoxigenin antibodies were used to identify the PCR product. The reaction was measured with an ELISA reader.

Result: 16S rDNA of *Klebsiella pneumoniae* was amplified using the gene specific primers resulted in a fragment of the bp 260. The results of PCR-ELISA showed that this technique does not cross-react with the bacteria in their families. Additionally, the sensitivity of 6.0 ng was evaluated.

Conclusion: In this research, PCR-ELISA technique was known as an accurate and rapid test for the detection of infection agents by using the specific gene. PCR-ELISA can act as an alternative method instead of time-consuming, less sensitive, and expensive techniques such as culture bacteria in blood agar plates, Macconkey agar, Realtime PCR and differential biochemical tests which are currently used in the research labs.

Keywords: **Enterobacteriaceae, *Klebsiella pneumoniae*, 16S rDNA, PCR-ELISA**

***Corresponding author: Jafar Amani,** Applied Microbiology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
Email: jafar.amani@gmail.com.