

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

چکیده

محمد نجفی مصلح^{۱*}

صدیقه رشنو طایی^۲

احسان الله غزنوی راد^۲

حمید ابطی،^۲ غلامرضا طالعی^۳

۱- گروه میکروبیولوژی و ایمنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، ایران.
۲- گروه میکروبیولوژی و ایمنولوژی، 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: ۰۸۱۱-۸۳۸۰۴۶۲

E-mail: n_mosleh@yahoo.com

مقدمه

سودوموناس آئروژینوزا (*Pseudomonas Aeruginosa*, PA) یک پاتوژن فرصت طلب است که بیماران مبتلا به سیستمیک فیبروزیس (Cystic Fibrosis, CF)،^۱ بیماران مبتلا به زخم‌های سوختگی^۲ و یا تروماهای چشمی، افراد دچار ضعف یا نقص در سیستم ایمنی، هم‌چنین دریافت‌کنندگان پیوند عضو افراد مستعد به عفونت‌های مهلک ناشی از این ارگانیزم می‌باشند.^۳ این ارگانیزم به‌ویژه در محیط‌های بیمارستانی پخش بسیار گسترده داشته و به عنوان یکی از عوامل بسیار مهم عفونت‌های بیمارستانی شمرده می‌شود.^۴ گذشته از

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

زمینه و هدف: تشخیص سریع سودوموناس آئروژینوزا در سیستمیک 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 سیستمیک فیبروزیس خیلی زودتر از مثبت شدن کشت نشان داد.

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

مقاومت‌های دارویی ذاتی، وجود مقاومت‌های اکتسابی آنتی‌بیوتیکی هم‌زمان به چندین دارو نیز (Multiple drugs resistance) کنترل عفونت‌های ناشی از این ارگانیزم 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.^۵ هم‌چنین بعضی از سویه‌ها آگزوتروف 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.^۶ در بعضی از کشورها از روش سرولوژیک استفاده می‌کنند

سویه‌های سودوموناس از واکنش‌های شیمیایی و تست‌های افتراقی از جمله سیمون سیترا، Triple Sugar Iron Agar (TSIA)، سولفیدهیدروژن ایندول موتیلیتی (Sulfide Indole Motility, SIM)، اکسیداسیون فرمتاسیون (Oxidative-Fermentative, OF) استفاده شد. چون نتایج روش جداسازی ارگانسیم به‌عنوان استاندارد طلائی برای تعیین حساسیت و ویژگی نتیجه PCR استفاده می‌شود، لذا از محیط‌های انتخابی برای رشد سویه‌های آگزوتروف 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 بر روی کروموزوم باکتری قرار دارند به‌عنوان هدف جهت انجام PCR مورد استفاده قرار گرفتند. دو سری پرایمر اختصاصی برای ژن‌های exoA، oprL، algD استفاده گردید، یکی پرایمرهای منتشر شده در مقالات^{۱۱} 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 پلیمرز 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 بیوانفورماتیک 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 (Invitex Stratec Molecular GmbH, Germany) استفاده

که روش قابل اطمینانی نیست.^{۷،۸} به‌تازگی از واکنش زنجیره پلی‌مرز 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.^{۱۱} 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 آگزوتوکسن A که در ۹۵٪ از سویه‌ها وجود دارد)، oprL (مسئول سنتز یک پروتئین غشای خارجی) و ژن algD (مسئول سنتز آلزینات) مورد بررسی قرار بدهد.^{۱۱} در این تحقیق با روش آنالیز بیوانفورماتیک 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 آبرسه (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 (PBS Buffer) Salt اضافه شد و در دمای ۷۰°C 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

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 آنتی سنس، 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، ۹۵ °C به مدت دو دقیقه و در ادامه ۳۵ سیکل با برنامه واسرشتگی اولیه در ۹۵ °C به مدت یک دقیقه، Annealing در دمای ۵۵ °C به مدت ۳۰ ثانیه و Extension در دمای ۷۲ °C به مدت یک دقیقه و در نهایت مرحله‌ی طولیل سازی نهایی در دمای ۷۲ °C به مدت پنج دقیقه انجام گرفت.

انجام واکنش PCR به کمک ژن‌های algD, oprL, exoA

پرایمرهای منتشر شده در مقالات

واکنش PCR برای PCR: exoA 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 و با برنامه Denaturation، ۹۶ °C به مدت پنج دقیقه و در ادامه ۴۰ سیکل با برنامه واسرشتگی اولیه در ۹۶ °C به مدت یک دقیقه، Annealing در دمای ۵۵ °C به مدت یک دقیقه و Extension در دمای ۷۲ °C به مدت یک دقیقه و در نهایت مرحله‌ی طولیل سازی نهایی در دمای ۷۲ °C به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت.

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

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

شد. DNA نمونه‌ها پس از استخراج و تخلیص در دمای ۸۰ °C- 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 آگارز 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 PCR Buffer، Taq polymerase، NTP، mgCl₂، d می‌باشد و ۰/۱ از پرایمر سنس exoA و ۰/۱ پرایمر آنتی سنس، ۱/۵ میکرولیتر DNA استخراج شده و ۰/۵ میکرولیتر MgCl₂ (۵۰ میلی مولار) 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 و با برنامه واسرشتگی اولیه (Denaturation) ۹۵ °C به مدت دو دقیقه و در ادامه ۳۵ سیکل با برنامه واسرشتگی اولیه در ۹۵ °C به مدت یک دقیقه، اتصال پرایمرها به هدف (Annealing) در دمای ۵۳ °C به مدت ۳۰ ثانیه و در ادامه طولیل شدن در دمای ۷۲ °C به مدت یک دقیقه و در نهایت مرحله ادامه نهایی (Extension Fine) در دمای ۷۲ °C درجه به مدت پنج دقیقه انجام گرفت.

واکنش PCR برای ژن oprL: با ۲۵ میکرولیتر مخلوط حاوی ۱۲/۵ میکرولیتر PCR Master Mix ۰/۱ از پرایمر سنس oprL و ۰/۱ پرایمر آنتی سنس، ۱/۵ میکرولیتر DNA استخراج شده و ۰/۵ میکرولیتر MgCl₂ (۵۰ میلی مولار) 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 برنامه Denaturation، ۹۵ °C به مدت دو دقیقه و در ادامه ۳۵ سیکل با برنامه واسرشتگی اولیه در ۹۵ °C به مدت یک دقیقه، Annealing در دمای ۵۶ °C به مدت ۳۰ ثانیه و طولیل شدن (Extension) در دمای ۷۲ °C به مدت یک دقیقه و در نهایت مرحله‌ی طولیل سازی نهایی در دمای ۷۲ °C به مدت پنج دقیقه انجام گرفت.

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:CTTCTCAGTCGACGCGACG-3	۵۵ °C	۵۰۴bp	۶،۱۱،۱۲،۱۴،۱۸
سودوموناس آئروژینوزا	algD	F:5-TTCCTCGCAGAGAAAACATC-3 R:5-CCTGGTTGATCAGGTCGATCT-3	۶۰ °C	۵۲۰bp	۶،۱۱،۱۲،۱۴،۱۸

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

ژن‌های هدف سودوموناس آئروژینوزا	توالی پرایمرهای	اندازه پرایمر	سایز امپلیکون
EoxA	Sense ACATCAAGGTGTTTCATCC	۱۸	۱۲۵
	Anti-sense GACGAAGAAGTGGCATC	۱۸	
oprL	Sense TGCGATCACCACCTTCTACTTC	۲۲	۱۰۵
	Anti-sense CGCTGACCGCTGCCTTC	۱۸	
algD	Sense ACGAAGTGGTGGCGAGTTC	۲۲	۱۰۵
	Anti-sense TGGTGTGCGGCATGAAGC	۱۸	

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.

بارگذراننده بافر استفاده شده که آبی رنگ بود، در هنگام حرکت نمونه‌ها دو رنگ سبک و سنگین از آن جدا شد که ملاک حرکت نمونه‌ها تا سه چهارم ژل، رنگ سبک آن بود. بعد از پایان حرکت نمونه‌ها، دستگاه الکتروفورز را خاموش کرده و ژل از تانک به آرامی 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 به عنوان 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.

الکتروفورز گردید و به کمک (Cinna Gen Inc., Tehran, Iran) رنگ آمیزی 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 به وسیله 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 قبل تر شانه‌ای در آن قرار داده شده بود، ریخته و بعد از بسته شدن 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 بسته شده 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 بارگذراننده بافر مخلوط شده، ریخته شد.

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 از 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 سوبه‌های کنترل منفی و مثبت و به‌کارگیری پرایمرهای یونیورسال حفاظت شد *rRNA* و 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 پیلای و آلزینات، به بروز پدیده مقاومت به چندین دارو (Multi drugs resistance) مربوط می‌باشد.^۴ این وضعیت کنترل ارگانسیم در بیمارستان‌ها را بسیار مشکل و تقریباً 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 ارگانسیم 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 (<i>exoA</i>)	نتایج PCR (<i>oprL</i>)	نتایج PCR (<i>algD</i>)	نتایج PCR برای 16SrRNA (۳۱۲bp)
سواب زخم	۲۹	+	+	+	+	+
خلط	۱	+	-	+	-	+
خلط	۷	+	+	+	+	+
مایع مغزی نخاعی	۳	+	+	+	+	+
آبسه	۱۰	+	+	+	+	+
بیوپسی	۱	+	+	+	+	+
ترشحات ریه	۱	+	-	+	+	+
مایع سینوویال	۱	+	+	+	+	+
ترشحات ریه	۱۲	+	+	+	+	+

جدول ۴: نتایج PCR با استفاده از پرایمرهای منتشر شده در مقالات در نمونه‌های مستقیم مختلف، با نتیجه کشت مثبت

نوع نمونه	تعداد	نتایج کشت	نتایج PCR (exoA) (۳۹۶bp)	نتایج PCR (oprL) (۵۰۴bp)	نتایج PCR (algD) (۵۲۰bp)	نتایج PCR برای 16SrRNA (۳۱۲bp)
سوپ زخم	۱۵	+	+	-	+	+
سوپ زخم	۱۸	+	+	+	-	+
خلط	۵	+	+	+	-	+
خلط	۳	+	-	+	-	+
CSF	۳	+	+	+	+	+
CSF	۳	+	+	+	+	+
بیوبی	۱	+	+	-	-	+
ترشحات ریه	۵	+	+	-	-	+
ترشحات ریه	۱۰	+	-	+	+	+
آبسه	۱۰	+	+	+	-	+

جدول ۵: نتایج کامل کشت و PCR با استفاده از پرایمرهای منتشر شده 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 منتشر شده در مقالات (oprL)	پرایمر منتشر شده در مقالات (algD)
۷۰	۷۰	۶۸	۷۰	۶۹	۴۹	۲۸
تعداد نمونه‌های مثبت					در مقالات	در مقالات

بیماران سیستمیک فیروزیس منفی است^{۱۲} و در نشان دادن سریع باکتری در بیماران بستری در ICU و سوختگی‌های درجه ۳ که وارد فاز باکتری می‌شده‌اند به علت طولانی شدن زمان شناسایی باکتری جواب گو نمی‌باشد.^۶ علاوه بر زمان بر بودن کشت و تست‌های بیوشیمیایی می‌توان در ارتباط با جداسازی به مشکلات دیگر نیز اشاره کرد. از جمله وجود سویه‌های آگروتروف 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 به طول 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 به علت وابسته بودن به کیت در ایران موارد استفاده کمی‌تری 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 ارگانیزم 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 صورتی که در این بیماران در ابتدای کلونیزاسیون جواب کشت منفی بوده است. در اکثر این موارد چهار تا ۱۶ ماه بعد از کلونیزاسیون، کشت مثبت گزارش

بیماران سیستمیک فیروزیس منفی است^{۱۲} و در نشان دادن سریع باکتری در بیماران بستری در ICU و سوختگی‌های درجه ۳ که وارد فاز باکتری می‌شده‌اند به علت طولانی شدن زمان شناسایی باکتری جواب گو نمی‌باشد.^۶ علاوه بر زمان بر بودن کشت و تست‌های بیوشیمیایی می‌توان در ارتباط با جداسازی به مشکلات دیگر نیز اشاره کرد. از جمله وجود سویه‌های آگروتروف 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 به طول می‌انجامد در چنین شرایطی تنها با کمک یک روش سریع و دقیق می‌توان بر این مشکل غلبه کرد.^۶ در برخی

را در این قبیل نمونه‌ها نشان داد. بنابراین نیازی به سایر روش‌های پرهزینه و پیچیده مثل Real time PCR و یا سایر ورژن‌های PCR q نمی‌باشد.

در زیر نتایج بعضی از مطالعات مشابه درج می‌گردد: در مطالعه Billard-Pomares نشان داده شده است که در روش PCR q ژن prL برای تکثیر به‌کار برده شده است که دارای ویژگی بسیار بالا بوده و در نشان دادن زود هنگام کلونیزاسیون باکتری مناسب‌تر از کشت می‌باشد.^{۱۷} در مطالعه Logan نشان داده شده است که در مقایسه با کشت PCR در نشان دادن زود هنگام ارگانیزم از حساسیت بالایی برخوردار است. در این مطالعه با به‌کارگیری نمونه‌های خلط و سوپ گلو تعدد موارد مثبت PCR در مقایسه با کشت بالا بوده و نمونه‌های منفی کشت بعد از سپری شدن مدتی پس از PCR مثبت شده است که نشان می‌دهد که PCR در نشان دادن زود هنگام کلونیزاسیون نسبت به کشت از حساسیت و ویژگی بالایی برخوردار است.^{۱۸}

در یک بررسی جامع که توسط Anuj تحت عنوان PCR و نشان دادن PA در نمونه‌های تنفسی در بیماران CF انجام شد نتایج زیر به‌دست آمد: (۱) نشان دادن زود هنگام PA پس از کلونیزه شدن اولیه با PCR بسیار بهتر از کشت بود. (۲) با در نظر گرفتن انتقال PA به‌صورت کلنی در بین بیماران CF از آن‌جایی که تعیین هویت این کلنی‌ها با کشت غیرممکن است، لذا با به‌کارگیری یک PCR اختصاصی می‌توان انتقال کلنی‌ها را تایید نمود.^{۲۰}

در بخش دیگر این مطالعه جمع‌آوری اطلاعات جامع مربوط به ویژگی ژن‌های اختصاصی مورد استفاده، برای نشان دادن PA مورد ارزیابی و دسته‌بندی قرار گرفته که در مجموع نشان می‌دهد که هر 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 گونه‌های غیر PA مشاهده نشد. در مطالعه ما حساسیت ژن oprL ۱۰۰٪ بود.^{۲۰} هم‌چنین بررسی‌های زیاد نشان می‌دهد که در هیچ گزارش و مقاله‌ای از هر سه ژن algD, oprL, exoA با هم برای شناسایی PA استفاده نشده است. در نهایت با به‌کارگیری پرایمرهای طراحی شده نتایج مثبت PCR به ترتیب برای ژن‌های algD, oprL, exoA در ۶۸، ۷۰ و ۶۹ نمونه به‌دست آمد که به‌ترتیب ۹۷/۲٪، ۱۰۰٪ و ۹۸/۶٪ دارای حساسیت بود

شده است. در نتیجه مشخص است که روش PCR قادر است که کلونیزاسیون اولیه باکتری را خیلی زودتر از کشت نشان بدهد و آگاهی یافتن از کلونیزاسیون ارگانیزم در بیماران فوق برای اقدامات پیشگیری اهمیت حیاتی دارد.^{۱۸} دوم: با توجه به این که بیماران مبتلا به CF در سرتاسر طول عمرشان با یک کلون PA آلوده می‌شوند. بررسی مسئله انتقال کلنی در بین بیماران CF و تعیین هویت کلنی‌های منتقل شده به‌وسیله کشت امکان‌پذیر نبوده و تنها با PCR امکان دارد.^{۱۹،۲۰}

در این بررسی از نمونه‌های بالینی مثل ترشحات ریه یا خلط بیماران CF یا سوپ از زخم‌های شدید سوختگی‌ها، مستقیماً DNA استخراج شد. سپس با به‌کارگیری دو سری پرایمرهای اختصاصی طراحی شده در این مطالعه و منتشر شده در مقالات حساسیت و ویژگی واکنش PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. همان‌طور که در بهینه‌سازی روش PCR ذکر شده است در میان عواملی مثل میزان DNA هدف، مقادیر آنزیم پلی‌مراز، MgCl₂ دمای آنیلینگ و سایر فاکتورهای موثر، ویژگی پرایمرها در درستی واکنش PCR بسیار حایز اهمیت می‌باشد.^{۲۰} هرچه پرایمرها اختصاصی‌تر و مناسب‌تر طراحی شده باشند نتایج حاصله ضمن قابل اطمینان‌تر بودن از حساسیت بالایی نیز برخوردار می‌باشد. با ملاحظه نتایج این مطالعه اهمیت این امر در افزایش بسیار معنی‌دار حساسیت و ویژگی واکنش PCR کاملاً مشخص گردید. نکته مهم دیگر توجه لازم به حساسیت PCR در تشخیص PA در نمونه‌های ریوی CF می‌باشد. به‌طور ذاتی طراحی PCR با ویژگی بالا، حساسیت بالایی برای آن تضمین نمی‌کند. در این مطالعه با نگاهی دوباره به نتایج مقایسه‌ای مندرج در جدول پنج حساسیت بالای پرایمرهای طراحی شده در نشان دادن ارگانیزم در نمونه‌ها به‌طور کامل مشخص است و در عین حال نتایج مقایسه‌ای نشان می‌دهد که ویژگی بالای تست نیز با پرایمرهای طراحی شده در این مطالعه حفظ شده است.

مطالعه ما نشان می‌دهد که با طراحی مناسب پرایمرهای 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 توجه به این که در نمونه‌های سوختگی‌ها و غیره میزان باکتری بیش‌تر از ابتدای کلونیزاسیون در بیماران CF می‌باشد به‌راحتی می‌توان ارگانیزم

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.

و ویژگی آن نیز صد در صد بود.
 سیاست‌گذاری: این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه تحت عنوان "مقایسه روش‌های تشخیصی میکروبیولوژی و مولکولی برای نشان

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.

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.