مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره هفتم، شماره چهارم، مهر ـ آبان ۹۲
صفحه ۸۱ الی ۸۸

مقاله پژوهشی
(Original Article)

طراحی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز بهبودیافته جهت تشخیص مولکولی باکتری *استرپتوکوکوس نیومونیا*

فهیمه آقامیری[۱]، محمد سلیمانی[۲]، امیرحسین محسنی[۲]، کیوان مجیدزاده[۳*]

چکیده

زمینه و هدف: باکتری *استرپتوکوکوس نیومونیا* عامل منتژیت باکتریایی و یک عامل مهم مرگ و میر در کودکان و افراد سالخورده است. کنترل این بیماری نیز وابسته به تشخیص سریع باکتری می‌باشد. روش‌های تشخیص این باکتری شامل رنگ‌آمیزی گرم، کشت و تست‌های سرولوژیکی است. این روش‌ها وقت‌گیر و در اثر مصرف آنتی‌بیوتیک منجر به نتایج منفی کاذب می‌شوند. در حال حاضر، روش‌های مولکولی مانند PCR به‌صورت روزانه برای تشخیص عوامل عفونی استفاده می‌شوند. این مطالعه با هدف طراحی یک واکنش بهبودیافته PCR جهت تشخیص باکتری *استرپتوکوکوس نیومونیا* صورت گرفت.

روش بررسی: پرایمرهای تشخیصی اختصاصی براساس ژن *ply* باکتری طراحی گردید. پس از تکثیر ژن هدف در DNA ژنومی باکتری، محصول PCR در پلاسمید *pTZ57R/T* کلون شد و پلاسمید تأییدشده *pTZ-ply* به‌عنوان کنترل مثبت در آزمایشهای بعدی مورد استفاده قرار گرفت. جهت تعیین حساسیت واکنش، رقت‌های متوالی ۱۰ تایی از پلاسمید *pTZ-ply* تهیه و بر روی آنها واکنش PCR انجام گرفت. برای تعیین ویژگی واکنش از ژنوم تعدادی باکتری مرتبط یا غیرمرتبط در واکنش PCR استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج PCR مطابق انتظار، قطعه ۷۲۷ جفت باز را نشان داد. هیچ‌گونه تکثیری در PCR بر روی ژنوم باکتری‌های کنترل منفی دیده نشد. این نتایج نشان‌دهنده ویژگی بالای واکنش PCR بود. پایین‌ترین حد تشخیص این آزمون در تشخیص ژن *ply*، ۲۵۰ کپی از ژن در یک واکنش ۲۵ میکرولیتری بود.

نتیجه‌گیری: حساسیت، ویژگی و سرعت بالای آزمون طراحی‌شده، آن را به‌عنوان یک تست مناسب برای استفاده در آزمایشگاه‌های کلینیکی مطرح می‌کند. همچنین ارزیابی بیشتر این آزمون با استفاده از نمونه‌های کلینیکی یا مواد آلوده‌شده مصنوعی، کاربرد این روش را در مجموعه‌ای کلینیکی تأیید خواهد کرد.

کلید واژه‌ها: واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز؛ واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز- روش‌ها؛ تشخیص سریع؛ استرپتوکوکوس نیومونیا.

[۱]دانشجوی کارشناس ارشد میکروب‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران.

[۲]استادیار میکروب‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران.

[۳]استادیار بیوتکنولوژی، مرکز تحقیقات زیست فن‌آوری تسنیم، پژوهشکده سرطان پستان جهاد دانشگاهی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی آجا ایران، تهران، ایران.

[*]نویسنده مسئول مکاتبات:
کیوان مجیدزاده، مرکزتحقیقات زیست فناوری تسنیم، پژوهشکده سرطان پستان جهاد دانشگاهی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی آجا ایران، تهران، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:
kmajidzadeh@razi.tums.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۰/۵/۱۳

تاریخ پذیرش: ۹۱/۳/۲۴

لطفاً به این مقاله به‌صورت زیر استناد نمایید:

Aghamiri F, Soleimani M, Mohseni AH, Majidzade K.
Design of an Improved Polymerase Chain Reaction (PCR) Assay for Molecular Detection of *Streptococcus pneumonia.*
Qom Univ Med Sci J 2013;7(4):81-88. [Full Text in Persian]

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

استرپتوکوکوس نیومونیا دیپلوکوکوس گرم مثبت، آلفاهمولیتیک، حساس به اپتوچین و آئروتولرانت است (۱)، که دارای یک کروموزوم دو رشته‌ای حلقوی بسته شامل ۲/۱-۲ میلیون جفت باز می‌باشد. مخزن پنوموکوکسی، بخش فوقانی دستگاه تنفسی افراد سالم است. این باکتری دارای فاکتورهای ویرولانس متعدد بوده که در ایجاد بیماری‌های تهاجمی و غیرتهاجمی مؤثر است. همچنین این باکتری از مهم‌ترین عوامل منتژیت باکتریایی در کودکان کمتر از ۵ سال و افراد سالخورده بالای ۶۵ سال محسوب می‌شود (۲). روش‌های اولیه تشخیصی شامل تهیه گسترش مستقیم، کشت و شناسایی آنتی‌ژن باکتریایی است (۳). روش تهیه گسترش مستقیم، یک روش سریع در تشخیص است (۴)، که نیازمند 10^{5}-10^{2} باکتری در هر میلی‌لیتر از نمونه می‌باشد. در روش کشت نیز ۷۲-۱۲ساعت زمان نیاز است (۵). علاوه بر زمانبر بودن این روش ممکن است به‌علت مصرف دارو قبل از نمونه‌گیری، نتایج منفی کاذب ایجاد شود. روش‌های تشخیص آنتی‌ژن‌های باکتریایی مانند روش آگلوتیناسیون لاتکس و کانتر ایمونوالکتروفورزیس معمولاً نیازمند حضور بیش از 10^{3} کلونی (CFU) از میکروارگانیسم در هر میلی‌لیتر نمونه است (۶). در حال حاضر، استفاده از روش‌های مولکولی جهت شناسایی این باکتری منجر به تشخیص سریع، دقیق و درمان به‌موقع بیماری‌های عفونی شده است (۱۰-۷). Radstrom و همکاران در مطالعه خود با استفاده از ژن *16SrRNA* جهت شناسایی *استرپتوکوکوس نیومونیا*، *هموفیلوس آنفلوانزا* و *نایسریا منتژیتیدیس* (۱۱)، به این نتیجه دست یافتند که این ژن از اختصاصیت پایینی جهت شناسایی باکتری *استرپتوکوکوس نیومونیا* برخوردار است؛ زیرا این ژن در بسیاری از میکروارگانیسم‌ها به‌صورت حفاظت‌شده وجود دارد. Catrin و همکاران، Ezabel و همکاران در سال ۲۰۰۰ از ژن *psaA* در جهت شناسایی این باکتری استفاده کردند. این ژن علاوه بر *استرپتوکوکوس نیومونیا*، در باکتری‌های *استرپتوکوکوس میتیس* و *استرپتوکوکوس آنجینوسیس*، همچنین در استرپتوکوکسی‌های بیماریزای دیگر نیز حضور دارد. بنابراین، ممکن است در تشخیص این باکتری خطا ایجاد شود (۱۳،۱۲). Rintamaki و همکاران (سال ۲۰۰۲)، Van Haeften و همکاران (سال ۲۰۰۳)، همچنین Saukkoriipi و همکاران از ژن *ply* جهت شناسایی باکتری *استرپتوکوکوس نیومونیا* استفاده کردند. نتایج مطالعه آنها نشان داد ژن مذکور بهترین هدف برای شناسایی باکتری *استرپتوکوکوس نیومونیا* است؛ زیرا این ژن در تمامی سویه‌های این باکتری به‌صورت حفاظت‌شده وجود دارد. همچنین ژن *ply* به‌عنوان یک فاکتور بیماریزای مهم با طیف وسیعی از فعالیت‌های بیولوژیکی همراه است. بنابراین، شناسایی این باکتری با استفاده از ژن *ply*، یک تکنیک حساس، دقیق و سریع به شمار می‌رود (۱۴،۷،۲). Wei و همکاران در سال ۲۰۰۳، از ژن *malM* جهت شناسایی این عامل استفاده کردند. این ژن مسئول ساخت پروتئین آمیلومالتاز است.

نتایج این مطالعه نشان داد شناسایی این باکتری با استفاده از ژن *malM* دارای ویژگی و حساسیت کمتری نسبت به ژن *ply* بوده است (۶). ژن *ply* کدکننده پروتئین پنومولایزین است. این پروتئین، یک فاکتور ویرولانس با اندازه ۵۳ کیلودالتون (۱۷-۱۵) و دارای عملکرد چندگانه بوده که در تمامی ۹۰ سویه *استرپتوکوکوس نیومونیا* تولید و جهت کمک به رشد و پخش در طول مراحل اولیه عفونت پنوموکوکالی ظاهر می‌شود (۱۸). Selva و همکاران نیز در سال ۲۰۱۰ از ژن *ply* در جهت شناسایی باکتری *استرپتوکوکوس نیومونیا* در یک واکنش Multiplex PCR استفاده کردند. تعیین حد تشخیص (Limit Of Detection, LOD)، یکی از مهم‌ترین شاخص‌های کیت‌های تشخیص مولکولی است، که محققین از روش‌های مختلف برای محاسبه آن استفاده می‌کنند. یکی از این روش‌ها، تهیه رقت‌های سریال از باکتری زنده، سپس شمارش آنها و تعیین واحدهای کلونی‌ساز (Colony Forming Unit; CFU) است. در این روش ژنوم از رقت‌های مختلف باکتری استخراج شده و با انجام PCR، حد تشخیص محاسبه می‌شود. در سال ۱۳۸۶، سعادتی و همکاران واکنش Multiplex PCR را جهت شناسایی *استرپتوکوکوس نیومونیا*، *هموفیلوس آنفلوانزا* و *نایسریا منتژیتیدیس* طراحی کردند. در این مطالعه، برای تعیین حساسیت واکنش، ابتدا با تهیه سوسپانسیون باکتری، رقت‌های سریال از آن تهیه شد و در جهت تعیین حساسیت استفاده گردید. مهم‌ترین نقطه ضعف این کار، نیاز به باکتری زنده بود.

Archive of SID
www.SID.ir

روش دیگر تعیین LOD، اندازه‌گیری غلظت ژنوم، تهیه رقت‌های سریال از آن و انجام PCR بر روی آنها و تخمین حد تشخیص است. در تحقیقاتی که توسط Rintamaki و همکاران انجام شد از رقت‌های مختلف DNA استخراج‌شده از باکتری موجود در محیط کشت در جهت آزمون حساسیت استفاده شد (۲). در مطالعه‌ای که توسط Selva و همکاران صورت گرفت برای بررسی حساسیت واکنش از DNA ژنومیک؛ واکنش PCR بر روی این رقت‌ها انجام شد (۵). همچنین Saukkoriipi و همکاران نیز در مطالعه خود از رقت‌های DNA جهت تعیین حساسیت استفاده کردند (۱۴).

از جمله معایب این روش آن است که DNA ژنومیک به‌علت دارا بودن اندازه بسیار زیاد، از یک‌سو به‌صورت یکنواخت در تیوب‌های تهیه رقت تقسیم نمی‌شود و از سویی دیگر به‌دلیل ناپایداری زیاد، به‌راحتی تخریب می گردد. درحالی که در مطالعه حاضر به جای استفاده از باکتری زنده و یا DNA ژنومیک، جهت تعیین *LOD* از یک کانستراکت پلاسمیدی استاندارد حاوی محصول PCR ژن هدف استفاده شد، سپس LOD واکنش با استفاده از این پلاسمید استاندارد تعیین گردید. از آنجایی که پلاسمید قطعه بسیار کوچکی است، و از پایداری بسیار بالایی برخوردار بوده و به‌صورت یکنواخت نیز در تهیه رقت تقسیم می‌شود. لذا این مطالعه با هدف راه‌اندازی تکنیک PCR جهت تشخیص سریع باکتری *استرپتوکوکوس نیومونیا* و تعیین حساسیت و ویژگی آنالیتیک آن صورت گرفت.

روش بررسی

استخراج ژنوم باکتری *استرپتوکوکوس نیومونیا* (ATCC700669) به‌وسیله کیت استخراج DNA ژنومیک (شرکت سیناژن، کیت استخراج DNA) انجام شد. ارزیابی کیفی و کمّی DNA استخراج‌شده به‌وسیله ژل آگارز و تعیین جذب نوری توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (Picodrop) صورت گرفت. همچنین از ژنوم تعدادی از باکتری‌های منسوب و غیرمنسوب به‌عنوان کنترل منفی در این مطالعه استفاده شد (جدول).

جدول: لیست ژنوم باکتری‌های کنترل منفی در آزمایش تعیین ویژگی روش

نام میکروارگانیسم	شماره سویه
Shigellasonnei	ATCC 9290
Klebsiella pneumonia	ATCC 7881
Escherichia coli	ATCC 25922
Bacillus subtilis	ATCC 6051
Staphylococcus aureus	ATCC 25923
Enterococcus faecalis	ATCC 29212
EnthropathogenicE.coli	ATCC 43887
E.coli O157:H7	ATCC 43895
Neisseria meningitides	ATCC 13060
Coxiellaburnetii(Nine mile)	ATCC VR615
Yersinia enterocolitica	PTCC 1480

در این مطالعه ژن ply به‌عنوان ژن هدف انتخاب شد. جهت طراحی پرایمر ابتدا ترادف‌های ثبت‌شده این ژن در Genbank (۱۹۲ ترادف)، از سایت NCBI (National Center for Biotechnology Information) استخراج و سپس با استفاده از نرم‌افزار CLC Sequence Viewer نسخه ۶ ردیف‌سازی شد. براساس ترادف مشترک به دست آمده و با استفاده از نرم‌افزار *Gene Runner* نسخه ۳، پرایمرهای جلویی و عقبی طراحی گردید. سکانس پرایمر جلویی 5′CAGCTACCAACGACAGTCGCC3′(21bp) و سکانس پرایمر عقبی 5′CCTGTTACAACTCGGGCACCC3′(21bp) بود. جهت ارزیابی ویژگی پرایمرها نیز از سرویس BLAST سایت NCBI استفاده شد. واکنش PCR جهت تشخیص ژن هدف در حجم ۲۵µl صورت گرفت. برای انجام این واکنش از ۱/۵mM یون $Mgcl_2$، ۰/۲mM dNTPs و بافر PCR به همراه یک واحد آنزیم Taq DNA Polymerase (شرکت کوثر، ایران)، ۰/۴mM از هر پرایمر و ۷۲ng از ژنوم باکتری *استرپتوکوکوس نیومونیا* استفاده شد. تکثیر در شرایط دمای دناتوراسیون اولیه ۹۵°c به مدت ۴ دقیقه، ۳۰ چرخه تکثیر با شرایط دناتوراسیون ۹۵ دقیقه به مدت یک دقیقه و دمای اتصال ۶۸°c به مدت ۳۰ ثانیه و دمای تکثیر ۷۲°c به مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت دمای تکثیر نهایی به مدت ۵ دقیقه در ۷۲°c انجام شد. همچنین از یک تیوب با شرایط مشابه و استفاده از آب دیونیزه به جای ژنوم باکتری، به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد.

Archive of SID
www.SID.ir

پس از اتمام واکنش تکثیر، ۵µl از محصول واکنش به همراه ۱µl از بافر لودکننده بر روی ژل آگارز ۱٪ در بافر TBE با ولتاژ ۱۰۰V، الکتروفورز شد. در نهایت، ژل آگارز حاوی رنگ اتیدیوم بروماید توسط دستگاه ژل داک بررسی گردید. جهت تهیه یک کنترل مثبت استاندارد برای تشخیص این باکتری، محصول PCR ژن *ply* در وکتور pTZ57R/T، کلون شد. بدین منظور در ابتدا محصول PCR با استفاده از کیت تخلیص محصول PCR (شرکت بایونیر، کره) مطابق با دستورالعمل کیت خالص‌سازی شد، سپس واکنش اتصال میان محصول خالص‌شده و وکتور pTZ57R/T با استفاده از آنزیم *T_4DNA ligase* (شرکت فرمنتاز، لیتوانی) در شرایط ۲۲°c به مدت ۵ ساعت انجام گرفت. در ادامه، محصول واکنش اتصال به سلول‌های *E.coli JM107* که از قبل به‌وسیله $Cacl_2$ پذیرا شده بود، انتقال یافت. باکتری ترانسفورم‌شده در محیط Luria-Bertani Agar (LB Agar) (شرکت مرک، آلمان) حاوی ۵- برومو ۴- کلرو ۳- ایندولیل بتا گالاکتوپیرانوزید (X-gal) با غلظت ۴۰mg/ml، ایزوپروپیل بتا دی تیو گالاکتوپیرانوزید (Isopropyl-beta-D-Thiogalactopyranoside, IPTG) با غلظت ۳۸/۴mg/ml، آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین با غلظت ۱۰۰mg/ml و نالیدیکسیک اسید با غلظت ۵۰mg/ml؛ کشت و در شرایط ۳۷°c به مدت ۱۶ ساعت انکوبه شد. در ادامه، از چند کلونی سفید و یک کلونی آبی رشدیافته بر روی محیط کشت، ماتریکس تهیه گردید. جهت ردیابی کلون‌های دارای ژن هدف، از تکنیک Colony PCR استفاده شد. پلاسمید یکی از کلونی‌های تأییدشده در مرحله قبل مطابق با دستورالعمل کیت استخراج پلاسمید (AccuPrep Plasmid Mini Extraction Kit) (شرکت بایونیر، کره) استخراج شد.

به‌منظور تأیید نهایی حضور ژن هدف در وکتور، کانستراکت پلاسمیدی مورد نظر توالی‌یابی گردید (شرکت Seq Lab). ارزیابی توالی تعیین ترادف‌شده به‌وسیله سرویس BLAST سایت NCBI انجام گرفت. پلاسمید تأییدشده *pTZ-ply* نامگذاری شد. جهت بررسی ویژگی واکنش، با استفاده از پرایمرهای ژن *ply* بر روی ژنوم باکتری‌های کنترل منفی، PCR انجام گرفت (جدول). همچنین برای تعیین حساسیت، ابتدا غلظت پلاسمید *pTZ-ply* با تعیین جذب نوری توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر(Picodrop) مشخص گردید.

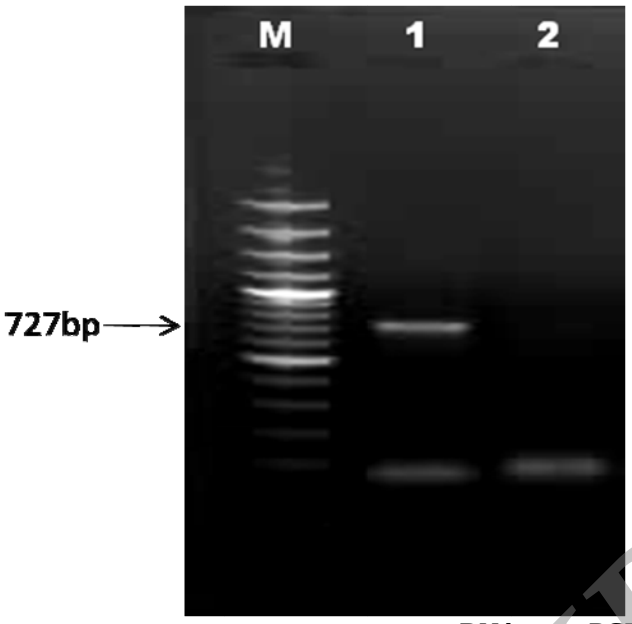
سپس رقت‌های متوالی 10^{-1}-10^{-7} از این پلاسمید تهیه شد. با انجام واکنش PCR بر روی تمامی رقت‌های تهیه‌شده، آخرین رقت از پلاسمید که واکنش آن مثبت بود، مشخص گردید. در نهایت، حداقل تعداد کپی از ژن هدف موجود در این رقت با استفاده از روش Chiang و همکاران مشخص و به‌عنوان حد تشخیص روش تعیین شد (۱۹).

یافته‌ها

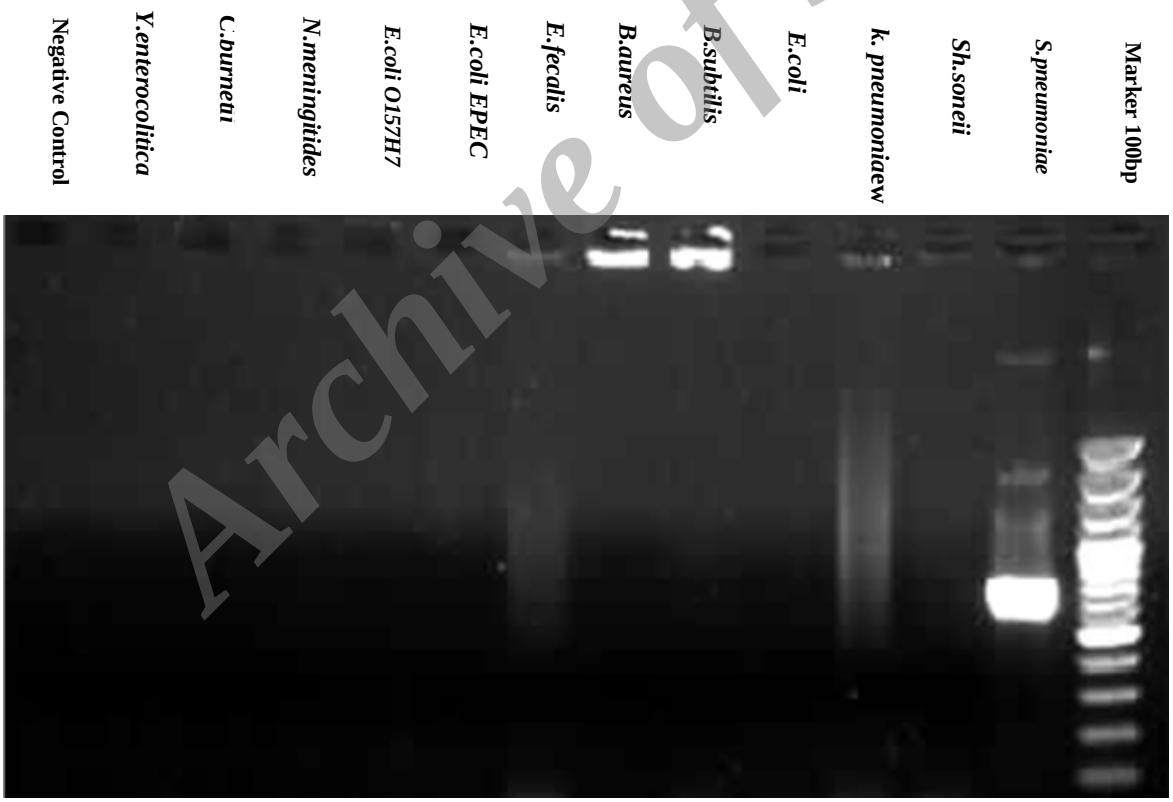
در این بررسی، نتایج الکتروفورز محصول واکنش PCR ژن *ply*، باند قابل‌انتظار 727bp را نشان داد (شکل شماره ۱). نتایج کلنی PCR بر روی کلونی‌های سفید، حضور محصول PCR ژن *ply* را در وکتور pTZ57R/T تأیید نمود. همچنین نتایج توالی‌یابی سکانس ژنی هدف نشان داد سکانس توالی‌یابی‌شده با سکانس ژن‌های *ply* ثبت‌شده در سایت NCBI مطابقت دارد. بنابراین، حضور ژن هدف درون وکتور و ساخت پلاسمید *pTZ-ply* تأیید گردید. نتایج تعیین ویژگی PCR، هیچ‌گونه تکثیری را با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *ply* بر روی ژنوم باکتری‌های کنترل منفی نشان نداد، که تأییدکننده ویژگی کامل واکنش PCR طراحی‌شده بود (شکل شماره ۲).

یافته‌های تعیین حساسیت واکنش نشان داد آخرین غلظت از پلاسمید *pTZ-ply* که باند مشخصی بر روی ژل آگارز ایجاد می‌کند، غلظت 1pg است (شکل شماره ۳). با توجه به این غلظت، کمترین تعداد کپی قابل‌تشخیص از ژن *ply* در یک واکنش ۲۵µl، ۲۵۰ کپی بوده است.

Archive of SID
www.SID.ir



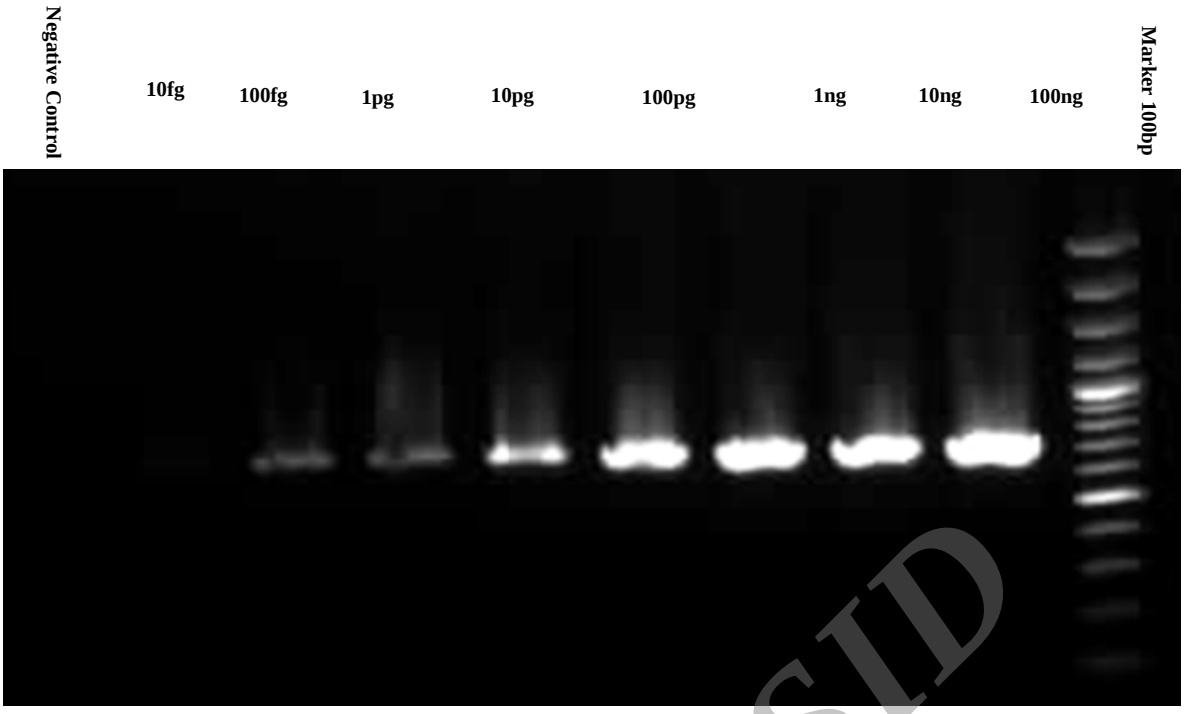
شکل شماره ۱: نتایج واکنش PCR بر روی DNA ژنومیک باکتری *استرپتوکوکوس نیومونیا*؛ این نتیجه نشان می‌دهد پرایمرهای اختصاصی این ژن قادرند قطعه مورد انتظار ۷۲۷ جفت بازی را تکثیر کنند.
***M*: مارکر ۱۰۰ جفت بازی؛ ۱: محصول PCR بر روی ژن *ply* به طول ۷۲۷ جفت باز؛ ۲: کنترل منفی**



شکل شماره۲: واکنش PCR ژن *ply* باکتری *استرپتوکوکوس نیومونیا* و ژنوم باکتری‌های کنترل منفی. باند ۷۲۷ جفت باز فقط در باکتری *استرپتوکوکوس نیومونیا* دیده می‌شود.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل شماره ۳: آخرین حد تشخیص ژن *ply* باکتری *استرپتوکوکوس نیومونیا* با غلظت اولیه ۱۰۰ng، برابر با ۱pg می‌باشد.

بحث

استرپتوکوکوس نیومونیا یک عامل شایع و مهم مرگ و میر در کودکان و افراد سالخورده است (۲،۲۰،۲۱). با وجود انجام معالجات، سرعت مرگ و میر در کشورهای در حال توسعه و حتی کشورهای توسعه‌یافته بالا می‌باشد (۹). موفقیت در مدیریت کنترل منتژیت وابسته به تشخیص سریع باکتری است. پنوموکوک جداشده از مناطق استریل بدن مانند خون و CSF معمولاً حساس به اپتوچین و محلول در بایل اسکولین است (۱). شناسایی باکتری‌های عامل منتژیت بر پایه تشخیص آزمایشگاهی شامل کشت، رنگ‌آمیزی گرم و تست‌های سرولوژیکی است (۲۲). متدهای تشخیص آنتی‌ژن‌های کپسولی به‌وسیله آگلوتیناسیون لاتکس، ایمونوالکتروفورزیس و کوآگلوتیناسیون، همچنین کشت دارای محدودیت‌هایی است (۶). بنابراین، برای تشخیص سریع و دقیق منتژیت ناشی از این باکتری نیاز به روشی است تا در زمان لزوم بتوان از آن تکنیک استفاده نمود. امروزه، از روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در جهت شناسایی این باکتری استفاده می‌شود (۱۱،۲۳). بدین منظور در این مطالعه، PCR به‌عنوان یک تکنیک با حساسیت و ویژگی بالا، جهت تشخیص سریع باکتری *استرپتوکوکوس نیومونیا* راه‌اندازی شد.

از آنجایی‌که هدف این مطالعه تشخیص باکتری *استرپتوکوکوس نیومونیا* با ویژگی بسیار بالا بود، لذا طراحی پرایمر به‌گونه‌ای انجام گرفت که پرایمرهای طراحی‌شده، توانایی اتصال به نقاط حفاظت‌شده تمامی سکانس‌های ثبت‌شده مربوط به ژن *ply* را دارا باشند. جهت طراحی پرایمر براساس این ژن، ۱۹۲ سکانس مربوط به سویه‌های مختلف باکتری *استرپتوکوکوس نیومونیا*، از سایت NCBI استخراج و توسط نرم‌افزار CLC Sequence Viewer نسخه ۶ ردیف‌سازی شد و از روی ترادف مشترک حاصل، پرایمرها طراحی گردید. همچنین ویژگی پرایمرها با استفاده از نرم‌افزار

(Primer Blast Local Alignment Search Tools) Blast سایت NCBI مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج این مطالعه نشان داد آزمون طراحی‌شده فوق با حد تشخیص برابر با ۲۵۰ کپی در یک واکنش ۲۵µl می‌تواند یک روش با حساسیت و اختصاصیت بسیار بالا جهت تشخیص سریع باکتری *استرپتوکوکوس نیومونیا* باشد. مقایسه بررسی میزان حساسیت آزمون طراحی‌شده در این مطالعه و تحقیقات اخیر نشان داد پرایمرهای طراحی‌شده در این پژوهش از حساسیت بسیار بالاتری برای تشخیص ژن *ply* برخوردار است.

Archive of SID
www.SID.ir

نتیجه‌گیری

با توجه به اینکه روش‌های کلاسیک تشخیص این باکتری زمانبر بوده و از طرفی به‌علت درمان آنتی‌بیوتیکی، نتایج منفی کاذب ایجاد می‌شود، لذا کاربرد این روش تشخیصی به‌عنوان یک متد سریع، حساس و دقیق در جهت تشخیص این باکتری قابل‌ارزیابی است. همچنین با توجه به اینکه تکنیک PCR از حساسیت بالایی برخوردار است، در نتیجه حضور هر نوع مهارکننده در واکنش PCR در تفسیر خلل ایجاد کرده و سبب نتایج منفی کاذب می‌شود.

لذا پیشنهاد می‌گردد تا علاوه بر ساخت یک کنترل مثبت خارجی، یک کنترل مثبت داخلی نیز جهت تشخیص این عامل باکتریایی طراحی و ساخته شود تا در تفسیر دقیق‌تر نتایج کمک‌کننده باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله بدین وسیله از تمامی مسئولین دانشگاه علوم پزشکی ارتش جمهوری اسلامی ایران و همکاران مرکز تحقیقات زیست فن‌آوری تسنیم، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نمایند.

References:

1. Kaijalainen T, Saukkoriipi A, Bloigu A, Herva E, Leinonen M. Real-Time Pneumolysin Polymerase Chain Reaction with Melting Curve Analysis Differentiates Pneumococcus from other [alpha]-hemolytic Streptococci. Diagn Microbiol Infect Dis 2005;53(4):293-9.

2. Rintamaki S, Saukkoriipi A, Salo P, Takala A, Leinonen M. Detection of Streptococcus pneumoniae DNA by Using Polymerase Chain Reaction and Microwell Hybridization with Europium-labelled Probes. J Microbiol Methods 2002;50(3):313-8.

3. Werno AM, Murdoch DR. Medical Microbiology: Laboratory Diagnosis of Invasive Pneumococcal Disease. Clin Infect Dis 2008 Mar 15;46(6):926-32.

4. Carroll KC. Laboratory Diagnosis of Lower Respiratory Tract Infections: Controversy and Conundrums. J Clin Microbiol 2002;40(9):3115.

5. Selva L, Esteva C, Gené A, de Sevilla MF, Hernandez-Bou S, Muñoz-Almagro C. Direct Detection of Streptococcus pneumoniae in Positive Blood Cultures by Real-time Polymerase Chain Reaction. Diagn Microbiol Infect Dis 2010;66(2):204-6.

6. Wei CY, Kuo TBJ, Yau HY, Yeh SY, Tsai YC, Lin DY, et al. PCR Assay for the Diagnosis of Pneumococcal meningitis. Acta Neurol Taiwan 2003;12(1):38-42.

7. Van Haeften R, Palladino S, Kay I, Keil T, Heath C, Waterer GW. A Quantitative Light Cycler PCR to Detect Streptococcus pneumoniae in Blood and CSF. Diagn Microbiol Infect Dis 2003;47(2):407-14.

8. Michelow IC, Lozano J, Olsen K, Goto C, Rollins NK, Ghaffar F, et al. Diagnosis of Streptococcus pneumoniae Lower Respiratory Infection in Hospitalized Children by Culture, Polymerase Chain Reaction, Serological Testing and Urinary Antigen Detection. Clin Infect Dis 2002;34(1).

9. Santos L, Simões J, Severo M, Vazquez J, Lecour H. Bacterial Meningitis in an Urban Area: Etiologic Study and Prognostic Factors. Infection 2007;35(6):406-13.

10. Matos JA, Madureira DJ, Rebelo MC, Hofer CB, Barroso DE. Diagnosis of Streptococcus pneumoniae Meningitis by Polymerase Chain Reaction Amplification of the Gene for Pneumolysin. Mem Inst Oswaldo Cruz 2006;101(5):559-63.

11. Radstrom P, Backman A, Qian N, Kragsbjerg P, Pahlson C, Olcen P. Detection of Bacterial DNA in Cerebrospinal Fluid by an Assay for Simultaneous Detection of Neisseria meningitidis, Haemophilus Influenzae, and Streptococci Using a Seminested PCR Strategy. J Clin Microbiol 1994;32(11):2738-44.

Archive of SID

www.SID.ir

12. Morrison KE, Lake D, Crook J, Carlone GM, Ades E, Facklam R, et al. Confirmation of psaA in all 90 Serotypes of Streptococcus pneumoniae by PCR and Potential of This Assay for Identification and Diagnosis. J Clin Microbiol 2000;38(1):434-7.

13. Jado I, Fenoll A, Casal J, Perez A. Identification of the psaA Gene, Coding for Pneumococcal Surface Adhesin A, in Viridans Group Streptococci other than Streptococcus pneumoniae. Clin Diagn Lab Immunol 2001;8(5):895-8.

14. Saukkoriipi A, Leskela K, Herva E, Leinonen M. Streptococcus pneumoniae in Nasopharyngeal Secretions of Healthy Children: Comparison of Real-time PCR and Culture from STGG-transport Medium. Mol Cell Probes 2004;18(3): 147-53.

15. Salo P, Örtqvist Å, Leinonen M. Diagnosis of Bacteremic Pneumococcal pneumonia by Amplification of Pneumolysin Gene Fragment in Serum. J Infect Dis 1995;171(2):479-82.

16. Jedrzejas MJ. Pneumococcal Virulence Factors: Structure and Function. Microbiol Mol Biol Rev 2001;65(2):187-207.

17. Alonsod Evelasco E vAFM. Streptococcus pneumoniae: Virulance Factors, Pathogenesis and Vaccines. Microbiol Rev 1995;59(4):591-603.

18. Walker JA, Allen RL, Falmagne P, Johnson MK, Boulnois GJ. Molecular Cloning, Characterization, and Complete Nucleotide Sequence of the Gene for Pneumolysin, the Sulfhydryl-activated Toxin of Streptococcus pneumoniae. Infect Immun 1987;55(5):1184-89.

19. Chiang YC, Yang CY, Li C, Ho YC, Lin CK, Tsen HY. Identification of Bacillus spp, Escherichia coli, Salmonella spp, Staphylococcus spp and Vibrio spp. with 16S ribosomal DNA-based Oligonucleotide Array Hybridization. Int J Food Microbiol 2006;107(2):131-7.

20. Weber DJ, Rutala WA. Streptococcus pneumoniae Infections: Microbiology, Epidemiology, Treatment, and Prevention. Med Scape Educ 2003.

21. Sourav S, Sharma S, Kanungo R, Jayachandran S, Prashanth K. Detection of Pneumolysin and Autolysin Genes among Antibiotic Resistant Streptococcus pneumoniae in Invasive Infections. Indian J Med Microbiol 2010;28(1):34.

22. Ragunathan L, Ramsay M, Borrow R, Guiver M, Gray S, Kaczmarski E. Clinical Features, Laboratory Findings and Management of Meningococcal Meningitis in England and Wales: Report of a 1997 Survey. J Infect 2000;40(1):74-9.

23. Hassan-King M, Baldeh I, Secka O, Falade A, Greenwood B. Detection of Streptococcus pneumoniae DNA in Blood Cultures by PCR. J Clin Microbiol 1994;32(7):1721-24.

Archive of SID

www.SID.ir