Archive of SID

TUMJ مجله دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، آبان ۱۳۹۲، دوره ۷۱، شماره ۸، صفحه‌های ۴۹۳ تا ۵۰۱ مقاله اصیل

طراحی پرایمرهای اختصاصی برای نشان دادن ژن‌های exoA، oprL و algD برای تشخیص سریع سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* در نمونه‌های بالینی

محمد نجفی مصلح[1*]
صدیقه رشنو طایی[2]
احسان الله غزنوی راد[2]
حمید ابطحی،[2] غلامرضا طالعی[3]

۱- گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، ایران.
۲- گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، ایران.
۳- گروه میکروبیولوژی دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم‌آباد، ایران.

* نویسنده مسئول: همدان، خیابان مهدیه، دانشکده پزشکی، گروه میکروبیولوژی
تلفن: ۸۳۸۰۴۶۲ -۰۸۱۱
E-mail: n_mosleh@yahoo.com

چکیده

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۰۱/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۴/۱۶

زمینه و هدف: تشخیص سریع *سودوموناس آئروژینوزا* در سیستیک فیبروزیس، سوختگی‌ها و بیماران با نقص ایمنی از اهمیت بسیاری برخوردار است. در این بررسی فراوانی وجود ژن‌های exoA، oprL و algD با استفاده از پرایمرهای منتشر شده در مقالات و نیز پرایمرهای اختصاصی طراحی شده در این تحقیق با روش PCR مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی: نمونه‌های بالینی برای جداسازی *سودوموناس آئروژینوزا* در محیط‌های باکتریولوژیک کشت داده شد. با روش آنالیز بیوانفورماتیکی برای نواحی بسیار ثابت ژن‌های فوق پرایمرهای اختصاصی طراحی شد. با استفاده از پرایمرهای طراحی شده و پرایمرهای منتشر شده در مقالات، نمونه‌ها به‌طور مستقیم با PCR مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: تعداد ۷۰ سویه *سودوموناس آئروژینوزا* در کشت نمونه‌ها جدا شد. با به‌کارگیری پرایمرهای طراحی شده نتایج مثبت PCR به‌ترتیب برای ژن‌های exoA، oprL و algD در ۶۸، ۷۰ و ۶۹ نمونه‌ها به‌دست آمد که حساسیت به‌ترتیب ۹۷/۲٪، ۱۰۰٪ و ۹۸/۶٪ به دست آمد. در صورتی که با پرایمرهای منتشر شده نتایج مثبت به‌ترتیب برای ژن‌های فوق در ۵۷، ۴۹ و ۲۸ نمونه به‌دست آمد که حساسیت به‌ترتیب ۸۱/۵٪، ۷۰٪ و ۴۰٪ محاسبه شد.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان داد که با به‌کارگیری پرایمرهای اختصاصی مناسب در تکنیک PCR معمولی می‌توان با حساسیت و ویژگی بسیار بالا کلونیزاسیون *سودوموناس آئروژینوزا* در بیماران حساس مانند سیستیک فیبروزیس خیلی زودتر از مثبت شدن کشت نشان داد.

کلمات کلیدی: *سودوموناس آئروژینوزا*، ژن، سیستیک فیبروزیس، واکنش زنجیره پلی‌مراز.

مقدمه

سودوموناس آئروژینوزا (Pseudomonas Aeruginosa, PA) یک پاتوژن فرصت طلب است که بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس (Cystic Fibrosis, CF)،[1] بیماران مبتلا به زخم‌های سوختگی[2] و یا تروماهای چشمی، افراد دچار ضعف یا نقص در سیستم ایمنی، هم‌چنین دریافت‌کنندگان پیوند عضو افراد مستعد به عفونت‌های مهلک ناشی از این ارگانیسم می‌باشند.[3] این ارگانیسم به‌ویژه در محیط‌های بیمارستانی پخش بسیار گسترده داشته و به عنوان یکی از عوامل بسیار مهم عفونت‌های بیمارستانی شمرده می‌شود.[4] گذشته از مقاومت‌های دارویی ذاتی، وجود مقاومت‌های اکتسابی آنتی‌بیوتیکی هم‌زمان به چندین دارو نیز (Multiple drugs resistance) کنترل عفونت‌های ناشی از این ارگانیسم را با مشکلات جدی مواجهه ساخته است. اغلب آزمایشگاه‌ها برای شناسایی این باکتری از کشت و روش‌های بیوشیمیایی استفاده می‌نمایند که حداقل سه روز طول می‌کشد.[5] هم‌چنین بعضی از سویه‌ها اگزوتروف می‌باشند و برای جداسازی آن‌ها محیط‌های کشت انتخابی ویژه‌ای لازم است و این امر نیز منجر به جواب کشت منفی کاذب می‌گردد که برای بیماران حساس به عفونت با این پاتوژن مثل مبتلایان به CF مرگ‌آور می‌باشد.[6] در بعضی از کشورها از روش سرولوژیک استفاده می‌کنند

www.SID.ir

Archive of SID

که روش قابل اطمینانی نیست.[۷و۸] به‌تازگی از واکنش زنجیره پلی‌مراز PCR[۹] به‌عنوان یک روش مولکولی برای نشان دادن باکتری در نمونه‌های بیماران استفاده می‌شود که از نظر حساسیت، ویژگی و هزینه نیاز به بهینه‌سازی دارد.[۱۰] لذا هدف این تحقیق این است که با طراحی دقیق پرایمرهای اختصاصی حساسیت و ویژگی PCR را با به‌کارگیری دو نوع پرایمرهای اختصاصی منتشر شده در مقالات و نیز پرایمرهای طراحی شده برای نشان دادن فراوانی وجود ژن‌های exoA (مسئول تولید اگزوتوکسن A که در ۹۵٪ از سویه‌ها وجود دارد)، oprL (مسئول سنتز یک پروتیین غشای خارجی) و ژن algD (مسئول سنتز آلژینات) مورد بررسی قرار بدهد.[۱۱] در این تحقیق با روش آنالیز بیوانفورماتیکی برای نواحی بسیار ثابت و حفاظت شده ژن‌های فوق پرایمرهای اختصاصی طراحی شد. برای تعیین میزان حساسیت تست، علاوه بر استفاده از کنترل‌های مثبت و منفی از یک جفت پرایمر مربوط به یک ژن حفاظت شده rRNA که در تمام سویه‌ها بیان می‌شود نیز استفاده شد.

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی- مقطعی، تعداد ۱۵۰ نمونه بالینی در یک دوره یک‌ساله (از فروردین تا اسفند ۱۳۹۱) از بیماران بستری در بخش‌های مختلف (ICU، ICU سوختگی، جراحی و غیره) بیمارستان شهدای عشایر خرم‌آباد ایران جمع‌آوری شد. نمونه‌های مورد بررسی عبارتند از سواب زخم (۷۰ نمونه)، خلط (۱۰ نمونه)، خون (۵ نمونه)، ادرار (۵ نمونه)، محتویات آبسه (۱۲ نمونه)، بیوپسی (۳ نمونه)، CSF (۵ نمونه)، ترشحات ریه (۲۴ نمونه) و مایع سینوویال (۱۶ نمونه).

نمونه‌های بیماران در دو میکروتیوپاستریل برای انجام کشت و PCR جمع‌آوری گردید. برای انجام تست PCR به میکروتیوب‌های حاوی نمونه‌های مستقیم بیمار به اندازه ۱۰۰۰ میکرولیتر Phosphate Buffer Salt (PBS Buffer) اضافه شد و در دمای C° ۷۰- ذخیره گردید. نمونه‌ها در آزمایشگاه باکتریولوژی با روش‌های متداول و با استفاده از محیط کشت نوترین آگار (Nutrient Agar)، مک کانکی آگار (MacCanky Agar) و سلکتیو آگار (Selective Agar, BioMerieux Ltd., UK) کشت داده شد. برای تشخیص قطعی و جداسازی نهایی سویه‌های سودوموناس از واکنش‌های شیمیایی و تست‌های افتراقی از جمله سیمون سیترات، Triple Sugar Iron Agar (TSIA)، سولفیدهیدروژن ایندول موتیلیتی (Sulfide Indole Motility, SIM)، اکسیداسیون فرمنتاسیون (Oxidative-Fermentative, OF) استفاده شد. چون نتایج روش جداسازی ارگانیسم به‌عنوان استاندارد طلایی برای تعیین حساسیت و ویژگی نتیجه PCR استفاده می‌شود، لذا از محیط‌های انتخابی برای رشد سویه‌های اگزوتروف نیز استفاده شد تا هیچ مورد کشت مثبت از دست نرود.

طراحی پرایمرهای اختصاصی: در این تحقیق، برای تشخیص PA ژن‌های oprL، exoA و algD که برروی کروموزوم باکتری قرار دارند به‌عنوان هدف جهت انجام PCR مورد استفاده قرار گرفتند. دو سری پرایمر اختصاصی برای ژن‌های algD, oprL, exoA استفاده گردید، یکی پرایمرهای منتشر شده در مقالات[۱۲] و سری دیگر پرایمرهای طراحی شده در این تحقیق به روش بیوانفورماتیک (جدول ۱). برای تعیین میزان حساسیت تست، علاوه بر استفاده از کنترل‌های مثبت و منفی از یک جفت پرایمر مربوط به یک ژن حفاظت شده مربوط به rRNA که در تمام سویه‌ها بیان می‌شود نیز استفاده شد. در انجام هم‌زمان واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با به‌کارگیری پرایمرهای یاد شده علاوه بر کنترل‌های مثبت و منفی از یک جفت پرایمر مربوط به یک ژن حفاظت شده rRNA که در تمام سویه‌ها بیان می‌شود نیز استفاده شد. پرایمرهای منتشر شده در مقالات، برای سه ژن یاد شده به شرح زیر بود (جدول ۱).

طراحی پرایمرهای اختصاصی جدید: در این تحقیق با روش آنالیز بیوانفورماتیکی برای نواحی بسیار ثابت و حفاظت شده ژن‌های فوق پرایمرهای اختصاصی طراحی شد، توالی نوکلئوتیدی ژن‌های مورد بررسی از سایت NCBI گرفته شد و به کمک روش Alignment نواحی بسیار ثابت شناسایی گردید و در مرحله‌ی بعد به کمک نرم‌افزار AlleleID طراحی پرایمر انجام گرفت.

تخلیص DNA باکتری: برای جلوگیری از آلودگی نمونه‌ها با DNA موجود در محیط و به‌وجود آمدن نتایج مثبت کاذب، مراحل استخراج و تخلیص DNA از نمونه‌ها در زیر هود بیولوژیکی کلاس II (Microflow England) انجام شد. در این بررسی برای استخراج DNA باکتری از نمونه‌های مستقیم بیماران از کیت Bacteria DNA Mini Kit (Invitek Stratec Molecular GmbH, Germany) استفاده

www.SID.ir

Archive of SID

شد. DNA نمونه‌ها پس از استخراج و تخلیص در دمای C° ۸۰- برای انجام PCR ذخیره گردید. برای تهیه DNA کنترل مثبت از سویه‌ی استاندارد *سودوموناس آئروژینوزای* ATCC 27853 استفاده شد. به منظور اطمینان از کیفیت روش فوق از هر یک از DNA های استخراج شده به اندازه‌ی شش میکرولیتر بر روی ژل آگاروز یک درصد الکتروفورز شد و به کمک دستگاه UV با طول موج ۲۸۰ مقدار DNA به‌طور تقریبی تخمین زده شد.

واکنش PCR برای ژن exoA: به‌منظور کاهش آلودگی و جلوگیری از نتایج کاذب تمام مراحل در اتاق PCR انجام گرفت.

مراحل PCR با ۲۵ میکرولیتر مخلوط حاوی ۱۲/۵ میکرولیتر PCR Master Mix (Cinna Gen Inc., Tehran, Iran) که حاوی mgCl2,d NTP, Taq polymerase, PCR Buffer می‌باشد و ۰/۱ از پرایمر سنس exoA و ۰/۱ پرایمر آنتی‌سنس، ۱/۵ میکرولیتر DNA استخراج شده و ۰/۵ میکرولیتر MgCl2 (۵۰ میلی‌مولار) و در نهایت ۱۰/۲ میکرولیتر آب دیونیزه انجام شد. این مخلوط در دستگاه ترمال سایکلر (Thermal Cycler, Mastercycler, Eppendorf AG, Hamburg, Germany) قرار گرفت وبا برنامه واسرشتگی اولیه (Denaturation) C° ۹۵ به مدت دو دقیقه و در ادامه ۳۵ سیکل با برنامه واسرشتگی اولیه در C° ۹۵ به مدت یک دقیقه، اتصال پرایمرها به هدف (Annealing) در دمای C° ۵۳ به مدت ۳۰ ثانیه و در ادامه طویل شدن در دمای C° ۷۲ به مدت یک دقیقه و در نهایت مرحله ادامه نهایی (Extension Fine) در دمای C° ۷۲ درجه به مدت پنج دقیقه انجام گرفت.

واکنش PCR برای ژن oprL: PCR با ۲۵ میکرولیتر مخلوط حاوی ۱۲/۵ میکرولیتر PCR Master Mix و ۰/۱ از پرایمر سنس oprL و ۰/۱ پرایمر آنتی‌سنس، ۱/۵ میکرولیتر DNA استخراج شده و ۰/۵ میکرولیتر MgCl2 (۵۰ میلی‌مولار) و در نهایت با اضافه کردن ۱۰/۲ میکرولیتر آب دیونیزه انجام شد. این مخلوط در دستگاه ترمال سایکلر (Thermal Cycler) قرار گرفت و با Denaturation، C° ۹۵ به مدت دو دقیقه و در ادامه ۳۵ سیکل با برنامه واسرشتگی اولیه در C° ۹۵ به مدت یک دقیقه، Annealing در دمای C° ۵۶ به مدت ۳۰ ثانیه و طویل شدن (Extension) در دمای C° ۷۲ به مدت یک دقیقه و در نهایت مرحله‌ی طویل‌سازی نهایی در دمای C° ۷۲ به مدت هفت دقیقه انجام گرفت. در نهایت برای بررسی محصولات PCR از هر کدام از محصولات PCR به میزان شش میکرولیتر بر روی ژل آگارز یک درصد

واکنش PCR برای ژن algD: PCR با ۲۵ میکرولیتر مخلوط حاوی ۱۲/۵ میکرولیتر مستر میکس PCR Master Mix (Cinna Gen Inc., Tehran, Iran) و ۰/۱ از پرایمر سنس algD و ۰/۱ پرایمر آنتی‌سنس، ۱/۵ میکرولیتر DNA استخراج شده و در نهایت با اضافه کردن ۱۰/۸ میکرولیتر آب دیونیزه انجام شد. این مخلوط در دستگاه ترمال سایکلر قرار گرفت و با برنامه Denaturation، C° ۹۵ به مدت دو دقیقه و در ادامه ۳۵ سیکل با برنامه واسرشتگی اولیه در C° ۹۵ به مدت یک دقیقه، Annealing در دمای C° ۵۵ به مدت ۳۰ ثانیه و Extension در دمای C° ۷۲ به مدت یک دقیقه و در نهایت مرحله‌ی طویل‌سازی نهایی در دمای C° ۷۲ به مدت پنج دقیقه انجام گرفت.

انجام واکنش PCR به کمک ژن‌های exoA, oprL, algD و پرایمرهای منتشر شده در مقالات

واکنش PCR برای exoA: PCR با ۲۵ میکرولیتر مخلوط حاوی ۱۲/۵ میکرولیتر PCR Master Mix ۰/۱ از هر کدام از پرایمرهای exoA و ۱/۵ میکرولیتر DNA و ۱۰/۸ میکرولیتر آب دیونیزه انجام شد. این مخلوط در دستگاه Thermal Cycler قرار گرفت وبا برنامه Denaturation، C° ۹۶ به مدت پنج دقیقه و در ادامه ۴۰ سیکل با برنامه واسرشتگی اولیه در C° ۹۶ به مدت یک دقیقه، Annealing در دمای C° ۵۵ به مدت یک دقیقه و Extension در دمای C° ۷۲ به مدت یک دقیقه و در نهایت مرحله‌ی طویل‌سازی نهایی در دمای C° ۷۲ به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت.

واکنش PCR برای OprL: با برنامه Denaturation، C° ۹۵ به مدت چهار دقیقه و در ادامه ۳۰ سیکل با برنامه واسرشتگی اولیه در C° ۹۴ به مدت ۴۰ ثانیه، Annealing در دمای C° ۵۷ به مدت ۴۰ ثانیه و Extension در دمای C° ۷۲ به مدت ۵۰ ثانیه و در نهایت مرحله‌ی طویل‌سازی نهایی در دمای C° ۷۲ درجه به مدت ۵۰ ثانیه انجام گرفت.

واکنش PCR برای algD: با برنامه Denaturation، C° ۹۴ به مدت پنج دقیقه و در ادامه ۳۰ سیکل با برنامه واسرشتگی اولیه C° ۹۴ به مدت یک دقیقه، Annealing در دمای C° ۶۰ به مدت یک دقیقه و Extension در دمای C° ۷۲ به مدت یک دقیقه و در نهایت مرحله‌ی طویل‌سازی نهایی در دمای C° ۷۲ به مدت هفت دقیقه انجام گرفت.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱: توالی نوکلئوتیدی، دمای آنیلینگ و منابع دستیابی به پرایمرهای منتشر شده در مقالات مورد استفاده در این تحقیق

هدف	موقعیت ژن	توالی پرایمرها	دمای Annealing	سایز امپلیکون	رفرانس
سودوموناس آئروژینوزا	^{16}S rRNA	F:5-AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA-3 R:5-ACTTAACCCAACATCTCACGACAC-3	۵۵ °C	۳۱۲bp	۶،۱۱،۱۲،۱۴،۱۸
سودوموناس آئروژینوزا	exoA	F:5-GACAACGCCCTCAGCATCACCAGC-3 R:5-CGCTGGCCCATTCGCTCCAGCGCT-3	۵۸ °C	۳۹۶bp	۶،۱۱،۱۲،۱۴،۱۸
سودوموناس آئروژینوزا	oprL	F:ATGGAAATGCTGAAATTCGGC-3 R:CTTCTTCAGCTCGACGCGACG-3	۵۵ °C	۵۰۴bp	۶،۱۱،۱۲،۱۴،۱۸
سودوموناس آئروژینوزا	algD	F:5-TTCCCTCGCAGAGAAAACATC-3 R:5-CCTGGTTGATCAGGTCGATCT-3	۶۰ °C	۵۲۰bp	۶،۱۱،۱۲،۱۴،۱۸

جدول ۲: سکانس و موقعییت پرایمرهای طراحی شده number: NC_006273 and NC_006623, respectively

ژن‌های هدف *سودوموناس آئروژینوزا*	توالی پرایمرهای	اندازه پرایمر	سایز امپلیکون
EoxA	Sense ACATCAAGGTGTTCATCC Anti-sense GACGAAGAAGGTGGCATC	۱۸ ۱۸	۱۲۵
oprL	Sense TGCGATCACCACCTTCTACTTC Anti-sense CGCTGACCGCTGCCTTTC	۲۲ ۱۸	۱۰۵
algD	Sense ACGAAGTGGTGGCGAGTTC Anti-sense TGGTGTGCGGCATGAAGC	۲۲ ۱۸	۱۰۵

الکتروفورز گردید و به کمک Safe stain (Cinna Gen Inc., Tehran, Iran رنگ‌آمیزی انجام شد. در ژل آگاروز قطعات DNA برحسب اندازه از یک‌دیگر جدا می‌شوند و درون ژل حرکت می‌کنند. درصد ژل مورد استفاده بر مبنای اندازه DNA در نظر گرفته می‌شود. در این بررسی برای الکتروفورز محصولات PCR مربوط به ژن‌های مورد نظر ژل آگاروز ۱٪ تهیه گردید. بدین منظور پس از حل شدن کامل پودر به‌وسیله حرارت وقتی که دمای آن به حدود ۵۰ °C رسید یک پیکومول در لیتر Syber safe به آن اضافه شد. در نهایت محلول را در قالب‌های مناسب که قبل‌تر شانه‌ای در آن قرار داده شده بود، ریخته و بعد از بسته‌شدن کامل ژل، شانه به آرامی از آن خارج شد. درون تانک الکتروفورز با همان بافر TBE با غلظت 0.5 X و یا 1X (بافری که برای تهیه ژل استفاده شد) پر شد و ژل بسته‌شده را در درون تانک الکتروفورز قرار داده شد. از چاهک‌های کوچکی که درون ژل ایجاد شده، برای ریختن محصولات PCR استفاده شد. در اولین چاهک سایز مارکر و در چاهک‌های بعدی پنج ماکرولیتر از محلول PCR را که با یک ماکرولیتر بارگذارنده بافر مخلوط شده، ریخته شد.

جهت حرکت DNA همواره از قطب منفی به قطب مثبت است. با در نظر گرفتن این مطلب، دستگاه الکتروفورز را روشن کرده و ولتاژ آن بر روی ۸۰ تنظیم شد.

بارگذارنده بافر استفاده شده که آبی‌رنگ بود، در هنگام حرکت نمونه‌ها دو رنگ سبک و سنگین از آن جدا شد که ملاک حرکت نمونه‌ها تا سه‌چهارم ژل، رنگ سبک آن بود. بعد از پایان حرکت نمونه‌ها، دستگاه الکتروفورز را خاموش کرده و ژل از تانک به‌آرامی خارج شد و با استفاده از دستگاه Gel Documentation System (Bio-Tech Co., Ltd., Shanghai, China) و نور UV از ژل مربوطه مشاهده شد و یا عکس تهیه شد.

تعیین حساسیت واکنش PCR: برای تعیین حساسیت واکنش PCR از DNA استخراج شده اشریشیا کلی به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد و برای کنترل مثبت علاوه بر استفاده از DNA استخراج شده سویه استاندارد *سودوموناس آئروژینوزا* در واکنش PCR از یک جفت پرایمر اختصاصی ژن یونیورسال بسیار ثابت rRNA نیز استفاده شد.

www.SID.ir

Archive of SID

یافته‌ها

در این مطالعه در نتیجه کشت ۱۵۰ نمونه بالینی در ۷۰ نمونه *سودوموناس آئروژینوزا* جداسازی شد. حساسیت و ویژگی نتایج روش PCR با استفاده از پرایمرهای طراحی شده در این تحقیق و نیز پرایمرهای منتشر شده در مقالات با نتیجه کشت به‌عنوان استاندارد طلایی مقایسه شد. نتایج مثبت کشت و جواب مثبت و یا منفی PCR آورده شد (جدول‌های ۳ و ۴).

با به‌کارگیری پرایمرهای طراحی شده در این تحقیق در نمونه‌های با کشت منفی نتایج PCR نیز منفی شد. نتایج کامل کشت و PCR با استفاده از پرایمرهای منتشر شده در مقالات و پرایمرهای اختصاصی طراحی شده در این مطالعه و مقایسه آن‌ها آورده شده است (جدول ۵). حساسیت PCR با استفاده از پرایمرهای طراحی شده برای ژن exoA ۹۷/۲٪، برای ژن oprL ۱۰۰٪ و برای ژن algD ۹۸/۶٪ بود. حساسیت PCR با استفاده پرایمرهای منتشر شده در مقالات برای ژن exoA ۸۱/۵٪، برای ژن oprL ۷۰٪ و برای ژن algD ۴۰٪ شد. با توجه به لحاظ کردن سویه‌های کنترل منفی و مثبت و به‌کارگیری پرایمرهای یونیورسال حفاظت شد rRNA ویژگی تست‌های PCR در همه موارد ۱۰۰٪ بود.

بحث

سودوموناس آئروژینوزا یک پاتوژن فرصت طلب است که در دهه‌های اخیر به‌عنوان یکی از رایج‌ترین عوامل عفونت‌های بیمارستانی حداقل ۳۰٪ از این عفونت‌ها را به خود اختصاص داده است که علت عمده آن علاوه بر وجود فاکتورهای کلونیزاسیون مثل پیلی و آلژینات، به بروز پدیده مقاومت به چندین دارو (Multi drugs resistance) مربوط می‌باشد.[۴] این وضعیت کنترل ارگانیسم در بیمارستان‌ها را بسیار مشکل و تقریبا غیرممکن می‌سازد و به تبع آن کلونیزه شدن باکتری در بیماران مبتلا به سوختگی‌های درجه ۳ و افراد با نقص در سیستم ایمنی و یا ایمنی سرکوب و تضعیف شده منجر به عفونت‌های مهلک به‌خصوص سپتی‌سمی می‌گردد.[۵] کلونیزه شدن ارگانیسم در بیماران CF وضعیت بسیار ویژه‌ای دارد. *سودوموناس آئروژینوزا* شایع‌ترین عامل مهم عفونت در افراد CF می‌باشد و تا دوره بلوغ بیش‌تر از ۸۰٪ این بیماران با این پاتوژن آلوده می‌شوند و کودکان مبتلا به CF و آلوده شده با PA در مقایسه با افراد غیرآلوده ده سال کم‌تر عمر می‌کنند.[۱۳]

در اغلب آزمایشگاه‌ها با کشت و جداسازی اقدام به شناسایی این باکتری می‌شود، ولی کشت در بررسی کلونیزاسیون اولیه در

جدول ۳: نتایج PCR با استفاده از پرایمرهای طراحی شده در نمونه‌های مستقیم مختلف با نتیجه کشت مثبت.

نوع نمونه	تعداد	نتایج کشت	نتایج PCR (exoA)	نتایج PCR (oplL)	نتایج PCR (algD)	نتایج PCR برای 16SrRNA (۳۱۲bp)
سواپ زخم	۲۹	+	+	+	+	+
خلط	۱	+	-	+	-	+
خلط	۷	+	+	+	+	+
مایع مغزی نخاعی	۳	+	+	+	+	+
آبسه	۱۰	+	+	+	+	+
بیوپسی	۱	+	+	+	+	+
ترشحات ریه	۱	+	-	+	+	+
مایع سینوویال	۱	+	+	+	+	+
ترشحات ریه	۱۲	+	+	+	+	+

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ٤: نتایج PCR با استفاده از پرایمرهای منتشرشده در مقالات در نمونه‌های مستقیم مختلف، با نتیجه کشت مثبت

نوع نمونه	تعداد	نتایج کشت	نتایج PCR (exoA) (۳۹۶bp)	نتایج PCR (oplL) (۵۰۴bp)	نتایج PCR (algD) (۵۲۰bp)	نتایج PCR برای 16SrRNA (۳۱۲bp)
سواپ زخم	۱۵	+	+	_	+	+
سواپ زخم	۱۸	+	+	+	_	+
خلط	۵	+	+	+	_	+
خلط	۳	+	_	+	_	+
CSF	۳	+	+	+	+	+
CSF	۳	+	+	+	+	+
بیوپسی	۱	+	+	_	_	+
ترشحات ریه	۵	+	+	_	_	+
ترشحات ریه	۱۰	+	_	+	+	+
آبسه	۱۰	+	+	+	_	+

جدول ۵: نتایج کامل کشت و PCR با استفاده از پرایمرهای منتشرشده در مقالات و پرایمرهای اختصاصی طراحی شده در این مطالعه و مقایسه آن‌ها

نتایج	کشت	16SrRNA	پرایمر طراحی شده (exoA)	پرایمر طراحی شده (oprL)	پرایمر طراحی شده (algD)	پرایمر منتشره در مقالات (exoA)	پرایمر منتشره در مقالات (oprL)	پرایمر منتشره در مقالات (algD)
تعداد نمونه‌های مثبت	۷۰	۷۰	۶۸	۷۰	۶۹	۵۷	۴۹	۲۸

بیماران سیستیک فیبروزیس منفی است[۱۲] و در نشان دادن سریع باکتری در بیماران بستری در ICU و سوختگی‌های درجه ۳ که وارد فاز باکتریمی شده‌اند به‌علت طولانی‌شدن زمان‌شناسایی باکتری جواب‌گو نمی‌باشد.[۶] علاوه بر زمان بر بودن کشت و تست‌های بیوشیمیایی می‌توان در ارتباط با جداسازی به مشکلات دیگر نیز اشاره کرد. ازجمله وجود سویه‌های اگزوتروف که برای رشد به طراحی محیط‌های کشت انتخابی خاص نیاز دارند و جواب کشت منفی کاذب برای بیماران حساس به عفونت با این پاتوژن مثل مبتلایان به CF مرگ آور می‌باشد.[۱۴] مشکل دیگر این است که در اغلب زخم‌های بیماران سوختگی ممکن است که چند باکتری حضور داشته باشد که کشت مجدد برای جداسازی سودوموناس حدوداً پنج تا شش روز به‌طول می‌انجامد در چنین شرایطی تنها با کمک یک روش سریع و دقیق می‌توان بر این مشکل غلبه کرد.[۶] در برخی کشورهای اروپایی برای شناسایی این باکتری در بیماران CF از تکنیک‌های نشان دادن آنتی‌بادی[۱۵] و نیز روش‌های سرولوژیک مثل ELISA استفاده می‌شود که روشی پرهزینه بوده و به‌علت وابسته بودن به کیت در ایران موارد استفاده‌ی کم‌تری دارد، وجود نتایج مثبت کاذب به دلیل واکنش‌های متقاطع با سایر باکتری‌ها از جمله خانواده انتروباکتریاسه از دیگر معایب آن می‌باشد.[۱۶]

استفاده از روش PCR از دو نظر نسبت به کشت مزیت دارد: نخست این که در نشان دادن ابتدای کلونیزه شدن ارگانیسم PCR بسیار کارآمدتر از کشت می‌باشد.[۱۷] بررسی مطالعات تاییدی متعددی در ده سال اخیر نشان داده است که در اکثر موارد PCR قادر بوده تا در ابتدای کلونیزاسیون باکتری نشان بدهد، در صورتی‌که در این بیماران در ابتدای کلونیزاسیون جواب کشت منفی بوده است. در اکثر این مواردها چهار تا ۱۶ ماه بعد از کلونیزاسیون، کشت مثبت گزارش

www.SID.ir

Archive of SID

شده است. در نتیجه مشخص است کـه روش PCR قـادر اسـت کـه کلونیزاسیون اولیه باکتری را خیلـی زودتـر از کـشت نـشان بدهـد و آگاهی یافتن از کلونیزاسیون ارگانیسم در بیماران فوق بـرای اقـدامات پیشگیری اهمیت حیاتی دارد.[۱۸] دوم: با توجه به این که بیماران مبـتلا به CF در سرتاسر طول عمرشان با یـک کلـون PA آلـوده مـی‌شـوند. بررسـی مـسئله انتقـال کلنـی در بـین بیمـاران CF و تعیـین هویـت کلنی‌های منتقل شده به‌وسیله کشت امکان‌پذیر نبوده و تنهـا بـا PCR امکان دارد.[۱۹و۲۰]

در این بررسی از نمونه‌های بالینی مثـل ترشـحات ریـه یـا خلـط بیماران CF یا سواب از زخم‌های شدید سوختگی‌ها، مـستقیما DNA استخراج شد. سپس با به‌کارگیری دو سـری پرایمـرهـای اختـصاصی طراحی شده در این مطالعـه و منتـشر شـده در مقـالات حـساسیت و ویژگی واکنش PCR مورد ارزیـابی قـرار گرفـت. همـان‌طـور کـه در بهینه‌سازی روش PCR ذکر شده است در میـان عـواملی مثـل میـزان DNA هدف، مقادیر آنزیم پلی‌مـراز، MgCl2 دمـای آنیلینـگ و سـایر فاکتورهای موثر، ویژگی پرایمرها در درستی واکنش PCR بسیار حایز اهمیت می‌باشد.[۲۰] هرچه پرایمرها اختصاصی‌تر و مناسـب‌تـر طراحـی شده باشند نتایج حاصله ضمن قابـل اطمینـان‌تـر بـودن از حـساسیت بالایی نیز برخوردار می‌باشد. با ملاحظه نتایج این مطالعه اهمیت این امر در افزایش بسیار معنی‌دار حساسیت و ویژگی واکنش PCR کـاملا مشخص گردید. نکته مهم دیگـر توجـه لازم بـه حـساسیت PCR در تشخیص PA در نمونه‌های ریوی CF می‌باشد. به‌طور ذاتـی طراحـی PCR با ویژگی بالا، حساسیت بالایی برای آن تضمین نمی‌کند. در این مطالعه با نگاهی دوباره به نتـایج مقایـسه‌ای منـدرج در جـدول پـنج حساسیت بالای پرایمرهای طراحی شده در نـشان دادن ارگانیـسم در نمونه‌ها به‌طور کامل مشخص است و در عین حـال نتـایج مقایـسه‌ای نشان می‌دهد که ویژگی بالای تست نیز با پرایمرهای طراحی شده در این مطالعه حفظ شده است.

مطالعه مـا نـشان مـی‌دهـد کـه بـا طراحـی مناسـب پرایمرهـای اختصاصی برای نشان دادن ژن‌های algD, oprL, exoA با روش PCR معمولی می‌توان به‌طور مستقیم از نمونه‌های خلط تهیه شده از بیماران CF کلونیزاسیون زود هنگام باکتری را به‌خوبی نشان داد، با توجـه بـه این که در نمونه‌های سوختگی‌هـا و غیـره میـزان بـاکتری بـیش‌تـر از ابتدای کلونیزاسیون در بیماران CF می‌باشد به‌راحتی می‌توان ارگانیسم را در این قبیل نمونه‌ها نشان داد. بنابراین نیازی بـه سـایر روش‌هـای پرهزینه و پیچیده مثل Real time PCR و یا سـایر ورژن‌هـای PCR q نمی‌باشد.

در زیر نتایج بعضی از مطالعات مشابه درج می‌گـردد: در مطالعـه Billard-Pomares نشان داده شده است کـه در روش PCR q ژن prL برای تکثیر به‌کار برده شده است که دارای ویژگی بـسیار بـالا بـوده و در نشان دادن زود هنگام کلونیزاسـیون بـاکتری مناسـب‌تـر از کـشت می‌باشد.[۱۷] در مطالعه Logan نشان داده شده است کـه در مقایـسه بـا کشت PCR در نشان دادن زود هنگام ارگانیـسم از حـساسیت بـالایی برخوردار است. در این مطالعه با به‌کارگیری نمونه‌های خلط و سواپ گلو تعدد موارد مثبت PCR در مقایسه با کشت بالا بوده و نمونه‌هـای منفی کشت بعد از سپری شدن مدتی پس از PCR مثبت شـده اسـت که نشان می‌دهـد کـه PCR در نـشان دادن زود هنگـام کلونیزاسـیون نسبت به کشت از حساسیت و ویژگی بلایی برخوردار است.[۱۸]

در یک بررسی جامع که توسط Anuj تحت عنوان PCR و نـشان دادن PA در نمونه‌های تنفسی در بیماران CF انجـام شـد نتـایج زیـر به‌دست آمد: ۱) نشان دادن زود هنگام PA پس از کلونیزه شدن اولیـه با PCR بسیار بهتر از کـشت بـود. ۲) بـا در نظـر گـرفتن انتقـال PA به‌صورت کلنی در بین بیماران CF از آن‌جایی که تعیـین هویـت ایـن کلنی‌ها بـا کـشت غیـرممکن اسـت، لـذا بـا بـه‌کـارگیری یـک PCR اختصاصی می‌توان انتقال کلنی‌ها را تایید نمود.[۲۰]

در بخش دیگر این مطالعه جمع‌آوری اطلاعات جامع مربـوط بـه ویژگی ژن‌های اختصاصی مورد استفاده، بـرای نـشان دادن PA مـورد ارزیابی و دسته‌بندی قرار گرفته که در مجموع نشان می‌دهـد کـه هـر سه ژن algD, oprL, exoA مورد استفاده در مطالعه ما از ویژگی بسیار بالایی برخوردار بوده و به‌ویژه algD, oprL دارای ویژگی صد در صد می‌باشد. تا سال ۲۰۱۱ چهار مقاله ویژگی ژن oprL را بررسی نمودند و در هیچ‌کدام از آن‌ها واکنش متقاطع با گونه‌هـای غیـر PA مـشاهده نـشد. در مطالعـه مـا حـساسیت ژن oprL ۱۰۰٪ بـود.[۲۰] هـم‌چنـین بررسی‌های زیاد نشان می‌دهد که در هیچ گزارش و مقاله‌ای از هر سه ژن algD, oprL, exoA با هم برای شناسایی PA استفاده نشده اسـت. در نهایت با به‌کارگیری پرایمرهای طراحی شده نتایج مثبـت PCR بـه ترتیـب بـرای ژن‌هـای exoA، oprL و algD در ۶۸، ۷۰ و ۶۹ نمونـه به‌دست آمد که به‌ترتیب ۹۷/۲٪، ۱۰۰٪ و ۹۸/۶٪ دارای حساسیت بود

www.SID.ir

Archive of SID

و ویژگی آن نیز صد در صد بود.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه تحت عنوان "مقایسه روش‌های تشخیصی میکروبیولوژی و مولکولی برای نشان دادن سریع *سودوموناس آئروژینوزا* در نمونه‌های بالینی" در مقطع کارشناسی ارشد در سال ۱۳۹۱ و کد ۷۲۴ می‌باشد که با حمایت دانشگاه علوم پزشکی اراک انجام گرفته است.

References

1. Macdonald D, Cuthbertson L, Doherty C, Campana S, Ravenni N, Taccetti G, et al. Early Pseudomonas aeruginosa infection in individuals with cystic fibrosis: is susceptibility testing justified? *J Antimicrob Chemother* 2010;65(11):2373-5.
2. De Vos D, Lim A Jr, Pirnay JP, Struelens M, Vandenvelde C, Duinslaeger L, et al. Direct detection and identification of Pseudomonas aeruginosa in clinical samples such as skin biopsy specimens and expectorations by multiplex PCR based on two outer membrane lipoprotein genes, oprI and oprL. *J Clin Microbiol* 1997;35(6):1295-9.
3. Tran NK, Greenhalgh DG, Palmieri TL, Kost GJ. Multiplex PCR pathogen detection in two severely burned patients with suspected septicemia. *J Burn Care Res* 2011;32(6):e172-7.
4. Feizabadi MM, Majnooni A, Nomanpour B, Fatolahzadeh B, Raji N, Delfani S, et al. Direct detection of Pseudomonas aeruginosa from patients with healthcare associated pneumonia by real time PCR. *Infect Genet Evol* 2010;10(8):1247-51.
5. Kidd TJ, Ramsay KA, Hu H, Bye PT, Elkins MR, Grimwood K, et al. Low rates of Pseudomonas aeruginosa misidentification in isolates from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* 2009;47(5):1503-9.
6. Deschaght P, De Baere T, Van Simaey L, Van Daele S, De Baets F, De Vos D, et al. Comparison of the sensitivity of culture, PCR and quantitative real-time PCR for the detection of Pseudomonas aeruginosa in sputum of cystic fibrosis patients. *BMC Microbiol* 2009;9:244.
7. Kappler M, Kraxner A, Reinhardt D, Ganster B, Griese M, Lang T. Diagnostic and prognostic value of serum antibodies against Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis. *Thorax* 2006;61(8):684-8
8. da Silva Filho LV, Tateno AF, Martins KM, Azzuz Chernishev AC, Garcia Dde O, Haug M, et al. The combination of PCR and serology increases the diagnosis of Pseudomonas aeruginosa colonization/infection in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 2007;42(10):938-44.
9. McCulloch E, Lucas C, Ramage G, Williams C. Improved early diagnosis of Pseudomonas aeruginosa by real-time PCR to prevent chronic colonisation in a paediatric cystic fibrosis population. *J Cyst Fibros* 2011;10(1):21-4.
10. Williams HL, Turnbull L, Thomas SJ, Murphy A, Stinear T, Armstrong DS, et al. A diagnostic PCR assay for the detection of an Australian epidemic strain of Pseudomonas aeruginosa. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2010;9:18.
11. da Silva Filho LV, Levi JE, Oda Bento CN, da Silva Ramos SR, Rozov T. PCR identification of Pseudomonas aeruginosa and direct detection in clinical samples from cystic fibrosis patients. *J Med Microbiol* 1999;48(4):357-61.
12. Xu J, Moore JE, Murphy PG, Millar BC, Elborn JS. Early detection of Pseudomonas aeruginosa: comparison of conventional versus molecular (PCR) detection directly from adult patients with cystic fibrosis (CF). *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2004;3:21.
13. Saiman L, Siegel J. Infection control in cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 2004;17(1):57-71.
14. Deschaght P, Schelstraete P, Lopes dos Santos Santiago G, Van Simaey L, Haerynck F, Van Daele S, et al. Comparison of culture and qPCR for the detection of Pseudomonas aeruginosa in not chronically infected cystic fibrosis patients. *BMC Microbiol* 2010;10:245.
15. da Silva Filho LV, Tateno AF, Martins KM, Azzuz Chernishev AC, Garcia Dde O, Haug M, et al. The combination of PCR and serology increases the diagnosis of Pseudomonas aeruginosa colonization/infection in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 2007;42(10):938-44.
16. Hayes D Jr, Farrell PM, Li Z, West SE. Pseudomonas aeruginosa serological analysis in young children with cystic fibrosis diagnosed through newborn screening. *Pediatr Pulmonol* 2010;45(1):55-61.
17. Billard-Pomares T, Herwegh S, Wizla-Derambure N, Turck D, Courcol R, Husson MO. Application of quantitative PCR to the diagnosis and monitoring of Pseudomonas aeruginosa colonization in 5-18-year-old cystic fibrosis patients. *J Med Microbiol* 2011;60(Pt 2):157-61.
18. Logan C, Habington A, Lennon G, Cronin F, O'Sullivan N. Evaluation of the efficacy of real-time polymerase chain reaction for the routine early detection of Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis sputum and throat swab specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010;68(4):358-65.
19. Deschaght P, Van Daele S, De Baets F, Vaneechoutte M. PCR and the detection of Pseudomonas aeruginosa in respiratory samples of CF patients. A literature review. *J Cyst Fibros* 2011;10(5):293-7.
20. Anuj SN, Whiley DM, Kidd TJ, Ramsay KA, Bell SC, Syrmis MW, et al. Rapid single-nucleotide polymorphism-based identification of clonal Pseudomonas aeruginosa isolates from patients with cystic fibrosis by the use of real-time PCR and high-resolution melting curve analysis. *Clin Microbiol Infect* 2011;17(9):1403-8.

www.SID.ir

Archive of SID

TUMJ Tehran University Medical Journal, November 2013; Vol. 71, No. 8: 493-501 Original Article

Designing of the specific DNA primers for detection of the exoA, oprL and algD pathogenicity genes for rapid diagnosis of Pseudomonas aeruginosa

Mohammad Najafimosleh Ph.D.[1*]
Sedighe Rashno taie M.Sc.[2]
Ehsanollah Ghaznavi rad Ph.D.[2]
Hamid Abtahi Ph.D.[2]
Gholamreza Taleie Ph.D.[3]

1- Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran.
2- Department of Medical Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, Arak, University of Medical Sciences, Arak Iran.
3- Department of Medical Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, Khorram Abad University of Medical Sciences, Khorram Abad, Iran.

[*] Corresponding author: Department of Microbiology, School of Medicine, Hamedan University of Medical Sciences, Mahdiea St., Hamedan, Iran., Postal Code:6517838736
Tel: +98- 811- 8380462
E-mail: n_mosleh@yahoo.com

Abstract

Received: April 06, 2013 Accepted: July 07, 2013

***Background*:** The aim of this study was compared the efficacy of the designed primers and already published primers for detection of the exoA, oprL and algD genes by PCR assay for finding a rapid, accurate and highly sensitive and specific procedure to detect the Pseudomonas aeruginosa in the serious and fatal infections such as cystic fibrosis disease, burned individual.

***Methods*:** A total of 150 clinical specimens were inoculated in to routine and selective culture media for Pseudomonas aeruginosa isolation. Specific primers were designed by bioinformatics analysis for detection of the virulence genes exoA, oprL and algD. The available sequences of these three genes were obtained from NCBI and multiple alignments were performed to find the conserved sequences of each gene for primer designing. Both multiple alignment and primer designing steps were carried out by AlleleID software, version 7.0.

***Results*:** Microbiological culture methods were showed that 70 Pseudomonas aeruginosa strains isolated from the 150 clinical specimens. PCR assay performed by using the designed primers shown 68, 70 and 69 positive results from 70 direct specimens for exoA, oprL and algD respectively that shown 97.2%, 100% and 98.6% sensitivity for above genes. PCR assay performed by using the already published primers shown 57, 49 and 28 positive results for above genes respectively that shown 81.5%, 70% and 40% sensitivity.

Conclusion: The present study shows that by using the high specific primers for detection of the mentioned genes of the Pseudomonas aeruginosa. The conventional PCR assay detected the early colonization of the organism in Cystic Fibrosis patients with more sensitivity and specificity before several mounts to obtain positive culture. Indeed PCR assay with high specific primers has more sensitivity and specificity as a rapid and accurate diagnosis of the organism in other deadly infections by using the direct clinical specimens.

Keywords: cystic firosis, genes, polymerase chain reaction, pseudomonas aeruginosa.

www.SID.ir