شناسایی آسینتوباکتر بومانی با استفاده از آنالیز محدودگر DNA ریبوزومی تکثیری

دلسوز رضایی[۱]؛ غلامرضا زرینی[۱]*؛ محمد آهنگرزاده رضایی[۲]

چکیده

زمینه: *Acinetobacter baumannii* پاتوژن بیمارستانی فرصت طلب دارای مقاومت چندگانه است که مسئول شیوع بیماری در سراسر جهان است. علاوه بر روش‌های مرسوم میکروسکوپی و بیوشیمیایی، روش آنالیز محدودگر DNA ریبوزومی تکثیری (Amplified ribosomal DNA restriction, ARDRA) برای شناسایی گونه‌های ژنومی *Acinetobacter* آزمایش گردید.

روش‌ها: در این مطالعه، آزمون‌های استاندارد بیوشیمیایی برای شناسایی جدایه‌ها استفاده شد. گونه ژنومی *Acinetobacter* با روش ARDRA تأیید شد. محصولات PCR ژن 16S rDNA با آنزیم‌های محدودگر *Alu*I، *Mbo*I و *Hha*I برش داده شدند.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که ARDRA روشی سریع و قابل اعتماد برای شناسایی *A. baumannii* (گونه ژنومی ۲) از گونه‌های ژنومی *Acinetobacter* از جمله گونه‌های بسیار نزدیک از نظر ژنومی [گونه‌های ژنومی ۱ (*A. calcoaceticus*)، ۲ (*A. baumannii*)، ۳ و TU۱۳] است.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که ARDRA با آنزیم‌های محدودگر *Alu*I، *Mbo*I و *Hha*I می‌تواند برای شناسایی *A. baumannii* مورد استفاده قرار گیرد و به‌همین دلیل ممکن است به آشکار کردن اهمیت اکولوژی و بالینی گونه‌های مختلف این جنس کمک کند. از آن‌جا که ARDRA با استفاده از پرایمرهای عمومی ژن 16S rDNA انجام می‌گیرد انتظار می‌رود در شناسایی بسیاری از گونه‌های باکتریایی مناسب باشد.

کلیدواژه‌ها: *Acinetobacter baumannii*، ARDRA، گونه ژنومی، پاتوژن بیمارستانی

«دریافت: ۱۳۹۲/۶/۱۸ پذیرش: ۱۳۹۲/۹/۱۲»

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز

۲. گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

***عهده‌دار مکاتبات:** آذربایجان شرقی، تبریز، دانشگاه تبریز، دانشکده علوم طبیعی،گروه زیست‌شناسی، آزمایشگاه میکروبیولوژی، استادیار میکروبیولوژی

تلفن: ۰۴۱۱-۳۳۹۲۷۰۷ Email: zarrini@tabrizu.ac.ir

مقدمه

باکتری *Acinetobacter baumannii* پاتوژن فرصت‌طلبی است که به‌طور عمده در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی به‌ویژه در بخش‌های ICU اهمیت بسیاری دارد. این باکتری عامل عفونت‌های متعددی ازقبیل سپتی‌سمی، نومونی و عفونت‌های دستگاه ادراری به‌دنبال بستری شدن در بیمارستان است (۱). یکی از مهم‌ترین مشکلات در رابطه با این باکتری افزایش جدایه‌های دارای مقاومت چندداروی (Multi-drug resistance (MDR)) است که این امر می‌تواند به‌دلیل استفاده گسترده و بدون کنترل عوامل ضدمیکربی به‌ویژه در کشورهای درحال توسعه باشد (۲ و ۳). براساس مطالعات هیبریداسیون DNA-DNA نشان دادند، که حداقل ۳۳ گروه DNA (گونه ژنومی)، در آسینتوباکتر وجود دارد (۴، ۵). *A. baumannii* (متعلق به گروه ۲ از DNA یا گونه ژنومی ۲) (Genomic species 2) به‌عنوان محتمل‌ترین گونه مرتبط با عفونت‌های انسانی و اپیدمی‌های بیمارستانی معرفی شد. گونه *A. baumannii* به‌صورت کمپلکس *A. baumannii-A. calcoaceticus*، معروف به کمپلکس ABC وجود دارد که کمپلکسی از

A. calcoaceticus و *A. baumannii* و گونه ژنومی ۳ و گونه ژنومی TU۱۳ می‌باشد. متأسفانه، تست‌های فنوتیپی ساده که اکثراً به‌صورت روتین برای شناسایی دیگر گونه‌های باکتریایی در آزمایشگاه‌های تشخیصی استفاده می‌شود برای شناسایی دقیق گونه‌های آسینتوباکتر نامناسب هستند (۶ و ۷). درحقیقت *A. baumannii*، آسینتوباکتر گونه ژنومی ۳ و آسینتوباکتر گونه ژنومی TU۱۳، در اکثر سیستم‌ها به‌عنوان *A. baumannii* شناسایی می‌شوند (۸ و ۹). بنابراین چندین روش مولکولی برای شناسایی گونه‌های آسینتوباکتر معتبر است که از آن جمله می‌توان به روش آنالیز محدودگر DNA ریبوزومی تکثیری (Amplified ribosomal DNA restriction, ARDRA) اشاره کرد. این تکنیک معمولاً برای بررسی آلل‌های مختلف یک ژن درون یک جمعیت استفاده می‌شود. تنوع آلل‌های ژن مربوطه جایگاه‌های برشی متفاوتی برای آنزیم محدودگر ایجاد کرده و قطعاتی با طول‌های مختلف حاصل می‌کند (۱۰ و ۱۱). هدف از این مطالعه شناسایی گونه *A.baumannii* (گونه ژنومی ۲) در بین آسینتوباکترهای جدا شده از نمونه‌های بالینی بیماران بستری در بیمارستان‌های منتخب تهران به روش PCR-RFLP با آنزیم های محدودگر *Hha*I, *Alu*I و *Mbo*I می‌باشد. از سویه استاندارد *A. baumannii* ATCC 19606 به‌عنوان کنترل مثبت برای تأیید شناسایی گونه *A. baumannii* (گونه ژنومی ۲) استفاده شد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه ۲۵۰ جدایه مشکوک به آسینتوباکتر از نمونه‌های بالینی بیماران بستری در بخش مراقبت‌های ویژه بیمارستان‌های منتخب تهران جدا گردید. برای شناسایی جدایه‌های آسینتوباکتر، تست‌های بیوشیمیایی مثل تست‌های اکسیداز، کاتالاز، سیترات، تخمیری یا غیرتخمیر بودن باکتری و تحرک انجام گرفته و برای تأیید نهایی گونه ژنومی *A. baumannii* از روش‌های مولکولی استفاده شد.

استخراج DNA

استخراج DNA جدایه‌های *A.baumannii* با روش CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide) انجام گرفت. ابتدا یک لوپ پر از باکتری در ۳۰۰µL آب مقطر ریخته و ۱۰ دقیقه در سانتریفیوژ با دور ۱۰۰۰rpm قرار داده شد. سپس ۲۷۰µL از بافر TE (Tris-EDTA buffer) و ۳۰µL از ۱۰% SDS و ۸µL از پروتئیناز K را اضافه و در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ ساعت قرار داده شد. به هر نمونه ۱۰۰µL از NaCl (۵mM) و ۸۰µL از ۱۰% CTAB اضافه شد. بعد از ۱۰ دقیقه گرماگذاری در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد، به هر نمونه ۷۰۰µL کلروفرم اضافه گردید و با دور ۱۱۰۰۰ برای ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. در ادامه فاز مایع رویی جدا شد و به آن ۴۰۰µL ایزوپروپانول اضافه گردید و در ۲۰- درجه سانتیگراد به‌مدت ۱ ساعت سرماگذاری شد. در نهایت به‌مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۱۰۰۰ رسوب گردید. سپس ۳۰۰µL اتانول ۷۰ درصد به رسوب DNA اضافه شد و با دور ۷۰۰۰ یا ۸۰۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. پس از دور ریختن الکل به هر نمونه ۵۰µL از بافر TE اضافه و در ۳۷ درجه سانتیگراد برای ۲۰ دقیقه قرار داده شد (۱۲).

انتخاب گونه ژنومی بومانی (Genomic species 2) از کالکواستیکوس (Genomic species 1) به‌وسیله آزمون 16S rDNA PCR-RFLP :

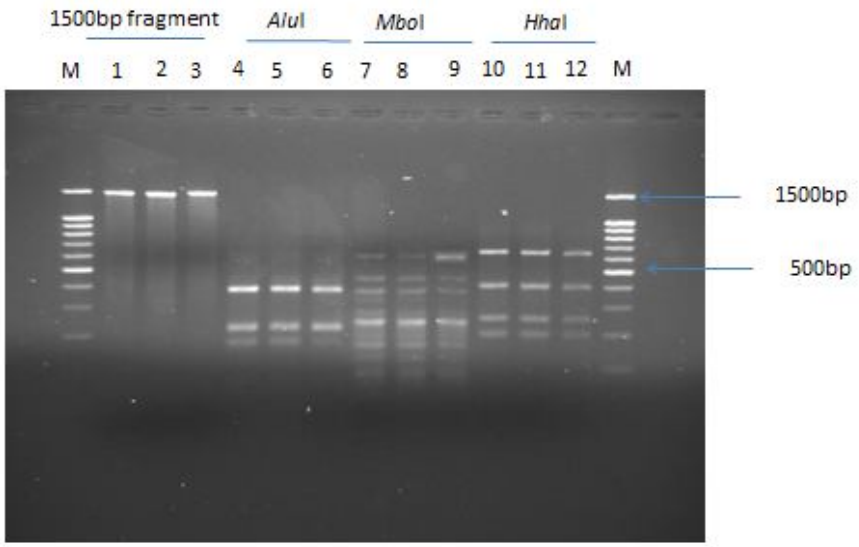
پس از استخراج DNA به روش CTAB، برای تکثیر ژن 16S rRNA از روی DNA ژنومی آسینتوباکترها به‌کمک اولیگونوکلئوتیدهای پرایمری اختصاصی برای مناطق حفاظت‌شده دو طرف ژن PCR انجام گرفت. توالی پرایمرهای مورد استفاده برای انتهای ′5 و ′3 ژن 16S rDNA به‌ترتیب 5′-TGGCTCAGATTGA-3′ -5′ TACCTTGTTACGACTTCACCCCA-3′ بود. مخلوط واکنش در حجم کلی ۲۵µL شامل ۱۸/۱µL از ddH_2O، ۲/۵µL از 10X PCR Buffer، ۰/۷µL از $MgCl_2$ (mM ۵۰)، ۰/۵µL از مخلوط dNTP (۲۰۰ µM)، ۱µL از هر کدام از پرایمرها (۱۰ pM)، ۰/۲µL از Taq DNA

Polymerase و ۱μL از DNA الگو طبق شرایط دمایی و زمانی در دستگاه ترموسایکلر شامل مرحله واسرشت اولیه ۹۴ (درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه)، سیکل اصلی ۳۴ بار تکرار شامل مراحل واسرشت (۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه)، اتصال (۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۶ ثانیه)، طویل شدن (۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه) و تکثیر نهایی یک سیکل در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ دقیقه انجام شد. محصول PCR برای ۱ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد با ۱/۵μL از بافر تجاری fast digest ۱/۵μL و ۰/۲μL (۵U) از هر کدام از آنزیم‌های محدودگر *Alu*I، *Hha*I و *Mbo*I گرماگذاری شد. برای بررسی محصولات واکنش PCR–RFLP از ژل آگارز (۱٪)، اتیدیوم بروماید (۵۰ng/ml) و الکتروفورز برای ۳۰ دقیقه در ۱۰۰V و بافر TAE استفاده شد. الگوهای قطعات محدودگر به‌وسیله ژل الکتروفورز آنالیز شدند (۱۰ و ۱۱).

یافته‌ها

باکتری‌هایی که به‌عنوان آسینتوباکتر جدا شدند، کوکوباسیل‌های گرم منفی، با واکنش آلکالین/آلکالین و عدم تولید H_2S در محیط کلیگلر، اکسیداز منفی، غیرمتحرک، کاتالاز مثبت، سیترات مثبت و تولید اسید از گلوکز در محیط OF بودند که در دو دمای ۳۷ و ۴۴ درجه سانتی‌گراد به خوبی رشد کردند.

برای تفکیک گونه ژنومی بومانی (genomospecies 2) از کالکواستیکوس (genomospecies 1) از تکنیک PCR-RFLP استفاده شد. طول باند حاصل از PCR ژن 16S rDNA، ۱۵۰۰bp به‌دست آمد. در واکنش PCR ژن 16S rDNA تعداد ۷۵ جدایه به‌دست‌آمده حاوی قطعه ژنی ۱۵۰۰bp بودند و پس از هضم با سه آنزیم *Alu*I، *Hha*I و *Mbo*I جدایه‌ها الگویی مشابه با الگوی سویه استاندارد *A. baumannii* ATCC 19606 را نشان دادند که الگوی باندی ویژه آن وجه تمایز بین دو گونه است. برش حاصل از *Hha*I، چهار باند مجرای مشخص می‌دهد که این قطعات برشی حاصل با این آنزیم در جدایه‌های *A.baumannii* به‌دست‌آمده کاملاً مشابه با قطعات برش‌داده‌شده *A.baumannii* ATCC 19606 بود (تصویر ۱).



تصویر ۱– ژل مربوط به 16S rDNA-RFLP برای شناسایی گونه ژنومی بومانی (genomospecies 2) از کالکواستیکوس (genomospecies 1). قطعه حدود 1500bp مربوط به 16rDNA حاصل از PCR نمونه استاندارد و نمونه‌های بیمارستانی (ستون‌های ۱، ۲ و ۳) با سه آنزیم محدودگر *Alu*I، *Mbo*I و *Hha*I برش داده شده است. ستون‌های M در دو طرف ژل: سایز مارکر 100bp؛ ستون های ۱، ۴، ۷ و ۱۰ مربوط به نمونه کنترل مثبت; *A. baumannii* ATCC 19606؛ ستون‌های ۲، ۳، ۵، ۶، ۸، ۹، ۱۱ و ۱۲ مربوط به نمونه‌های *A. baumannii* جداشده از بیماران می‌باشند.

بحث

عفونت‌های *A. baumannii* به‌ویژه سویه‌های با مقاومت چندگانه، یک خطر جدی برای بسیاری از بیماران بوده و از سوی دیگر چالش سختی را برای سیستم مراقبت‌های بهداشتی ایجاد کرده است (۱). به‌دلیل وجود گروه‌های DNA مختلفی که در جنس آسینتوباکتر وجود دارد مطالعات زیادی برای شناسایی گونه‌های این جنس انجام گرفته است. مطالعات اولیه به‌صورت تست‌های فنوتیپی طراحی شدند، اما امروزه از روش‌های مولکولی برای شناسایی استفاده می‌کنند. در مطالعه‌ای که توسط Vaneechoutte و همکارانش انجام گرفت شناسایی گونه‌های ژنومی آسینتوباکتر با روش ARDRA نتایج امیدوارکننده خوبی داشت (۱۰). در این مطالعه نیز ما با استفاده از ۳ آنزیم محدودگر، نتایج بسیار خوبی برای شناسایی *A. baumannii* (گونه ژنومی ۲)، به‌عنوان یک پاتوژن خطرناک به‌دست آوردیم و استفاده از آن برای تشخیص گونه ژنومی *A. baumannii* توصیه می‌شود. گونه‌های کمپلکس ACB از لحاظ هیبریداسیون DNA (۷۰-۶۵٪ شباهت) و تست‌های فنوتیپی بسیار به هم شبیه‌اند (۵). همچنین باکتری‌های کمپلکس ACB در طول شیوع عفونت‌های بیمارستانی بسیار شایع می‌باشند پس شناسایی گونه‌های این باکتری به‌ویژه *A. baumannii* (گونه ژنومی ۲) در کنترل عفونت‌های ناشی از آن‌ها بسیار با ارزش است. با استفاده از سه آنزیم محدودگر *Alu*I، *Hha*I و *Mbo*I می‌توان اجزای این کمپلکس را از هم جدا کرد، به‌ویژه در مورد باندهای حاصل از برش آنزیمی *Hha*I که ۴ قطعه بسیار واضح را ایجاد می‌کند. علاوه بر ARDRA روش‌های بسیاری برای شناسایی گونه‌های ژنومی جنس آسینتوباکتر وجود دارد که از آن جمله می‌توان به روش آنالیز اثر انگشت DNA با چندشکلی طول قطعات حاصل از برش با آنزیم محدودگر (RFLP= Fingerprint analysis by amplified fragment lenght) (۱۳)، تمایز بین ژن‌های *gyrB* (۱۴)، برش آنزیمی ژن *recA* (restriction analysis of the recA gene) (۱۵)، آنالیز محدودگر توالی‌های spacer بین ژن‌های (Restriction analysis of the 16S-23S rRNA 16S-23S rRNA) (۱۶) و آنالیز توالی 16S rDNA (sequence analysis of 165 rDNA) (۱۷) اشاره کرد. در مجموع روش‌های زیادی برای شناسایی گونه‌های ژنومی آسینتوباکتر وجود دارد. در این میان ARDRA با استفاده از این ۳ آنزیم محدودگر به خوبی تفاوت و تمایز بین گونه‌های ژنومی را به‌ویژه کمپلکس ABC که شناسایی آن از طریق تست‌های فنوتیپی غیرممکن بوده نشان می‌دهد. با استفاده از این روش می‌توان بسیاری از گونه‌های باکتریایی را راحت و بدون نیاز به اطلاعات توالی‌یابی به‌طور مستقیم در بانک اطلاعاتی قرار داد. این روش همچنین تنها به یک مرحله ساده استخراج DNA نیاز دارد و از نظر تکنیکی نسبت به سایر روش‌های مولکولی راحت‌تر و دارای خطر آلودگی کم‌تری برای پرسنل آزمایشگاهی است. همچنین تفسیر الگوی حاصل از این روش با استفاده از دستگاه الکتروفورز به سادگی قابل انجام است.

نتیجه‌گیری

شناسایی گونه‌های ژنومی توسط ARDRA می‌تواند نسبتاً راحت و بدون نیاز به تجهیزات گران‌قیمت انجام شود. در پژوهش حاضر هزینه انجام این روش شناسایی برای ۷۵ نمونه تقریباً ۴۰۰ هزار تومان شد که نسبت به روش‌های کشت در محیط‌های مختلف تشخیصی و بیوشیمیایی کم‌هزینه‌تر بوده و از طرفی دقت نتایج نیز بالاست، به‌طوری‌که شناسایی با این روش نسبت به بسیاری از روش‌های دیگر مقرون به‌صرفه‌تر است. بنابراین، با این روش، مطالعات اکولوژی گونه‌های ژنومی مختلف امکان‌پذیر است. آسینتوباکترها طیف گسترده‌ای از نیچ‌های اکولوژیکی را اشغال می‌کنند و با توجه به تنوع ژنتیکی موجود در این جنس احتمالاً تمامی گونه‌ها در طبقه‌بندی حاضر منعکس نشده است. بنابراین کشف سویه‌هایی که هنوز جزء گونه‌های ژنومی طبقه‌بندی‌شده

نیستند با کمک روش ARDRA و دیگر روش‌های شناسایی پیش‌بینی می‌شود. با استفاده از روش ARDRA و سه آنزیم محدودالاثر *Alu*I، *Hha*I و *Mbo*I می‌توان *A.baumannii* را که پاتوژنی بسیار خطرناک و شایع در عفونت‌های بیمارستانی است از اجزای کمپلکس ABC تفکیک کرد.

References

1. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. Acinetobacter baumannii: Emergence of a successful pathogen. Clin Microbiol Rev. 2008;21(3):538-82.
2. Bonomo RA, Szabo D. Mechanisms of multidrug resistance in Acinetobacter species and Pseudomonas aeruginosa. Clin Infect Dis. 2006;43(2):49-56.
3. Gordon NC, Wareham DW. Multidrug-resistant Acinetobacter baumannii: Mechanisms of virulence and resistance. Int J Antimicrob Agents. 2010;35(3):219-26.
4. Bouvet P, Jeanjean S. Delineation of new proteolytic genomic species in the genus Acinetobacter. Res Microbiol. 1989;140(4):291-9.
5. Tjernberg I, Ursing J. Clinical strains of Acinetobacter classified by DNA-DNA hybridization. APMIS. 1989;97(7):595-605.
6. Bouvet P, Grimont P. Identification and biotyping of clinical isolates of Acinetobacter. AnnInst Pasteur Microbiol. 1987;138(5):569-78.
7. Gerner-Smidt P, Tjernberg I, Ursing J. Reliability of phenotypic tests for identification of Acinetobacter species. J Clin Microbiol. 1991;29(2):277-82.
8. Houang ET, Chu YW, Chu K, Ng K, Leung C, Cheng A. Significance of genomic DNA group delineation in comparative studies of antimicrobial susceptibility of Acinetobacter spp. Antimicrob Agents Chemother. 2003;47(4):1472-5.
9. Kämpfer P, Tjernberg I, Ursing J. Numerical classification and identification of Acinetobacter genomic species. J App Microbiol. 1993;75(3):259-68.
10. Vaneechoutte M, Dijkshoorn L, Tjernberg I, Elaichouni A, de Vos P, Claeys G, et al. Identification of Acinetobacter genomic species by amplified ribosomal DNA restriction analysis. J Clin Microbiol. 1995;33(1):11-5.
11. Dijkshoorn L, van Harsselaar B, Tjernberg I, Bouvet PJ, Vaneechoutte M. Evaluation of amplified ribosomal DNA restriction analysis for identification of Acinetobacter genomic species. Syst Appl Microbiol. 1998;21(1):33-9.
12. Green MR, Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual. 2th ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press 2012;65-73.
13. Janssen P, Coopman R, Huys G, Swings J, Bleeker M, Vos P, et al. Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. Microbiol. 1996;142(7):1881-93.
14. Yamamoto S, Harayama S. Phylogenetic analysis of Acinetobacter strains based on the nucleotide sequences of gyrB genes and on the amino acid sequences of their products. Int J Syst Bacteriol. 1996;46(2):506-11.
15. Nowak A, Kur J. Differentiation of seventeen genospecies of Acinetobacter by multiplex polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. Mol Cell Probes. 1996;10(6):405-11.
16. Dolzani L, Tonin E, Lagatolla C, Prandin L, Monti-Bragadin C. Identification of Acinetobacter isolates in the A. calcoaceticus-A. baumannii complex by restriction analysis of the 16S-23S rRNA intergenic-spacer sequences. J Clin Microbiol. 1995;33(5):1108-13.
17. Rainey FA, Lang E, Stackebrandt E. The phylogenetic structure of the genus Acinetobacter. FEMS Microbiol Lett. 1994;124(3):349-53.