تشخیص
آزمایشگاهی
Tashkhis
Azmayeshgahi
سال چهاردهم
شهریور- مهر
۱۳۹۰
شماره ۷۳

مطالعه کاربرد استفاده از روش Real–Time PCR در تعین و تشخیص وجود ژن لکوسیدین پنتون والنتین (PVL) در سویه های استافیلوکوکوس اوریوس بیماران بستری شده در بخش های مختلف بیمارستان

حامد ملاعباس زاده / دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان
hamed_molaabaszadeh@yahoo.com

دکتر هایده مبین / استادیار میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز

دکترحمید میرزایی/ دانشیار بهداشت مواد غذائی، معاون پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز و عضو هیت علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز.

امیر منفردان / کارشناسی ارشد هماتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز.

حامد شهیرفر/ دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه و پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان.

چکیده:

استافیلوکوکوس اوریوس یک پاتوژن فرصت طلب است، که در بستر دلخواه خود ،انسان و جانداران را آلوده می کند.
یکی از چهار عامل عفونت های بیمارستانی است، و با رشد در مواد غذایی و تولید انتروتوکسین سبب مسمومیت غذایی در انسان شود.
پنتون والنتین لوکوسیدین PVL یک توکسین سلولی می باشد که در نمونه های استافیلوکوس اوریوس دیده می شود، و سلول های پلی مورفونوکلئار، مونوسیت ها و ماکروفاژ ها را آماج قرار می دهد.توسط یک فاژ متحرک کد می شود.
پنتون والنتین لوکوسیدین PVL ، باکتری استافیلوکوکوس اوریوس یک فاکتور ویرولانس مهم می باشد، که باعث افزایش قدرت نفوذ پذیری غشاء سلولی و در نتیجه سبب لیز شدن لکوسیت ها و نکروز بافت می‌شود، و یک تهدید جدی برای سلامت انسان ها به شمار می آید، و باعث ایجاد مشکلات بهداشتی در سطح جهان می شود.
با توجه به این که ژن لکوسیدین پنتون والنتین (PVL) یک توکسین سلولی می باشد و با ایجاد لیز سلول ها به خصوص سلول های ایمنی مانند لکوسیت ها و ماکروفاژ ها یک تهدید جدی برای سلامت انسان ها به شمار می آید، تشخیص سریع و دقیق این ژن در باکتری استافیلوکوکوس اوریوس امری ضروری به نظر می رسد، که می توان با استفاده از روش Real-Time PCR کمک شایانی به آزمایشگاهیان و پزشکان نمود.

کلمات کلیدی: Real-Time PCR، استافیلوکوکوس اوریوس، پنتون والنتین لوکوسیدین PVL

۱- پیش گفتار

۱-۱ ریخت شناسی باکتری استافیلوکوکوس اوریوس:

این باکتری گرم مثبت، خوشه ای، بی هوازی اختیاری، کاتالاز مثبت است. میکروفلور پوست است که در پوست به ویژه پوست دست، پا، مو و لابه لای انگشتان دست به صورت طبیعی زندگی می کند (۱).

باکتری استافیلوکوکوس اوریوس کروی شکل است که در محیط های کشت تکثیر یافته و دارای فعالیت متابولیکی شدیدی هستند، کربوهیدرات ها را تخمیر کرده و پیگمان هایی به رنگ سفید تا زرد پررنگ (طلایی) تولید می کنند (۲).

استافیلوکوکوس اوریوس یکی از چهار عامل مهم عفونت های بیمارستانی می باشد. می تواند در مجاری تنفسی و در کیست فیبروز (CF) کلونیزه شود (۳).

هم چنین یکی از مهم ترین عوامل عفونت کسب شده از اجتماع است، که می تواند عامل عفونت های مهمی هم چون باکتریمی، اندوکاردیت، استئومیلیت، سندرم شوک توکسیک و عفونت های پوستی باشد (۴،۵).

طبق گزارش های تازه این باکتری نسبت به آنتی بیوتیک متی سیلین مقاومت پیدا کرده است (۶).

۱-۲ توکسین های تولید شده توسط باکتری استافیلوکوکوس اوریوس:

توکسین های تولید شده در باکتری های گرم مثبت مانند باکتری استافیلوکوکوس اوریوس یک تهدید جدی برای زندگی انسان ها در سطح جهان به شمار می آید (۷).

استافیلوکوکوس اوریوس در همه جا وجود دارد و سبب بیماری زایی می شود. می تواند توکسین های مختلفی را مانند توکسین آلفا، بتا، گاما، دلتا و لکوسیدین تولید نماید.

در سال های واپسین توکسین لکوسیدین مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است (۸).

پنتون والنتین لوکوسیدین PVL، یک توکسین سلولی می باشد که در نمونه های استافیلوکوکوس اوریوس دیده می شود و علیه سلول های پلی مورفونوکلئار، مونوسیت ها و ماکروفاژ ها فعالیت می کند و توسط یک فاژ متحرک کد می شود (۹).

پنتون والنتین لوکوسیدین PVL ، باکتری استافیلوکوکوس اوریوس یک فاکتور ویرولانس مهم می باشد که دارای ۲ جزء S و F می باشد (ژن های luk F -PV و LukS-PV در سال ۱۹۳۰ گزارش شد) که باعث افزایش قدرت نفوذ پذیری غشاء سلولی و در نتیجه سبب لیز شدن لکوسیت ها و نکروز بافت می شود (۱۰).

۱-۳ اپیدمیولوژی ژن پنتون والنتین لوکوسیدین PVL :

پنتون والنتین لوکوسیدین PVL مثبت که رابطه مستقیمی با نکروز پنومونیه و زخم های نکروز پوستی دارد (۱۲،۱۶)، اولین بار توسط ون د وال (Van de Velde) در سال ۱۸۹۴ شناسایی و معرفی شد و توسط پنتون و والانتین در سال ۱۹۳۲ از میان لکوسیدین ها جدا سازی شد (۱۱،۱۲).

۱-۴ مقاومت باکتری استافیلوکوکوس اوریوس نسبت به آنتی بیوتیک ها:

استافیلوکوکوس اوریوس مقاوم به متی سیلین (MRSA) ، نخستین بار در اروپا (۱۹۵۹) و در آمریکا (۱۹۶۸) جدا سازی و از آن تاریخ، انتشار آن به طور مداوم از سراسر جهان گزارش شد (۱۳).

استافیلوکوکوس اوریوس مقاوم به متی سیلین (MRSA) یک پاتوژن بیمارستانی معمول می باشد و به عنوان MRSA کسب شده از بیمارستان نامیده می شود (۱۴،۱۵).

از سال ۱۹۸۱، یک نوع جدید از MRSA به نام MRSA کسب شده از جامعه CA-MRSA انتشار یافته است (۱۶) که این ارگانیسم در ارتباط با عفونت بافت نرم/پوست می باشد.

در ایالات متحده آمریکا در بین سال های ۱۹۹۷ تا ۱۹۹۹ ، کودکان از عفونت CA-MRSA (از جمله پنمونی نکروز دهنده) فوت نموده اند (۱۷). در همان دوره در مناطق مثل اروپا و استرالیا CA-MRSA جدا سازی شده است و اکنون مرکز توجه جهانی شده است.

اگر چه از نظر ژنتیکی CA-MRSA چندین کلون اختصاصی قاره ای دارد ولی اغلب سویه ها دارای ژن های لکوسیدین پنتون والنتین می باشند (۱۸،۱۹).

در ایران اطلاعات بسیار کمی در این خصوص (پنتون والنتین لوکوسیدین) وجود دارد و اغلب تحقیقات انجام شده به بررسی مقاومت های آنتی بیوتیکی باکتری استافیلوکوکوس اوریوس به ویژه مقاومت به متی سیلین مربوط می شود (۲۰).

۲- روش مولکولی Real-Time PCR

با ورود نسل تازه ا ی از ترموسایکلرها با سیستم فلورومتری که اجازه پایش پیوسته خاصیت فلوئورسانس محصول PCR در زمان جمع شدن را می دهد، این روش ابداع شد.

در این روش از کاوشگرها یا پروب های هیبریداسیون نشان دار شده با رنگ های فلورسانس، در انتهای فاز ۵ یا ۳ استفاده می شود که امکان پایش پیوسته محصول PCR را بدون جداسازی آن ها در روش های الکتروفورز در ژل آگاروز یا ژل پلی آکریل آمید می دهد.

این سیستم در سال ۱۹۹۲ کشف شد. این روش به دلیل کاهش زمان سیلک های PCR، حذف مرحله Post-PCR و کاربرد نشانگرهای فلوروژنیک و روش های حساس آشکارسازی تابش آن ها باعث افزایش سرعت این سیستم نسبت به سیستم PCR معمولی شده است.

سازندگان و کاربران این روش سعی می کنند محصول PCR کوچکتر طراحی کنند تا سرعت افزایش یابد (۲۱). به طور کلی Real Time PCR تکنیکی برای دیدن پیوسته ی پیشرفت واکنش PCR در طول زمان می باشد. همچنین با این روش می توان اندازه ی فراورده های PCR (DNA، cDNA یا RNA) را نیز اندازه گیری نمود.

این روش بر مبنای فلوروسنت تولیدی از مولکول گزارشگر (Reporter) می باشد، که درروند واکنش افزایش می یابد. مولکول ها ی گزارشگر فلوروسنت یا به صورت رنگ هایی می باشند که به DNA دو رشته ای باند می شوند مانند SYBR® Green و یا به گونه ی شناساگرهای توالی های خاص مانند TaqMan® Probes می باشند.

این تکنیک می تواند با حداقل اسید نوکلئیک آغاز شود و مقدار تولید نهایی را با دقت زیادی تعیین نماید.

محدود به زمان و ذخیره منابع نمی باشد، به آسانی انجام پذیر است و دقت و حساسیت بالاتر از PCR معمولی دارد.

این روش توانایی تشخیص بسط PCR را در مرحله اولیه واکنش دارد، در حالی که تشخیص در PCR معمولی در مرحله نهایی واکنش می باشد (۲۲).

در تکنیک Real-time PCR، دقیق ترین و قابل اعتمادترین نتایج با استفاده از شاخص های گزارشگر فلورسانس به دست می آید، که البته هزینه زیادی نیز در بردارد.

در این روش از شاخص های DNA یا RNAی اختصاصی (sequence-specific RNA or DNA-based probe) استفاده می شود و در نتیجه در DNAی هدف، جستجو و تعیین غلظت برای سکانس های خاص امکان پذیر می شود.

بنابر این حتی در حضور سایر انواع DNA، نتایج به دست آمده از نظر اختصاصی بودن، در حد بالائی است. در این شرایط، چنانچه از شاخص های اختصاصی با رنگ های مختلف استفاده شود، حتی می توان ژن های متعددی را در یک واکنش PCR، مورد بررسی قرار داد (۲۳).

لذا استفاده از تکنیکی که بتواند با میزان دقت بالا و زمان کم ژن لکوسیدین پنتون والنتین را تشخیص دهد امری ضروری به نظر می رسد، استفاده از روش مولکولی Real-Time PCR می تواند در این راستا کمک شایانی به متخصصان نماید زیرا نتایج حاصل ازReal-time PCR در شناسایی و تشخیص ژن لکوسیدین پنتون والنتین دقیق و سریع به دست آمده و قدرت تفکیک پذیری بالایی دارد. همچنین این روش برای ارزیابی مقادیر دقیقی از DNA و RNA نیز قابل استفاده می باشد (۲۴).

هدف از این مطالعه معرفی روش Real-Time PCR به عنوان روش تشخیص سریع و شناسایی دقیق ژن لکوسیدین پنتون والنتین در باکتری استافیلوکوکوس اوریوس می باشد که این امر به کنترل و جلوگیری از انتشار باکتری فوق کمک خواهد نمود.

۳- بحث و نتیجه گیری

بیماری های برآمده از غذا (food borne diseases) چالش بزرگی برای سلامت و بهداشت عمومی به شمار می آید. سالانه میلیون ها نفر از جمعیت جهان به آن آلوده و شماری نیز دچار مرگ و یا در بیمارستان ها بستری می شوند ،

وهزینه های چند میلیارد دلاری به بار می آورد. استافیلوکوکوس اوریوس به عنوان دومین و یا گاهی سومین علت مهم این بیماری ها محسوب می شود (۲۵).

مسمومیت غذایی این باکتری که به علت حضور سویه های انتروتوکسیژنیک آن در غذاها و هضم آن ایجاد می شود، برخلاف مسیر آرام خود زیان های اقتصادی چشمگیری به بار می آورد.

این باکتری برای رشد آسان خود در بسترهای گوناگون، از غذاهای متنوعی اعم از شیر و فرآورده های لبنی، فرآورده های گوشتی، سبزیجات، سالاد، غذاهای پخته و نمکی و به ویژه غذاهایی که فرآیند ساخت آن ها دستخوش دستکاری های زیاد می شود، قابل جدا سازی است (۲۶).

با توجه به این که ژن لکوسیدین پنتون والنتین (PVL) یک توکسین سلولی باکتری استافیلوکوکوس اوریوس می باشد و با انجام لیز درسلول ها به ویژه سلول های ایمنی مانند لکوسیت ها و ماکروفاژ ها یک تهدید جدی برای سلامت انسان ها به شمار می آید، تشخیص زود هنگام و درست این ژن در باکتری استافیلوکوکوس اوریوس، نیازی اساسی است.

پیشنهاد می شود با پژوهش های بیشتر درکانون های پژوهشی کشورمان بتوان گام های اساسی در این زمینه برداشت.

References : .....

1) Hien M. Nguyen, Miguel A. Rocha, Koteswara R. Chintalacharuvu, David O. Beenhouwer. Detection and quantification of Panton–Valentine leukocidin in Staphylococcus aureus cultures by ELISA and Western blotting: Diethylpyrocarbonate inhibits binding of protein A to IgG. Journal of Immunological Methods. 5-1 ;356 ,2010.
2) Jawetz M, Adelberg E. Medical Microbiology. 23 rd Edition-Mc Graw Hill. 252-244 ,2004.
3) Barbara C, Kahl. Impact of Staphylococcus aureus on the Pathogenesis of Chronic Cystic Fibrosis Lung Disease. International Journal of Medical Microbiology. -514 ;300 ,2010 519.
4) Silva Holtfreter, Julia Kolata, Barbara M ,Br¨oker. Towards the Immune Proteome of Staphylococcus aureus-Theanti-S. aureus Antibody Response. International Journal of Medical Microbiology. 192-176 ; 2010,300.
5) Schlebusch S, Schooneveldt J M, Huygens F. Prevalence of Staphylococcus aureus Strains in an Australian Cohort, 2003–1989: Evidence for the Low Prevalence of the Toxic Shock Toxin and Panton-Valentine Leukocidin Genes. Eur Journal Clin Microbiol Infect Dis. 1189-1183 ;28 ,2009.
6) Jodi A L. Genomic Variation on Devolution of Staphylococcus aureus. International Journal of Medical Microbiology. 103-98 ;300 ,2010.
7) Fadi B, Zoulikha O, Farida S, Didier R, Jean-Marc R. MALDI-TOF-MS for Rapid Detection of staphylococcal Panton–Valentine Leukocidin. International Journal of Antimicrobial Agents. 470-467 ;34 ,2009.
8) Christiane W, Wolfgang W, Christiane G. Insertion of Host DNA into PVL-Encoding Phages of the Staphylococcus aureus Lineage ST80 by Intra-Chromosomal Recombination. Journal Virology. 327-322 ;406 ,2010.
9) Ramos A, Ley L, Muñez E, Videl A, Sánchez I. Brain Abscess Due to Panton-Valentine Leukocidin Positive Staphylococcus aureus. Journal Infection. 367-365 ;37 ,2009.
10) Supersac G, Prevost G, Piemont Y. Sequencing of leucocidin R from Staphylococcus aureus P83 suggests that staphylococcal leucocidins and gamma-hemolysin are members of a single,two-componentfamily of toxins. Journal Infect.Immun. 587–580 ;61 ,1993.
11) Clark J. A brief review of Panton-Valentine Leukocidin Producing staphylococcal Infections in the Intensive Therapy Unit. Current Anaesthesia & Critical Care -330 ,2008 .19 332.
12) Davide Campoccia, Lucilla Baldassarri, Valter Pirini, Stefano Ravaioli, Lucio Montanaro, Carla R. Arciola. Molecular epidemiology of Staphylococcus aureus from implant orthopaedic infections: Ribotypes, agr polymorphism, leukocidal toxins and antibiotic resistance. Journal Biomaterials. 4116–4108 ;29 ,2008.
13) Barrett FF, Mcgehee JRF, Finland M .Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus at Boston city Hospital: Bacteriological and Epidemiological Observation. N England Journal of Med. 448-441 ;279 ,1968.
14) Brumfitt W, Hamilton Miller J. Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus. N. England. Journal of Med. 1196-1188 ;320 ,1989.
15) Voss A, Doebbeling B N. The Worldwide Prevalence of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus. Journal Antimicrob Agents. 106-101 ;5 ,1995
16) Center for Disease Control and Prevention. Community-acquired methicillin- Resistant Staphylococcus aureus Infection-Michigan.Morb.Mortal. Wkly. Rep. 187-185 ;30 ,1981.
17) Center for Disease Control and Prevention. Four Pediatric Deaths from Community-Acquired Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus-Minnesota and North Dakota, 1999-1997. Morb. Mortal. Wkly. Rep. 710-707 ;48 ,1999.
18) Vandenesch F, Naimi T, Enright M C, Lina G, Nimmo G R, Heffernan H, Liassine N, Bes M, Greenland T, Reverdy M E, Etienne J. Community-Acquired Methicillin- Resistant Staphylococcus aureus Carrying Panton-Valentine Leukocidin Genes. Worldwide emergence, Emerg. Infect. Dis. 984-978 ;9 ,2003.
19) Naimi T S, LeDell K H, Como-Sabetti K, Borchardt S M, Boxrud D J, Etienne J, Johnson S K, Vandenesch F, Fridkin S, Boyle C O, Danila R N, Lynfieid R. Comparison of Community and Health Care-associated Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Infection. JAMA. 2984-2976 ;290 ,2003.
20) Saadati M, Barati B, Shirazi M. Detection of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Type and Molecular Assay for the Simultaneous Detection of Sea and Seb Genes. The 5th national biotechnology congress of Iran. 782 ,2007.
21) Shariati L, Validi M, Tabatabaiefar M A, Karimi A, Nafisi M R. Comparison of Real-Time PCR with Disk Diffusion, Agar Screen and E-test Methods for Detection of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus. Curr Microbiol. 2010, DOI 10.1007/s9-9647-010-00284.
22) Bachmann M.H., Mathiason-Dubard C, Learn G.H, Rodrigo A G, Sodora D L, Mazzetti P, Hoover E A, Mullins J I. Genetic diversity of feline immunodeficiency virus: dual infection, recombination, and distinct evolutionary rates among envelope sequence clades. Journal irol. 4253-4241 ;71 ,2008.
23) Belgrader P, Okuzumi M, Pourahmadi F, Borkholder D A, Northrup M A. A microfluidic cartridge to prepare spores for PCR analysis. Biosens Bioelectron. 852-849 ;14 ,2001.
24) Chiang P W, Song W J, Wu K Y, Korenberg J R, Fogel E J, Van Keuren M L, Lashkari D, Kurnit D M. Use of a fluorescent-PCR reaction to detect genomic sequence copy number and transcriptional abundance. Journal Genome Res. 1026-1013 ;6 ,1996.
25) Ruud H. Deurenberg, Ellen E. Stobberingh. The evolution of Staphylococcus aureus. Journal Infection, Genetics and Evolution. 763–747 ;8 ,2008.
26) van den Broek P. Staphylococcus aureus, a successful pathogen. Ned. Journal Infection. 1048–1045 ;147 ,2003.