

طراحی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز بهبود یافته جهت تشخیص مولکولی باکتری استرپتوکوکوس نیومونیا

فهیمة آقامیری^۱، محمد سلیمانی^۲، امیر حسین محسنی^۳، کیوان مجیدزاده^{۳*}

چکیده

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

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

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

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

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

^۱دانشجوی کارشناس ارشد میکروبیشناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران.

^۲استادیار میکروبیشناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران.

^۳استادیار بیوتکنولوژی، مرکز تحقیقات زیست فن آوری تسنیم، پژوهشکده سرطان پستان جهاد دانشگاهی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی آجا ایران، تهران، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات:

کیوان مجیدزاده، مرکز تحقیقات زیست فناوری تسنیم، پژوهشکده سرطان پستان جهاد دانشگاهی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی آجا ایران، تهران، ایران؛

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

تاریخ دریافت: ۹۰/۵/۱۳

تاریخ پذیرش: ۹۱/۳/۲۴

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

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

مقدمه

استرپتوکوکوس نیومونیا دیپلوکوکوس گرم مثبت، آلفاهمولیتیک، حساس به اپتوجین و آئروتولرانت است (۱)، که دارای یک کروموزوم دو رشته‌ای حلقوی بسته شامل ۲/۱-۲ میلیون جفت باز می‌باشد. مخزن پنوموکوس، بخش فوقانی دستگاه تنفسی افراد سالم است. این باکتری دارای فاکتورهای ویروالانس متعدد بوده که در ایجاد بیماری‌های تهاجمی و غیرتهاجمی مؤثر است. همچنین این باکتری از مهم‌ترین عوامل مننژیت باکتریایی در کودکان کمتر از ۵ سال و افراد سالخورده بالای ۶۵ سال محسوب می‌شود (۲). روش‌های اولیه تشخیصی شامل تهیه گسترش مستقیم، کشت و شناسایی آنتی‌ژن باکتریایی است (۳). روش تهیه گسترش مستقیم، یک روش سریع در تشخیص است (۴)، که نیازمند 10^5-10^2 باکتری در هر میلی‌لیتر از نمونه می‌باشد. در روش کشت نیز ۷۲-۱۲ ساعت زمان نیاز است (۵). علاوه بر زمانبر بودن این روش ممکن است به علت مصرف دارو قبل از نمونه‌گیری، نتایج منفی کاذب ایجاد شود. روش‌های تشخیص آنتی‌ژن‌های باکتریایی مانند روش آگلوتیناسیون لاتکس و کانترایمونوالکتروفورزيس معمولاً نیازمند حضور بیش از 10^3 کلونی (CFU) از میکروارگانیسم در هر میلی‌لیتر نمونه است (۶). در حال حاضر، استفاده از روش‌های مولکولی جهت شناسایی این باکتری منجر به تشخیص سریع، دقیق و درمان به موقع بیماری‌های عفونی شده است (۷-۱۰). Radstrom و همکاران در مطالعه خود با استفاده از ژن *16SrRNA* جهت شناسایی *استرپتوکوکوس نیومونیا*، هموفیلوس *آنفلوانزا* و *نایسریا مننژیتیدیس* (۱۱)، به این نتیجه دست یافتند که این ژن از اختصاصیت پایینی جهت شناسایی باکتری *استرپتوکوکوس نیومونیا* برخوردار است؛ زیرا این ژن در بسیاری از میکروارگانیسم‌ها به صورت حفاظت شده وجود دارد. Catrin و همکاران، Ezabel و همکاران در سال ۲۰۰۰ از ژن *psaA* در جهت شناسایی این باکتری استفاده کردند. این ژن علاوه بر *استرپتوکوکوس نیومونیا*، در باکتری‌های *استرپتوکوکوس میتیس* و *استرپتوکوکوس آنجینوسیس*، همچنین در *استرپتوکوکوس*‌های بیماری‌زای دیگر نیز حضور دارد. بنابراین، ممکن است در تشخیص این باکتری خطا ایجاد شود (۱۲، ۱۳). Rintamaki و همکاران (سال ۲۰۰۲)، Van Haeften و همکاران

(سال ۲۰۰۳)، همچنین Saukkoriipi و همکاران از ژن *ply* جهت شناسایی باکتری *استرپتوکوکوس نیومونیا* استفاده کردند. نتایج مطالعه آنها نشان داد ژن مذکور بهترین هدف برای شناسایی باکتری *استرپتوکوکوس نیومونیا* است؛ زیرا این ژن در تمامی سویه‌های این باکتری به صورت حفاظت شده وجود دارد. همچنین ژن *ply* به عنوان یک فاکتور بیماری‌زای مهم با طیف وسیعی از فعالیت‌های بیولوژیکی همراه است. بنابراین، شناسایی این باکتری با استفاده از ژن *ply* یک تکنیک حساس، دقیق و سریع به شمار می‌رود (۱۴، ۷، ۲). Wei و همکاران در سال ۲۰۰۳، از ژن *malM* جهت شناسایی این عامل استفاده کردند. این ژن مسئول ساخت پروتئین آمیلومالتاز است.

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

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

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

در این مطالعه ژن ply به‌عنوان ژن هدف انتخاب شد. جهت طراحی پرایمر ابتدا ترادف‌های ثبت‌شده این ژن در Genbank (۱۹۲ ترادف)، از سایت (National Center for Biotechnology Information) NCBI استخراج و سپس با استفاده از نرم‌افزار CLC Sequence Viewer نسخه ۶ ردیف‌سازی شد. براساس ترادف مشترک به دست آمده و با استفاده از نرم‌افزار Gene Runner نسخه ۳، پرایمرهای جلویی و عقبی طراحی گردید. سکانس پرایمر جلویی 5'CAGCTACCAACGACAGTCGCC3'(21bp) و سکانس پرایمر عقبی 5'CCTGTTACAACCTCGGGCACCC3'(21bp) بود. جهت ارزیابی ویژگی پرایمرها نیز از سرویس BLAST سایت NCBI استفاده شد. واکنش PCR جهت تشخیص ژن هدف در حجم ۲۵µl صورت گرفت. برای انجام این واکنش از ۱/۵mM یون MgCl₂، ۰/۲mM dNTPs و بافر PCR به همراه یک واحد آنزیم Taq DNA Polymerase (شرکت کوثر، ایران)، ۰/۴mM از هر پرایمر و ۷۲ng از ژنوم باکتری/استریتوکوکوس نیومونیا استفاده شد. تکثیر در شرایط دمای دناتوراسیون اولیه ۹۵°C به مدت ۴ دقیقه، ۳۰ چرخه تکثیر با شرایط دناتوراسیون ۹۵°C به مدت یک دقیقه و دمای اتصال ۶۸°C به مدت ۳۰ ثانیه و دمای تکثیر ۷۲°C به مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت دمای تکثیر نهایی به مدت ۵ دقیقه در ۷۲°C انجام شد. همچنین از یک تیوب با شرایط مشابه و استفاده از آب دیونیزه به جای ژنوم باکتری، به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد.

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

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

روش بررسی

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

NCBI انجام گرفت. پلاسمید تأیید شده *pTZ-ply* نامگذاری شد. جهت بررسی ویژگی واکنش، با استفاده از پرایمرهای ژن *ply* بر روی ژنوم باکتری‌های کنترل منفی، PCR انجام گرفت (جدول). همچنین برای تعیین حساسیت، ابتدا غلظت پلاسمید *pTZ-ply* با تعیین جذب نوری توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (Picodrop) مشخص گردید.

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

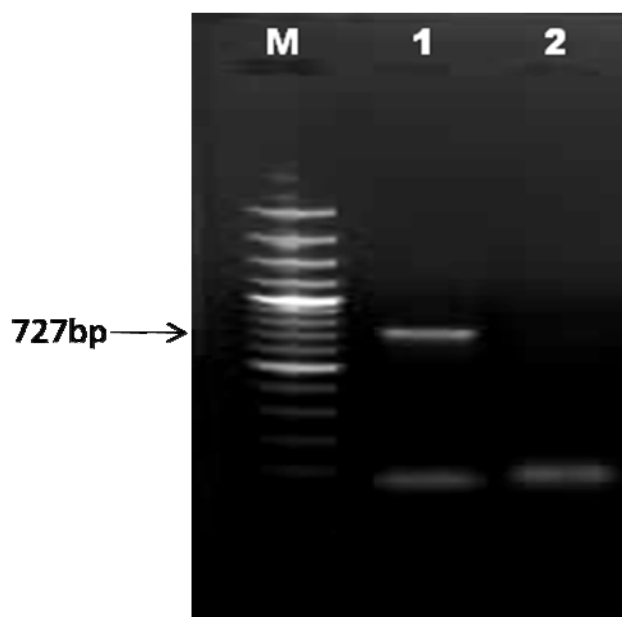
یافته‌ها

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

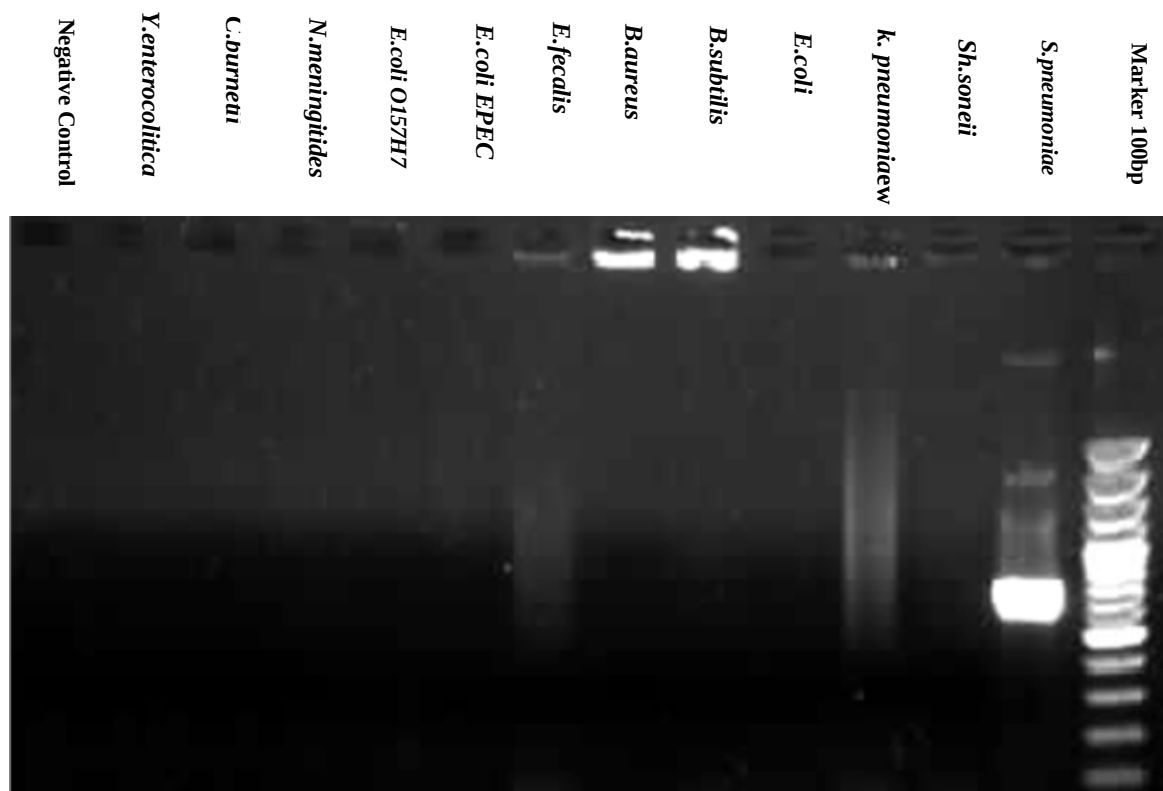
یافته‌های تعیین حساسیت واکنش نشان داد آخرین غلظت از پلاسمید *pTZ-ply* که باند مشخصی بر روی ژل آگارز ایجاد می‌کند، غلظت ۱pg است (شکل شماره ۳). با توجه به این غلظت، کمترین تعداد کپی قابل تشخیص از ژن *ply* در یک واکنش ۲۵۰، ۲۵μl کپی بوده است.

پس از اتمام واکنش تکثیر، ۵μl از محصول واکنش به همراه ۱μl از بافر لودکننده بر روی ژل آگارز ۱٪ در بافر TBE با ولتاژ ۱۰۰V، الکتروفورز شد. در نهایت، ژل آگارز حاوی رنگ اتیدیوم بروماید توسط دستگاه ژل داک بررسی گردید. جهت تهیه یک کنترل مثبت استاندارد برای تشخیص این باکتری، محصول PCR ژن *ply* در وکتور pTZ57R/T کلون شد. بدین منظور در ابتدا محصول PCR با استفاده از کیت تخلیص محصول PCR (شرکت بایونیر، کره) مطابق با دستورالعمل کیت خالص‌سازی شد، سپس واکنش اتصال میان محصول خالص‌شده و وکتور pTZ57R/T با استفاده از آنزیم *T₄DNA ligase* (شرکت فرمنتاز، لیتوانی) در شرایط ۲۲°C به مدت ۵ ساعت انجام گرفت. در ادامه، محصول واکنش اتصال به سلول‌های *E.coli JM107* که از قبل به‌وسیله $CaCl_2$ پذیرا شده بود، انتقال یافت. باکتری ترانسفورم شده در محیط Luria-Bertani Agar (LB Agar) (شرکت مرک، آلمان) حاوی ۵- برومو ۴- کلرو ۳- ایندولیل بتا گالاکتوپیرانوزید (X-gal) با غلظت ۴۰mg/ml، ایزوپروپیل بتا دی تیو گالاکتوپیرانوزید (Isopropyl-beta-D-Thiogalactopyranoside, IPTG) با غلظت ۳۸/۴mg/ml، آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین با غلظت ۱۰۰mg/ml و نالیدیکسیک اسید با غلظت ۵۰mg/ml کشت و در شرایط ۳۷°C به مدت ۱۶ ساعت انکوبه شد. در ادامه، از چند کلونی سفید و یک کلونی آبی رشد یافته بر روی محیط کشت، ماتریکس تهیه گردید. جهت ردیابی کلون‌های دارای ژن هدف، از تکنیک Colony PCR استفاده شد. پلاسمید یکی از کلونی‌های تأیید شده در مرحله قبل مطابق با دستورالعمل کیت استخراج پلاسمید (AccuPrep Plasmid Mini Extraction Kit) (شرکت بایونیر، کره) استخراج شد.

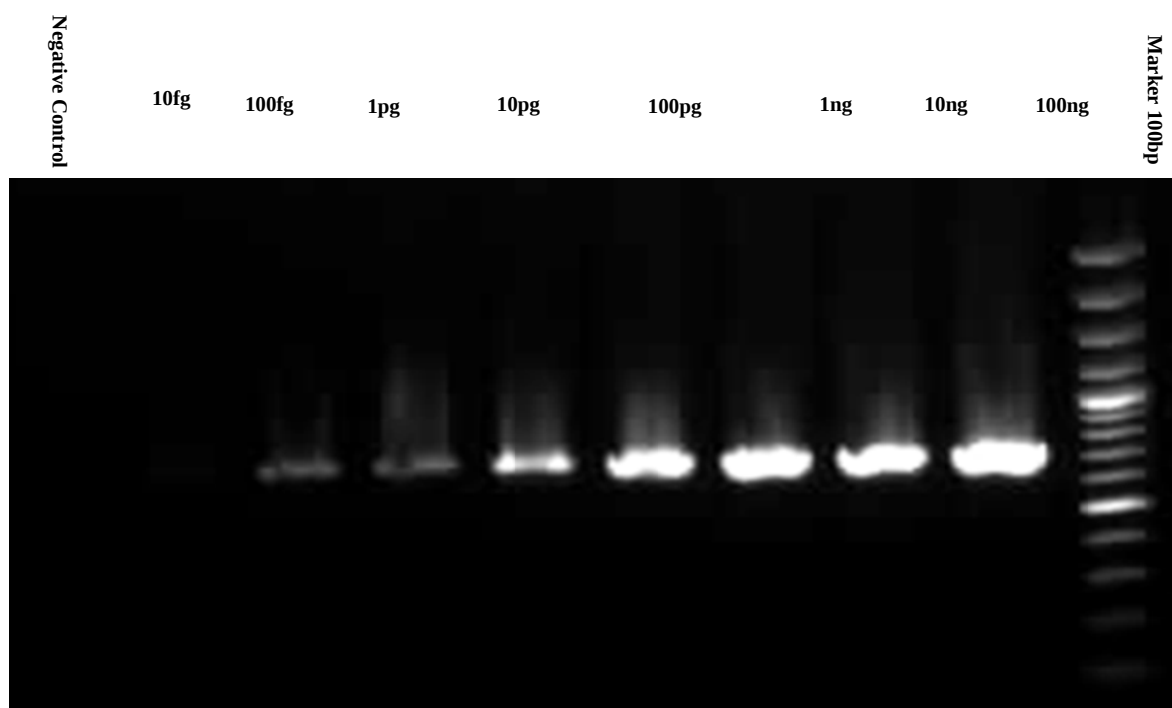
به‌منظور تأیید نهایی حضور ژن هدف در وکتور، کانستراکت پلاسمیدی مورد نظر توالی‌یابی گردید (شرکت Seq Lab). ارزیابی توالی تعیین ترادف شده به‌وسیله سرویس BLAST سایت



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



شکل شماره ۲: واکنش PCR ژن *ply* باکتری *استرپتوکوکوس نیومونیا* و ژنوم باکتری‌های کنترل منفی. باند ۷۲۷ جفت باز فقط در باکتری *استرپتوکوکوس نیومونیا* دیده می‌شود.



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

بحث

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

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

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

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

نتیجه‌گیری

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

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

تشکر و قدردانی

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

References:

- Kaijalainen T, Saukkoriipi A, Bloigu A, Herva E, Leinonen M. Real-Time Pneumolysin Polymerase Chain Reaction with Melting Curve Analysis Differentiates Pneumococcus from other [alpha]-hemolytic Streptococci. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005;53(4):293-9.
- Rintamaki S, Saukkoriipi A, Salo P, Takala A, Leinonen M. Detection of Streptococcus pneumoniae DNA by Using Polymerase Chain Reaction and Microwell Hybridization with Europium-labelled Probes. *J Microbiol Methods* 2002;50(3):313-8.
- Werno AM, Murdoch DR. Medical Microbiology: Laboratory Diagnosis of Invasive Pneumococcal Disease. *Clin Infect Dis* 2008 Mar 15;46(6):926-32.
- Carroll KC. Laboratory Diagnosis of Lower Respiratory Tract Infections: Controversy and Conundrums. *J Clin Microbiol* 2002;40(9):3115.
- Selva L, Esteva C, Gené A, de Sevilla MF, Hernandez-Bou S, Muñoz-Almagro C. Direct Detection of Streptococcus pneumoniae in Positive Blood Cultures by Real-time Polymerase Chain Reaction. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010;66(2):204-6.
- Wei CY, Kuo TBJ, Yau HY, Yeh SY, Tsai YC, Lin DY, et al. PCR Assay for the Diagnosis of Pneumococcal meningitis. *Acta Neurol Taiwan* 2003;12(1):38-42.
- Van Haeften R, Palladino S, Kay I, Keil T, Heath C, Waterer GW. A Quantitative Light Cycler PCR to Detect Streptococcus pneumoniae in Blood and CSF. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003;47(2):407-14.
- Michelow IC, Lozano J, Olsen K, Goto C, Rollins NK, Ghaffar F, et al. Diagnosis of Streptococcus pneumoniae Lower Respiratory Infection in Hospitalized Children by Culture, Polymerase Chain Reaction, Serological Testing and Urinary Antigen Detection. *Clin Infect Dis* 2002;34(1).
- Santos L, Simões J, Severo M, Vazquez J, Lecour H. Bacterial Meningitis in an Urban Area: Etiologic Study and Prognostic Factors. *Infection* 2007;35(6):406-13.
- Matos JA, Madureira DJ, Rebelo MC, Hofer CB, Barroso DE. Diagnosis of Streptococcus pneumoniae Meningitis by Polymerase Chain Reaction Amplification of the Gene for Pneumolysin. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006;101(5):559-63.
- Radstrom P, Backman A, Qian N, Kraghsbjerg P, Pahlson C, Olcen P. Detection of Bacterial DNA in Cerebrospinal Fluid by an Assay for Simultaneous Detection of Neisseria meningitidis, Haemophilus Influenzae, and Streptococci Using a Seminested PCR Strategy. *J Clin Microbiol* 1994;32(11):2738-44.

12. Morrison KE, Lake D, Crook J, Carlone GM, Ades E, Facklam R, et al. Confirmation of *psaA* in all 90 Serotypes of *Streptococcus pneumoniae* by PCR and Potential of This Assay for Identification and Diagnosis. *J Clin Microbiol* 2000;38(1):434-7.
13. Jado I, Fenoll A, Casal J, Perez A. Identification of the *psaA* Gene, Coding for Pneumococcal Surface Adhesin A, in Viridans Group *Streptococci* other than *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001;8(5):895-8.
14. Saukkoriipi A, Leskela K, Herva E, Leinonen M. *Streptococcus pneumoniae* in Nasopharyngeal Secretions of Healthy Children: Comparison of Real-time PCR and Culture from STGG-transport Medium. *Mol Cell Probes* 2004;18(3):147-53.
15. Salo P, Örtqvist Å, Leinonen M. Diagnosis of Bacteremic Pneumococcal pneumonia by Amplification of Pneumolysin Gene Fragment in Serum. *J Infect Dis* 1995;171(2):479-82.
16. Jedrzejewski MJ. Pneumococcal Virulence Factors: Structure and Function. *Microbiol Mol Biol Rev* 2001;65(2):187-207.
17. Alonso-Evelasco E, VAFM. *Streptococcus pneumoniae*: Virulence Factors, Pathogenesis and Vaccines. *Microbiol Rev* 1995;59(4):591-603.
18. Walker JA, Allen RL, Falmagne P, Johnson MK, Boulnois GJ. Molecular Cloning, Characterization, and Complete Nucleotide Sequence of the Gene for Pneumolysin, the Sulfhydryl-activated Toxin of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 1987;55(5):1184-89.
19. Chiang YC, Yang CY, Li C, Ho YC, Lin CK, Tsen HY. Identification of *Bacillus* spp, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp, *Staphylococcus* spp and *Vibrio* spp. with 16S ribosomal DNA-based Oligonucleotide Array Hybridization. *Int J Food Microbiol* 2006;107(2):131-7.
20. Weber DJ, Rutala WA. *Streptococcus pneumoniae* Infections: Microbiology, Epidemiology, Treatment, and Prevention. *Med Scape Educ* 2003.
21. Sourav S, Sharma S, Kanungo R, Jayachandran S, Prashanth K. Detection of Pneumolysin and Autolysin Genes among Antibiotic Resistant *Streptococcus pneumoniae* in Invasive Infections. *Indian J Med Microbiol* 2010;28(1):34.
22. Ragunathan L, Ramsay M, Borrow R, Guiver M, Gray S, Kaczmarski E. Clinical Features, Laboratory Findings and Management of Meningococcal Meningitis in England and Wales: Report of a 1997 Survey. *J Infect* 2000;40(1):74-9.
23. Hassan-King M, Baldeh I, Secka O, Falade A, Greenwood B. Detection of *Streptococcus pneumoniae* DNA in Blood Cultures by PCR. *J Clin Microbiol* 1994;32(7):1721-24.