Original Article

Comparison of Two Methods of Direct PCR and PCR with DNA extracted by Kit for Detection of OPrL, ExoA, and algD genes in clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa

Hamed Tahmasebi[1], Javad Adabi[1], Shahram Shahraki Zahedani[2], Behrouz Zeyni[3]*

[1]*Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran.*

[2]*Infectious Diseases & Tropical Medicine Research Center, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran.*

[3]*Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran.*

[*]***Corresponding Author:***
Hamed Tahmasebi,
Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Zahedan University of Medical Science, Zahedan, Iran.

Email:
h.tahmasebi87@yahoo.com

Received: 12 Apr, 2016

Accepted: 24 May, 2016

Abstract

Background and Objectives: Pseudomonas aeruginosa is one of the most common causes of nosocomial infections. Most laboratories usually use culture method and various biochemical tests for identification of *P. aeruginosa*, which are time-consuming and sometimes lead to false positive and negative results. The aim of this study was to compare two methods of PCR with DNA extracted by kit and PCR with direct colony for detection of *P. aeruginosa* isolates.

Methods: In this descriptive-analytical study, out of 395 different clinical isolates, 85 isolates were identified using basic biochemical tests and culture on *P. aeruginosa* specific media. Then, they were assessed by *OPrL*, *ExoA*, *algD* genes using two methods of direct PCR by using DNA extraction kit and direct PCR and PCR with DNA extracted by kit.

Results: Out of 85 *P. aeruginosa* isolates detected by phenotypic screening, 81 isolates had *OPrL*, *ExoA*, *algD* genes using PCR with DNA extracted by kit with (amlicon size, 504, 396, and 526 bp) and 80 isolates had the mentioned genes using direct PCR.

Conclusion: This study showed that, acceptable diagnostic results can be achieved in the identification of *P. aeruginosa* without using extraction kits three stable gens of *P. aeruginosa* detect by using two different molecular methods. The results showed that, without using extraction kit can be acceptable diagnostic obtained of Pseudomonas aeruginosa. On the other hand, in the obtained results, phenotypic *P. aeruginosa* detection methods' error can be observed.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*; PCR; *ExoA* gene; DNA.

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 12:54 IRST on Friday November 24th 2017

مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره یازدهم، شماره سوم، خرداد ۹۶
صفحه ۱۱ الی ۲۱

مقاله پژوهشی
(Original Article)

مقایسه دو روش PCR مستقیم و PCR با DNA استخراج‌شده توس کیت برای ردیابی ژن‌های *OPrL*، *ExoA*، *algD* در ایزوله‌های بالینی *سودوموناس آئروژینوزا*

حامد طهماسبی[1*]، جواد ادبی[1]، شهرام شهرکی زاهدانی[2]، بهروز زینی[3]

[1]گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران.

[2]مرکز بیماری‌های عفونی - گرمسیری، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران.

[3]گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران.

[*]نویسنده مسئول مکاتبات:
حامد طهماسبی، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:
h.tahmasebi87@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۵/۱/۲۳

تاریخ پذیرش: ۹۵/۲/۳۱

چکیده

زمینه و هدف: *سودوموناس آئروژینوزا*، یکی از رایج‌ترین عوامل عفونت‌های بیمارستانی محسوب می‌شود. بیشتر آزمایشگاه‌ها به‌طور معمول برای شناسایی *سودوموناس آئروژینوزا*، از روش کشت و تست‌های بیوشیمیایی مختلف استفاده می‌کنند که روشی وقت‌گیر بوده و در برخی موارد دارای نتایج مثبت و منفی کاذب می‌باشد. هدف از انجام این پژوهش مقایسه دو روش مولکولی PCR با استفاده از DNA استخراج‌شده با کیت و PCR با استفاده از کلنی مستقیم در تشخیص ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا* بود.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی – تحلیلی، از ۳۹۵ ایزوله بالینی مختلف، ۸۵ ایزوله با تست‌های بیوشیمیایی اولیه و کشت بر روی محیط‌های اختصاصی *سودوموناس آئروژینوزا* تشخیص داده شدند. سپس با استفاده از ژن‌های *OPrL*، *ExoA*، *algD* با دو روش مولکولی PCR مستقیم و PCR با استفاده از DNA استخراج‌شده با کیت، مورد ارزیابی قرار گرفتند.

یافته‌ها: از مجموع ۸۵ ایزوله *سودوموناس آئروژینوزا* که به روش فنوتیپی، غربالگری شده بودند، ۸۱ ایزوله به روش PCR با استفاده از DNA استخراج‌شده با کیت، حاوی ژن‌های *OPrL*، *ExoA*، *algD* (با طول نوکلئوتیدهای ۵۰۴، ۳۹۶ و ۵۲۶ جفت باز) و ۸۰ ایزوله نیز به روش PCR مستقیم، دارای ژن‌های مذکور بودند.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان داد بدون استفاده از کیت‌های استخراج می‌توان به نتایج تشخیصی قابل‌قبول در شناسایی *سودوموناس آئروزینوزا* دست یافت. از طرفی، در نتایج به‌دست‌آمده می‌توان خطای روش‌های تشخیصی فنوتیپی *سودوموناس آئروژینوزا* را مشاهده کرد.

کلید واژه‌ها: *سودوموناس آئروزینوز*؛ واکنش زنجیره‌ایی پلیمراز؛ ژن اگزوتوکسین؛ دی ان آ.

لطفاً به این مقاله به‌صورت زیر استناد نمایید:

Tahmasebi H, Adabi J, Shahraki Zahedani Sh, Zeyni B. Comparison of two methods of direct PCR and PCR with DNA extracted by Kit for detection of *OPrL*, *ExoA*, and *algD* genes in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Qom Univ Med Sci J 2017;11(3):11-21.[Full Text in Persian]

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 12:54 IRST on Friday November 24th 2017

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 12:54 IRST on Friday November 24th 2017

مقدمه

*سودوموناس*ها، پاتوژن‌های فرصت‌طلبی هستند که در محیط‌های مختلفی یافت می‌شوند. این باکتری‌ها احتیاجات غذایی ساده‌ای داشته و طیف وسیعی از دما را تحمل می‌کنند (۱). گونه‌های فراوانی در این جنس قرار می‌گیرد که یکی از آنها *سودوموناس آئروژینوزا* است (۲). عفونت‌های *سودوموناس آئروژینوزا* در دستگاه تنفسی تحتانی می‌تواند کلونیزاسیون بدون علامت یا تراکئوبرونشیت خوش‌خیم تا برونکوپنومونی نکروزدهنده شدید را دربرگیرد (۳). کلونیزه شدن باکتری در مبتلایان به FC، با بیماری‌های زمینه‌ای مثل بیماری‌های تهاجمی پارانشیم ریه همراه است (۴). این باکتری در ایجاد ۱۳-۱۱٪ از عفونت‌های بیمارستانی، به‌ویژه در بیماران فیبروز سیستیک، اشخاص دچار سوختگی یا دارای نقص ایمنی و افرادی‌که هوادهی مصنوعی می‌شوند، نقش دارد (۵). استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها در سالهای اخیر موجب شده تا این باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف از گروه‌های مختلف آنتی‌بیوتیکی مقاوم شود (۶). بنابراین، همه این موارد باعث گردیده تا شناسایی باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* به‌عنوان یک باکتری بیمارستانی پرخطر، از اهمیت بالایی برخوردار باشد. جهت تشخیص ایزوله‌های *سودوموناس* از سایر باکتری‌های گرم منفی و حصول اطمینان از جنس و گونه باکتری، تست‌های بیوشیمیایی استاندارد انجام می‌شود (۷). این تست‌ها شامل: رشد در محیط مک‌کانکی آگار، محیط ستریماید آگار، عدم تخمیر گلوکز و لاکتوز در محیط TSI، تولید اکسیداز، مصرف قند از طریق اکسیداسیون، رشد در دمای ۴۲ درجه سانتیگراد، تولید پیگمان و حرکت می‌باشد. این تست‌ها در کنار وقت‌گیر بودن، معمولاً با خطاهایی در تشخیص روبرو هستند؛ به‌طوری‌که در برخی موارد می‌توان شاهد منفی یا مثبت‌های کاذب بود (۹،۸). در بیشتر مواقع، شناسایی این پاتوژن که در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی بسیار اهمیت دارد، با روش‌هایی انجام می‌گیرد که دارای حساسیت و ویژگی مناسبی نبوده و گاهی همراه با خطا می‌باشند (۱۰). البته در تشخیص این باکتری‌ها و بعضاً سویه‌های مقاوم، تست‌های دقیقی نیز وجود دارند که با هدف قرار دادن ژن‌های عامل بیماری و یا عامل مقاومت، در کنار سرعت از دقت بالایی برخوردارند، اما به‌دلیل هزینه بالایی که دارند به‌صورت روتین قابل‌انجام نیستند (۱۱). از ژن‌های *OPrL*، *ExoA*، *algD* به‌علت داشتن ویژگی بالا، در تشخیص *سودوموناس آئروژینوزا* استفاده می‌شود (۹،۷).

PCR (Polymerase Chain Reaction)، یکی از حساس‌ترین و دقیق‌ترین آزمون‌های مولکولی بوده که می‌تواند برای ردیابی ژن‌های مختلف در نواحی خاصی از مولکول DNA، مورد استفاده قرار گیرد (۱۳،۱۲). PCR واکنشی است که به‌وسیله آن می‌توان به‌طور مصنوعی مولکول DNA را به‌صورت تک‌رشته تکثیر کرد (۱۴). ساز و کار این واکنش بدین صورت است که در ابتدا رشته‌های DNA الگو با حرارت در دمای ۹۵درجه سانتیگراد از هم جدا شده و بعد از آن با اتصال قطعات خاصی به‌نام پرایمر در دمایی خاص، طویل‌سازی و در نهایت، همانندسازی از روی یکی از رشته‌های مورد نظر انجام می‌گیرد (۱۵). در PCR، مراحل سه‌گانه به‌صورت دناتوراسیون، اتصال و طویل‌سازی می‌باشد که دما و مدت زمان هر مرحله و تعداد سیکل‌های تکرارشونده، با هم متفاوتند (۵). باوجود دقتی‌که PCR (با استفاده از DNA استخراج‌شده) دارد، ولی در برخی موارد علاوه بر تحمیل هزینه‌های مالی اضافی، سرعت کار را کاهش می‌دهد.

یکی از مراحل PCR، آماده‌سازی و استخراج DNA است. این کار معمولاً با روش‌های جوشاندن، استفاده از فنل کلروفرم و کیت‌های استخراج انجام می‌شود (۱۶). با حذف مرحله استخراج DNA می‌توان سرعت انجام PCR را هنگام مطالعه بر روی تعداد بسیار زیادی از نمونه‌ها بالا برد و از این زمان برای شناسایی بیشتر استفاده کرد (۱۷).در برخی باکتری‌ها ازجمله *استافیلوکوک اورئوس* می‌توان با استفاده از روش PCR مستقیم و برداشت از کلنی‌های باکتریایی، مرحله استخراج DNA را حذف کرد. باتوجه به اهمیت PCR برای تشخیص سریع، دقیق و کاهش هزینه تمام‌شده، این مطالعه با هدف مقایسه دو روش PCR با استفاده از DNA استخراج‌شده با کیت استخراج و PCR مستقیم انجام شد.

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی - تحلیلی طی یک دوره ۱۲ ماهه (از مهرماه سال ۱۳۹۳ تا مهرماه سال ۱۳۹۴)، تعداد۳۹۱ نمونه بالینی شامل: نمونه‌های ادرار، خون، ترشحات زخم، خلط، لوله تراشه،

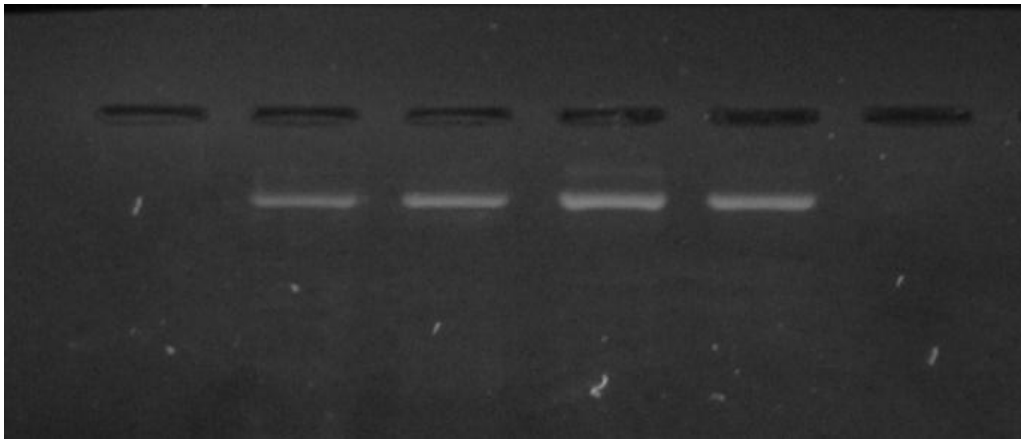
Downloaded from journal.muq.ac.ir at 12:54 IRST on Friday November 24th 2017

لوله سینه و سر سوند، به روش آسان و در دسترس از بیماران بستری در بخش‌های بیمارستان‌های آموزشی دانشگاه علوم پزشکی زاهدان گرفته شد. برای بررسی بیشتر، نمونه‌های جمع‌آوری‌شده به داخل میکروتیوب‌های پلاستیکی درب‌دار {حاوی محیط ترانسپورت BHI (Merck آلمان) با ۱۰٪ گلیسرول}، تلقیح و به آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان منتقل شدند.

برای تعیین هویت نمونه‌ها از نظر جنس و گونه، ازکشت بر روی محیط Cetremide Agar (Merck آلمان) و گرمخانه‌گذاری در دمای ۴۲ درجه سانتیگراد استفاده شد. ایزوله‌های به‌دست‌آمده ازنظر تولید آنزیم اکسیداز و تست OF، رشد در محیط‌های کشت TSI و سیمون سیترات آگار (همگی Merck آلمان) بررسی شدند. برای تأیید نهایی، از تست‌های تکمیلی مانند کاتالاز، تولید H_2 و گاز، تولید رنگدانه، ایندول و متیل‌رد، همچنین داشتن حرکت در محیط SIM (Merckآلمان) استفاده گردید.

جهت استخراج DNA ژنومیک مراحل زیر انجام شد:

ایزوله‌های بالینی ذخیره‌شده در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد روی محیط Muller Hinton Agar (Merck آلمان) کشت اولیه داده شدند و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. سپس یک کلنی از هر ایزوله کشت داده‌شده به ۵ میلی‌لیتر محیط کشت LB Broth (sigmaaldrich آمریکا) که قبلاً درون لوله‌های درب‌دار شیشه‌ایی به تعداد ایزوله‌ها، تقسیم و شماری‌گذاری شده بود، تلقیح گردید و به مدت ۲۰ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد. بعد از سپری شدن زمان مورد نظر (۲۰ساعت)، لوله‌ها از انکوباتور خارج شدند. در ادامه، ۱/۵ سی‌سی از محیط کشت حاصل، درون میکروتیوب‌های درب‌دار ۱/۵پلاستیکی ریخته شد و مراحل استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت استخراج (شرکت سیناژن) و طبق پروتکل شرکت سازنده انجام شد. برای تأیید کار و کیفیت سنجی DNAهای استخراج‌شده، ابتدا با رقت‌سازی DNAهای استخراج‌شده، OD آنها قرائت گردید، همچنین محصولات DNA به میزان ۵ لاندا بعد از ترکیب با Loading dye (Thermofisher آمریکا) بر روی ژل اآگارز ۱٪ لود شدند (شکل شماره ۱). DNAهای حاصل تا زمان انجام ازمایش PCR، در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد ذخیره‌سازی شدند (۱۱).



شکل شماره ۱: کیفیت‌سنجی و تأیید استخراج DNA، به‌وسیله کیت استخراج.

جدول شماره ۱. مشخصات پرایمرهای مورد استفاده برای شناسایی ژن‌های *OPrL*، *ExoA*، *algD* در ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا*

رفرنس	ژن‌های مورد نظر	توالی پرایمرهای مورد استفاده	طول ژن (bp)
Rashno Taee و همکاران(۹)	*exoA*	GACAACGCCCTCAGCATCACCAGC CGCTGGCCCATTCGCTCCAGCGCT	۳۹۶bp
Rashno Taee و همکاران (۹)	*oprL*	ATGGAAATGCTGAAATTCGGC CTTCTTCAGCTCGACGCGACG	۵۰۴bp
Rashno Taee و همکاران (۹)	*algD*	TTCCCTCGCAGAGAAAACATC CCTGGTTGATCAGGTCGATCT	۵۲۰bp

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 12:54 IRST on Friday November 24th 2017

جهت انجام واکنش PCR، ۲۵میکرولیتر از محلول نهایی شامل: ۱میکرولیتر از DNA الگو، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر با غلظت ۱۰ پیکومولار و ۱۲/۵میکرولیتر از Master Mix 2x (Ampliqonآلمان) (شامل: Tris-Hcl PH8.5, (NH_4) SO_4, 3mM $Mgcl_2$, 0.2%Tween20، MmdNTP 4/4، 0/2 unit Ampliqon polymeras، (Insert red dye and stabilizer استفاده شد. برای رساندن به حجم نهایی، از آب مقطر دیونیزه استفاده گردید. از مخلوط PCR فاقد DNA الگو نیز به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد (۱۴). سپس آزمون PCR برای ژن‌ها *OPrL*، *ExoA*، *algD* با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (BioRad آمریکا) شامل: دناتوراسیون اولیه در ۹۶ درجه سانتیگراد به مدت یک‌دقیقه، ۴۰ سیکل دناتوراسیون در دمای ۹۶ درجه به مدت یک‌دقیقه، مرحله اتصال پرایمر در دمای ۵۵ درجه سانتیگراد به مدت یک‌دقیقه و تکثیر قطعه هدف در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت یک‌دقیقه برای ژن *exoA*، دناتوراسیون اولیه در ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت یک‌دقیقه، ۴۰ سیکل دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه به مدت ۴۰ ثانیه، مرحله اتصال پرایمر در دمای ۵۷ درجه سانتیگراد به مدت۴۰ ثانیه و تکثیر قطعه هدف در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵۰ ثانیه برای ژن *oprL* و دناتوراسیون اولیه در ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت یک‌دقیقه، ۳۰ سیکل دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه به مدت یک‌دقیقه، مرحله اتصال پرایمر در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت یک‌دقیقه و تکثیر قطعه هدف در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت یک‌دقیقه برای *algD* انجام گرفت. محصولات PCR برای انجام الکتروفورز، در یخچال ۴+ درجه سانتیگراد نگهداری شدند (۱۵).

برای انجام واکنش PCR مستقیم؛ به جای استفاده از DNA الگو و انجام مراحل مختلف استخراج، یک عدد از کلنی‌های باکتری تازه کشت داده‌شده با فیلدوپلاتین برداشته شد و داخل میکس آماده‌شده تلقیح گردید. برای بهتر حل‌شدن کلنی، به مدت۱۰ ثانیه میکس نهایی ورتکس شد. برای آماده‌سازی میکس نهایی، حجم نهایی مطابق با روش اول به ۲۵میکرولیتر رسانده شد و به جای ۱ میکرولیتر از هر پرایمر، ۳ میکرولیتر از هر پرایمر اضافه گردید و با همان سیکل دمایی، واکنش انجام گرفت.

در روش PCR مستقیم؛ به جای استخراج DNA و انجام مراحل چندگانه آن، از کلنی تازه باکتری به‌صورت کشت‌های ۲۴ساعته استفاده شد. تازه بودن کلنی‌ها و عدم نگهداری آنها، برای انجام PCR مدنظر قرار گرفت. همچنین برای از بین بردن خطای احتمالی، از محیط Mueller Hinton agar (Merck آلمان) برای کشت باکتری استفاده شد.

۵ میکرولیتر از محلول PCR در ژل اگارز ۱٪، الکتروفورز گردید. هنگام تهیه ژل به آن، ۵ میکرولیتر محلول Gel Red (Biotium آمریکا) اضافه شد. نتیجه نهایی به‌وسیله دستگاه Gel Documentation system CCD (مدل CCD-Tab1 کیاژن ایران)، بررسی و از آن عکس تهیه گردید. از مارکر ۱۰۰bp فرمنتاز (Thermofisher آمریکا)، برای شناسایی باند مورد نظر استفاده شد.

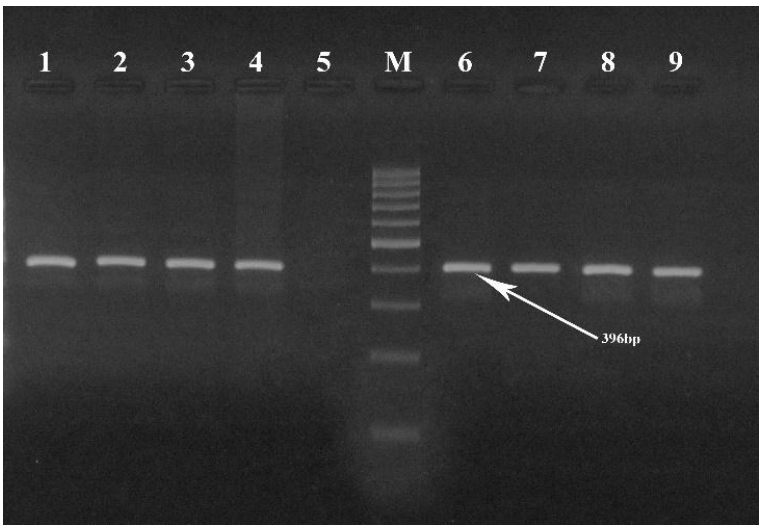
نتایج با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۷ و روش‌های آماری توصیفی (تعیین فراوانی، درصد و میانگین) تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

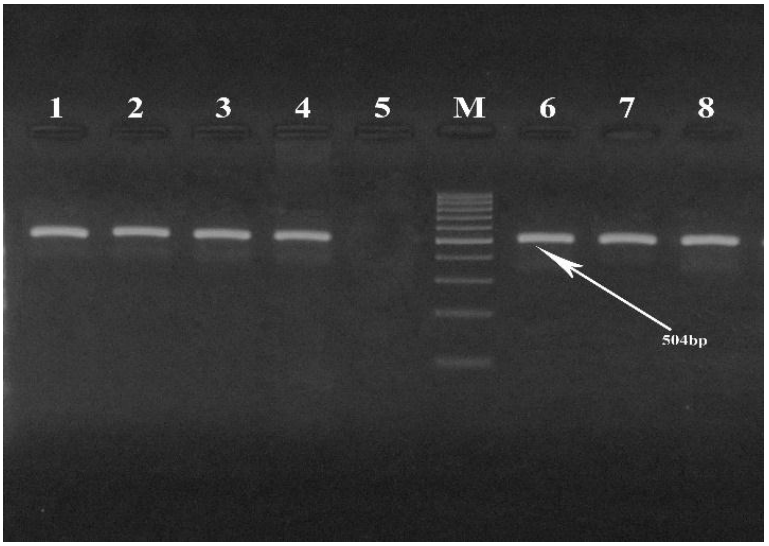
در این تحقیق، روش PCR مستقیم با استفاده از کلنی باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* انجام شد، که نتایج خوبی را دربرداشت و برای مقایسه نتایج به‌دست‌آمده نیز از واکنش PCR با استفاده از DNA استخراج‌شده با کیت، استفاده گردید. در هر دو روش مورد استفاده؛ ژن‌های *OPrL*، *ExoA*، *algD* با طول باندهای ۵۰۴، ۳۹۶، ۵۲۶ جفت باز (ژن‌های حفاظت در این باکتری) با موفقیت تکثیر شدند. از این ژن‌ها می‌توان برای شناسایی *سودوموناس آئروژینوزا* استفاده کرد. کیفیت باندهای مشاهده‌شده در روش PCR با استفاده از DNA استخراج‌شده با کیت، کاملاً واضح و پررنگ بود (شکل شماره ۴-۲). در روش PCR مستقیم، کیفیت باندها با توجه به روش اول، نسبتاً قابل‌قبول بود (شکل شماره ۷-۵). این ضعف و عدم پررنگی باندها در برخی ژن‌ها مانند *algD* بیشتر مشاهده گردید (شکل شماره ۵). از ۸۵ نمونه *سودوموناس آئروژینوزا* که به روش فنوتیپی تعیین هویت شدند، با روش PCR با استفاده از DNA استخراج‌شده با کیت، ژن‌های *OPrL*، *ExoA*، *algD* به ترتیب در ۹۶/۴۷٪، ۹۵/۲۹٪ و ۹۵/۲۹٪ ایزوله مشاهده شدند (جدول شماره ۳).

جدول شماره۳: نتایج به‌دست‌آمده از دو روش PCR با استفاده از DNA استخراج‌شده به‌وسیله کیت استخراج و PCR مستقیم در نمونه‌های بالینی *سودوموناس آئروژینوزا*

نوع آزمایش PCR	باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* (به روش فنوتیپی) (n=۸۵) تعداد (درصد)		
	exoA	*oprL*	*algD*
PCR با استفاده از *DNA* استخراج‌شده	۸۱(٪۹۵/۲۹)	۸۲(٪۹۶/۴۷)	۸۱(٪۹۵/۲۹)
PCR مستقیم	۸۰(٪۹۴/۱۱)	۸۱(٪۹۵/۲۹)	۷۹(٪۹۲/۹۴)



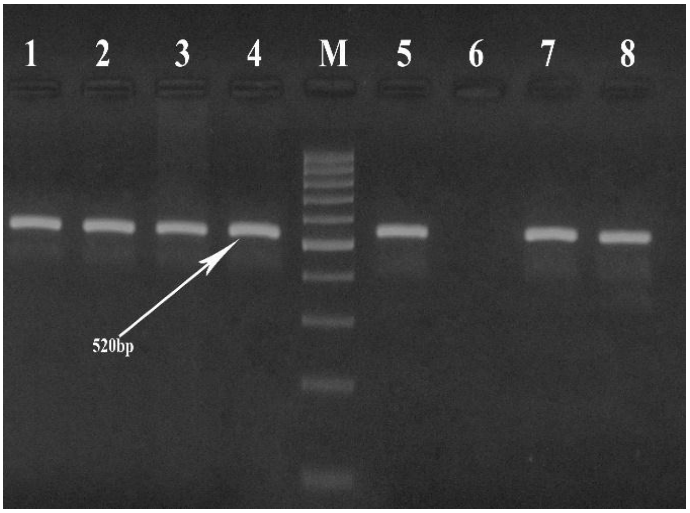
شکل شماره۲: ژل الکتروفورز ۱/۵٪ محصولات ژن *exoA* با اندازه ۳۹٦ جفت باز در نمونه‌های بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* با روش PCR با استفاده از کیت استخراج؛ چاهک M مارکر مولکولی مورد استفاده با طول ۱۰۰ جفت باز، چاهک‌های ۹ - ۱نمونه‌های مثبت از نظر ژن *exoA* .چاهک ۵کنترل منفی؛ چاهک ٦ کنترل مثبت.



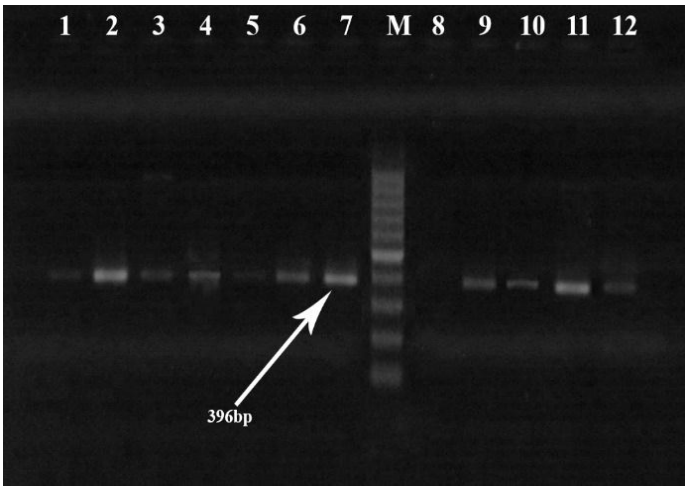
شکل شماره۳. ژل الکتروفورز ۱/۵٪ محصولات ژن *oprL* با اندازه ٥٠٤ جفت باز در نمونه‌های بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* با روش PCR با استفاده از کیت استخراج.چاهک M مارکر مولکولی مورد استفاده با طول ۱۰۰ جفت باز. چاهک‌های ۱ -۸ نمونه‌های مثبت از نظر ژن *oprL*؛ چاهک۵،کنترل منفی؛ چاهک ٦،کنترل مثبت.

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 12:54 IRST on Friday November 24th 2017

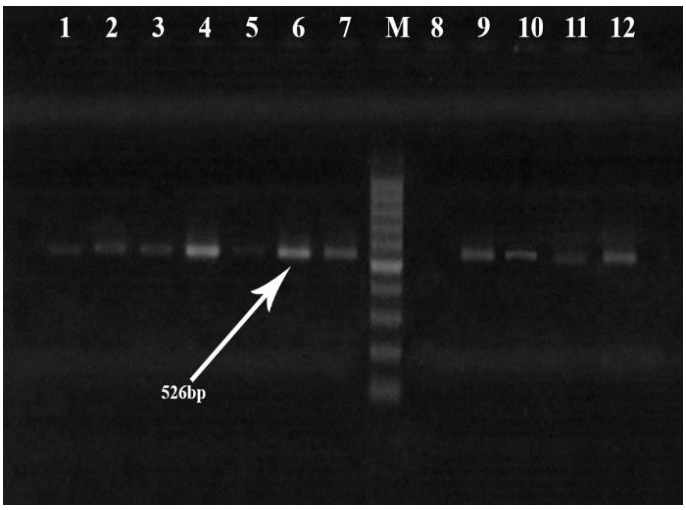
Downloaded from journal.muq.ac.ir at 12:54 IRST on Friday November 24th 2017



شکل شماره٤. ژل الکتروفورز ۱/۵٪ محصولات ژن *algD* با اندازه ۵۲۰ جفت باز در نمونه‌های بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* با روش PCR با استفاده از کیت استخراج. چاهک M، مارکر مولکولی مورد استفاده با طول ۱۰۰ جفت باز؛ چاهک‌های ۱ -۸ نمونه‌های مثبت از نظر ژن *algD*؛ چاهک۵، کنترل مثبت؛ چاهک٦،کنترل منفی.

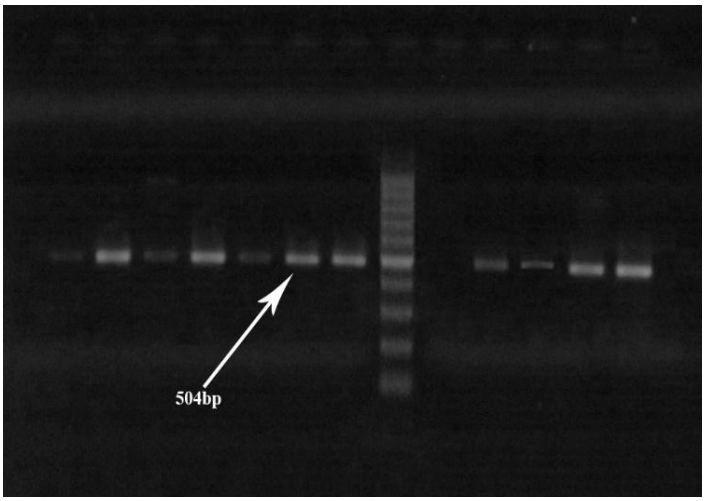


شکل شماره۵. ژل الکتروفورز ۱/۵٪ محصولات ژن *exoA* با اندازه ۳۹٦ جفت بازدر نمونه‌های بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* با روش PCR مستقیم. چاهک M، مارکر مولکولی مورد استفاده با طول۱۰۰ جفت باز؛ چاهک‌های ۹-۱نمونه‌های مثبت از نظرژن *exoA*؛ چاهک۵، کنترل منفی؛ چاهک ٦، کنترل مثبت.



شکل شماره ٦ : ژل الکتروفورز ۱/۵٪ محصولات ژن *algD* با اندازه ۵۲٦ جفت بازدر نمونه‌های بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* با روش PCR با استفاده از کیت استخراج. چاهک M، مارکر مولکولی مورد استفاده با طول ۱۰۰ جفت باز؛ چاهک‌های ۹-۱ نمونه‌های مثبت از نظر ژن *algD*؛چاهک ۵، کنترل منفی؛ چاهک٦،کنترل مثبت.

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 12:54 IRST on Friday November 24th 2017



شکل شماره ۷: ژل الکتروفورز ۱/۵٪ محصولات ژن *oprL* با اندازه ٥٠٤ جفت بازدر نمونه‌های بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* با روش PCR با استفاده از کیت استخراج. چاهک M، مارکر مولکولی مورد استفاده با طول ۱۰۰ جفت باز؛ چاهک‌های ۹ -۱ نمونه‌های مثبت از نظر ژن*oprL* ؛ چاهک ٥،کنترل منفی؛ چاهک ٦،کنترل مثبت.

بحث

تشخیص باکتری‌های عامل بیماری و در کنار آن، مشخص کردن مقاومت آنتی‌بیوتیکی آنها می‌تواند در امر درمان و کنترل مصرف دارو بسیار مهم باشد. از این‌رو برای دست یافتن به یک تشخیص مطمئن و به‌صرفه، باید از روش‌های حساس استفاده کرد. یکی از بهترین و سریع‌ترین روش‌های ممکن برای این‌کار، شناسایی ژن‌های کدکننده این عوامل بوده که با حساسیت بسیار بالا و میزان خطای اندک، تشخیص را قابل‌اطمینان می‌کند (۱۸). با PCR می‌توان ژن‌های موردنظر را بررسی کرد که بدین ترتیب اطلاعات دقیقی از نظر مولکولی در اختیار محقق قرار می‌گیرد. این روش به‌علت داشتن حساسیت و ویژگی بسیار بالا، نسبت به روش‌های قدیمی در شناسایی خصوصیات میکروارگانیسم‌ها، از سرعت خوبی برخوردار است (۱۹،۲۰). این در حالی است که با افزایش روزافزون سویه‌های مقاوم در ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا*، *به‌خصوص* سویه‌های مولد ESBL، AmpC و تهدیدبرانگیز بودن آن در مقابل درمان، برای تشخیص سریع و جلوگیری از گسترش سویه‌های مقاوم، باید به روش‌های سریع و قابل‌اطمینان روی آورد (۱۹). با استفاده از روش‌های فنوتیپی و سرولوژیکال نمی‌توان عوامل ایجادکننده عفونت‌های وابسته به *سودوموناس آئروژینوزا* مقاوم به درمان را به سرعت تشخیص داد و عامل پاتوژن را از بین برد (۲۰). با مشخص کردن ویژگی‌های ذاتی یا اکتسابی باکتری بیماری‌زا ازجمله داشتن مقاومت به آنتی‌بیوتیک و تولید توکسین‌های خطرناک می‌توان در کمترین زمان ممکن با تجویز مناسب‌ترین دارو در مناسب‌ترین دوز ممکن، علاوه بر درمان به‌موقع و کاهش خطر ناشی از عفونت، از بروز مقاومت‌های گسترده به دلیل تشخیص غلط و تجویز اشتباه نیز جلوگیری کرد (۲۱). اگرچه PCR یک روش ساده، آسان و در دسترس برای تکثیر ژنوم می‌باشد، اما به استخراج DNA که یک مرحله وقت‌گیر است، نیاز دارد. برای رسیدن به بهترین کیفیت و کمّیت در فرآیند PCR، باید کیفیت DNA استخراجی را مدنظر قرار داد تا به بهترین تکثیر از قطعه مورد نظر دست یافت (۲۲). از این‌رو برای استخراج PCR، روش‌های متفاوتی ازجمله جوشاندن، فنیل‌کلروفرم، رسوب با اتانول، استفاده از دترجنت‌ها و استفاده از کیت‌های استخراج وجود دارد (۲۳). هریک از این روش‌ها در کنار وقت‌گیر بودن و تحمیل هزینه جانبی، دارای مشکلات و معایب زیادی نیز هستند (۱۶). روش فنیل کلروفرم علاوه بر کند بودن آن، به دلیل ماده سمّی و خطرناک بودن این ماده، یک روش غیرایمن بوده و کار کردن با آن در طولانی‌مدت باعث بروز مشکلاتی می‌شود (۲۴). روش رسوب با اتانول نیز می‌تواند با انتقال اتانول در مراحل پایانی باعث بروز خطا و حتی از بین رفتن محصول نهایی گردد که در نهایت، کار را با خطا مواجه می‌کند (۲۲). روش جوشاندن نیز با داشتن شاخصه وقت‌گیربودن، کیفیت نسبتاً پایینی را از DNA استخراج‌شده عرضه می‌کند (۲۵). نتایجی که در این بررسی به دست آمد گرچه برای برخی ژن‌ها ازنظر کیفی شفافیت باندها پایین بود، اما از نظر کمّی اختلاف بسیار کمی با نتایج به‌دست‌آمده از PCR با استفاده از DNA

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 12:54 IRST on Friday November 24th 2017

استخراج‌شده با کیت داشت. با مقایسه نتایج حاصل از PCR مستقیم و روش فنوتیپی با روش معمول PCR که به‌عنوان گلداستاندارد در نظر گرفته شد، روش‌های فنوتیپی دارای خطای تشخیصی بودند. اما در کنار این موارد، برای تکثیر ژن‌های باکتریایی می‌توان بدون انجام استخراج DNA و با استفاده از کلنی‌های تازه کشت‌داده و تلقیح آنها در میکس نهایی، به نتایج قابل‌قبولی دست یافت. در این زمینه مطالعات متعددی انجام شده که نتایج این تحقیقات با مطالعه حاضر همخوانی داشت. Lichtensteiger و همکاران (سال ۱۹۹۶) با مطالعه بر روی باکتری *پاستورولا مولتوسیدا* با روش PCR مستقیم، نشان دادند این روش برای شناسایی توکسین‌های این باکتری می‌تواند مورداستفاده قرار گیرد و با در نظر گرفتن ارزش تشخیصی مناسب، مشخص کردند این روش در کنار روش‌هایی مانند ELISA و تزریق یک دوز کشنده توکسین به موش، دارای سرعت، دقت و ارزش اخباری قابل‌قبولی است (۲۵). Hiroshi Nakao و همکاران (سال ۱۹۹۷) نیز در یک مطالعه بر روی توکسین‌های دیفتری با استفاده از PCR مستقیم، مشخص کردند این روش دارای حساسیت قابل‌قبولی برای تشخیص سم دیفتری بوده و می‌توان به‌وسیله آن نمونه‌های بالینی را از نظر حضور ژن *tox* مورد ارزیابی مولکولی قرار داد (۲۶). Fode-Vaughan و همکاران طی یک مطالعه (سال ۲۰۰۳)، از روش PCR مستقیم برای ارزیابی باکتری *اشرشیاکلی* استفاده کردند که نتایج حاصل در این مطالعه، نشان‌دهنده تطابق این روش با روش مبتنی بر استخراج DNA بود و باندهای به‌دست‌آمده در هر دو روش تقریباً یکسان و قابل‌استناد بودند (۲۷). Inglis و همکاران (سال ۲۰۰۳) با استفاده از PCR مستقیم، ردیابی مولکولی گونه‌های کمپیلوباکتر را مورد بررسی قرار دادند (۲۸). van Hal و همکاران (سال ۲۰۰۷) نیز با مطالعه مولکولی بر روی استافیلوکوک‌ها مقاوم به متی‌سیلین نشان دادند روش PCR مستقیم می‌تواند یک روش مناسب در تشخیص این باکتری باشد. به‌طوری‌که حساسیت و ویژگی این روش در کنار کاهش قابل‌ملاحظه بار مالی، بیش از ۸۰٪ گزارش شد (۲۹). مطالعات مشابه انجام‌شده در ایران نیز مؤید این امر است که می‌توان با حذف مرحله استخراج و استفاده مستقیم از کلنی باکتری، سرعت کار را بالا برد و دقت را از دست نداد.

احسنی و همکاران (سال ۱۳۹۱)، در مطالعه خود نشان دادند می‌توان از روش PCR مستقیم برای مطالعه بر روی ژن‌های عامل توکسین در *کلستریدیوم دیفیسل* استفاده کرد. در این مطالعه مشخص گردید کیفیت باندهای به‌دست‌آمده در این روش با کیفیت باندهای حاصل در روش PCR با استفاده از DNA استخراج‌شده، کاملاً برابر است (۲۲). همچنین نتایج سایر تحقیقات نشان داده است روش PCR مستقیم علاوه بر اینکه در مطالعات باکتریایی قابل‌استفاده است در مطالعات غیرباکتریایی نیز می‌تواند کاربرد داشته باشد. به‌طوری‌که مطالعه Nishimura و همکاران (سال ۲۰۰۹)، نشان داد RT-PCR مستقیم از اختصاصیت و حساسیت مناسبی برای شناسایی نروویروس‌ها برخوردار بوده و حتی می‌شود از این روش برای بررسی حضور نروویروس در مدفوع استفاده کرد (۳۰). علاوه بر پروکاریوت‌ها، PCR مستقیم در یوکاریوت‌ها نیز مورد بررسی قرار گرفته است. در مطالعه فولادی و همکاران (سال ۱۳۸۶)، به بررسی مقایسه دو روش PCR مستقیم و سایر روش‌ها برای تشخیص لیشمانیوز جلدی پرداخته شد. در کنار مطالعات فوق، همچنین تحقیق حاضر، عدم بررسی این روش در سایر باکتری‌ها با ساختارهای متفاوت و الگوی‌های منحصر به فرد، دیده می‌شود.

نتیجه‌گیری

با توجه به وقت‌گیر بودن مراحل استخراج DNA و پرهزینه بودن برخی کیت‌های استخراج DNA، همچنین وقت‌گیر بودن این کار برای بررسی نمونه‌ها در حجم بالا (با توجه به مراحل چندگانه استخراج)، استفاده از روش PCR مستقیم می‌تواند بسیار مفید باشد. علاوه بر این، در برخی روش‌های استخراج ممکن است با برجای ماندن برخی مواد مورد استفاده در امر استخراج، در مراحل نهایی، حضور این مواد تأثیر بدی بر روی کیفیت و پایداری DNA بگذارد و نتایج بررسی با خطا و یا حتی با شکست مواجه گردد. با توجه به نتایج قابل‌قبولی که این روش نسبت به روش PCR با DNA استخراج‌شده دارد، توصیه می‌گردد در مواردی‌که قطعیت آنها اثبات شده، از کلنی مستقیم برای انجام آزمایشهای PCR استفاده شود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله نویسندگان این مقاله مراتب تشکر و سپاس خود را از مسئولین مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی – گرمسیری دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، به‌خصوص خانم سپهری‌راد که کمال همکاری را با گروه محقق این پژوهش داشتند، به عمل می‌آورند.

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 12:54 IRST on Friday November 24th 2017

References:

1. Kang CI, Kim SH, Kim HB, Park SW, Choe YJ, Oh MD, et al. Pseudomonas aeruginosa bacteremia: Risk factors for mortality and influence of delayed receipt of effective antimicrobial therapy on clinical outcome. Clin Infect Dis 2003;37(6):745-51.

2. Hauser AR, Rello J. Severe infections caused by Pseudomonas aeruginosa. In: Perspectives on critical care infectious diseases. Boston: Kluwer Academic Pub; 2003 .p. 236-49. (Vol. 7)

3. Deretic V, Gill JF, Chakrabarty AM. Pseudomonas aeruginosa infection in cystic fibrosis: Nucleotide sequence and transcriptional regulation of the algD gene. Nucleic Acids Res 1987;15(11):4567-81.

4. Govan JR, Deretic V. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: Mucoid Pseudomonas aeruginosa and Burkholderia cepacia. Microbiol Rev 1996;60(3):539-74.

5. Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. Establishment of Pseudomonas aeruginosa infection: Lessons from a versatile opportunist1. Microbes Infect 2000;2(9):1051-60.

6. Marra AR, Pereira CAP, Gales AC, Menezes LC, Cal RG, de Souza JM, et al. Bloodstream infections with metallo-β-lactamase-producing pseudomonas aeruginosa: Epidemiology, microbiology, and clinical outcomes. Antimicrob Agents Chemother 2006;50(1):388-90.

7. Yousefi Mashouf R, Esmaeili R, Alikhani MY, Ghanbari M. Evaluation of exotoxin A gene and frequency of polymerase chain reaction sensitivity in detection of pseudomonas aeruginosa isolated from burn patients. Tehran Univ Med J 2014;72(3):167-73. [Full Text in Persian]

8. Amirmozafari N, Fallah Mehrabadi J, Isazadieh K, Habibi A. Molecular analysis of exotoxin A associated with antimicrobial resistance of Pseudomonas aeruginosa strains isolated from patients in Tehran hospitals. Iranian J Med Microbiol 2015;8(4):36-43. [Full Text in Persian]

9. Rashno Taee S, Khansarinejad B, Abtahi H, Najafimosleh M, Ghaznavi-Rad E. Detection of algD, oprL and exoA genes by new specific primers as an efficient, rapid and accurate procedure for direct diagnosis of pseudomonas aeruginosa strains in clinical samples. Jundishapur J Microbiol 2014;7(10):e13583.

10. Park JY, Fox LK, Seo KS, McGuire MA, Park YH, Rurangirwa FR, et al. Comparison of phenotypic and genotypic methods for the species identification of coagulase-negative staphylococcal isolates from bovine intramammary infections. Vet Microbiol 2011;147(1-2):142-8.

11. Zadoks RN, Watts JL. Species identification of coagulase-negative staphylococci: Genotyping is superior to phenotyping. Vet Microbiol 2009;134(1-2):20-8.

12. Andreson R, Reppo E, Kaplinski L, Remm M. GENOMEMASKER package for designing unique genomic PCR primers. BMC Bioinformatics 2006;7:172.

13. Walley AJ. PCR Protocols current methods and applications. J Med Genet 1994;31(1):87.

14. Innis M, Gelfand D. 1 - Optimization of PCR: Conversations between Michael and David. In: Innis MA, David H. DH, Sninsky JJ. PCR Applications: Protocols for functional genomics. San Diego: Academic Press; 1999.

15. Rychlik W. Selection of primers for polymerase chain reaction. Methods Mol Biol 1993;15:31-40.

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 12:54 IRST on Friday November 24th 2017

16. Shahbazi B, Narenji H. Comparison of four methods of DNA extraction from gram-negative and gram-positive bacteria. Zanko J(Kurdistan Univ Med Sci) 2014;15(45):9-16. [Full Text in Persian]

17. Chum PY, Haimes JD, André CP, Kuusisto PK, Kelley ML. Genotyping of plant and animal samples without prior DNA purification. J Vis Exp 2012;(67):3844.

18. Capoluongo E, Giglio AA, Lavieri MM, Lesnoni-La Parola I, Ferraro C, Cristaudo A, et al. Genotypic and phenotypic characterization of Staphylococcus aureus strains isolated in subjects with atopic dermatitis. Higher prevalence of exfoliative B toxin production in lesional strains and correlation between the markers of disease intensity and colonization density. J Dermatol Sci 2001;26(2):145-55.

19. Borst P. Genetic Mechanisms of drug resistance: A review. Acta Oncol 1991;30(1):87-105.

20. Montazeri EA, Khosravi AD, Jolodar A, Ghaderpanah M, Azarpira S. Identification of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) strains isolated from burn patients by multiplex PCR. Burns 2015;41(3):590-4.

21. Quirk M. First VRSA isolate identified in USA. Lancet Infect Dis 2002;2(9):510.

22. Ahsani MR, Shamsodinbafti M. Compare of two methods of direct PCR and PCR with DNA extraction in Clostridium Perfringens typing. Iranian Vet J 2012;8(4):5-12. [Full Text in Persian]

23. Mousazade Moghadam M, Babavalian H, Mirnejad R, Shakeri F. Rapid DNA extraction of bacterial genome of Staphylococcus aureus using laundry detergents and assessment of the efficiency of DNA in downstream process using PCR. Med Lab J (Golestan Univ Med Sci) 2012;6(1):35-42. [Full Text in Persian]

24. Eickbush TH, Moudrianakis EN. The histone core complex: An octamer assembled by two sets of protein-protein interactions. Biochemistry 1978;17(23):4955-64.

25. Lichtensteiger CA, Steenbergen SM, Lee RM, Polson DD, Vimr ER. Direct PCR analysis for toxigenic Pasteurella multocida. J Clin Microbiol 1996;34(12):3035–39.

26. Nakao H, Popovic T. Development of a direct PCR assay for detection of the diphtheria toxin gene. J Clin Microbiol 1997;35(7):1651–55.

27. Fode-Vaughan KA, Maki JS, Benson JA, Collins ML. Direct PCR detection of Escherichia coli O157:H7. Lett Appl Microbiol 2003;37(3):239-43.

28. Inglis GD, Kalischuk LD. Use of PCR for direct detection of Campylobacter species in bovine feces. Appl Environ Microbiol 2003;69(6):3435-47.

29. van Hal SJ, Stark D, Lockwood B, Marriott D, Harkness J. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) detection: Comparison of two molecular methods (IDI-MRSA PCR assay and GenoType MRSA Direct PCR assay) with three selective MRSA agars (MRSA ID, MRSASelect, and CHRO Magar MRSA) for use with infection-control swabs. J Clin Microbiol 2007;45(8):2486-90.

30. Nishimura N, Nakayama H, Yoshizumi S, Miyoshi M, Tonoike H, Shirasaki Y, et al. Detection of noroviruses in fecal specimens by direct RT-PCR without RNA purification. J Virol Methods 2010;163(2):282-6.