

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 Adabi¹, Shahram Shahraki Zahedani², Behrouz Zeyni³

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

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

³Department 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.

مقایسه دو روش PCR مستقیم و PCR با DNA استخراج شده توس کیت برای ردیابی ژن‌های *algD*, *ExoA*, *OprL* در ایزوله‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا

حامد طهماسبی^{۱*}، جواد ادبی^۱، شهرام شهرکی زاهدانی^۲، بهروز زینی^۳

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 استخراج شده 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 *algD*, *ExoA*, *OprL* با دو روش مولکولی PCR مستقیم و PCR با استفاده از DNA استخراج شده 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 استخراج شده با کیت، حاوی ژن‌های *OprL*, *algD*, *ExoA* (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 قابل قبول در شناسایی سودوموناس آئروژینوزا دست یافت. از طرفی، در نتایج به‌دست آمده می‌توان خطای روش‌های تشخیصی فنوتیپی سودوموناس آئروژینوزا را مشاهده کرد. **کلید واژه‌ها:** سودوموناس آئروژینوزا؛ واکنش زنجیره‌ای پلیمرز؛ ژن اگزوتوکسین؛ دی ان آ.

^۱گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران.

^۲مرکز بیماری‌های عفونی - گرمسیری، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران.

^۳گروه 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

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]

مقدمه

سودوموناس ها، پاتوژن های فرصت طلبی هستند که در محیط های مختلفی یافت می شوند. این باکتری ها احتیاجات غذایی ساده ای داشته و طیف وسیعی از دما را تحمل می کنند (۱). گونه های فراوانی در این جنس قرار می گیرد که یکی از آنها سودوموناس آئروژینوزا است (۲). عفونت های سودوموناس آئروژینوزا در دستگاه تنفسی تحتانی می تواند کلونیزاسیون بدون علامت یا تراکتوبرونشیت خوش خیم تا برونکوپنومونی نکروزدهنده شدید را دربرگیرد (۳). کلونیزه شدن باکتری در مبتلایان به FC، با بیماری های زمینه ای مثل بیماری های تهاجمی پارانشیم ریه همراه است (۴). این باکتری در ایجاد ۱۱-۱۳٪ از عفونت های بیمارستانی، به ویژه در بیماران فیروز سیستمیک، اشخاص دچار سوختگی یا دارای نقص ایمنی و افرادی که هوادهی مصنوعی می شوند، نقش دارد (۵). استفاده گسترده از آنتی بیوتیک ها در سالهای اخیر موجب شده تا این باکتری نسبت به آنتی بیوتیک های وسیع الطیف از گروه های مختلف آنتی بیوتیکی مقاوم شود (۶). بنابراین، همه این موارد باعث گردیده تا شناسایی باکتری سودوموناس آئروژینوزا به عنوان یک باکتری بیمارستانی پرخطر، از اهمیت بالایی برخوردار باشد. جهت تشخیص ایزوله های سودوموناس از سایر باکتری های گرم منفی و حصول اطمینان از جنس و گونه باکتری، تست های بیوشیمیایی استاندارد انجام می شود (۷). این تست ها شامل: رشد در محیط مک کانکی 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 می باشد. این تست ها در کنار وقت گیر بودن، معمولاً با خطاهایی در تشخیص روبرو هستند؛ به طوری که در برخی موارد می توان شاهد منفی یا مثبت های کاذب بود (۹،۸). در بیشتر مواقع، شناسایی این پاتوژن که در ایجاد عفونت های بیمارستانی بسیار اهمیت دارد، با روش هایی انجام می گیرد که دارای حساسیت و ویژگی مناسبی نبوده و گاهی همراه با خطا می باشند (۱۰). البته در تشخیص این باکتری ها و بعضاً سویه های مقاوم، تست های دقیقی نیز وجود دارند که با هدف قرار دادن ژن های عامل بیماری و یا عامل مقاومت، در کنار سرعت از دقت بالایی برخوردارند، اما

به دلیل هزینه بالایی که دارند به صورت روتین قابل انجام نیستند (۱۱). از ژن های *algD*، *ExoA*، *OPrL* به علت داشتن ویژگی بالا، در تشخیص سودوموناس آئروژینوزا استفاده می شود (۹،۷).

PCR (Polymerase Chain Reaction)، یکی از حساس ترین و دقیق ترین آزمون های مولکولی بوده که می تواند برای ردیابی ژن های مختلف در نواحی خاصی از مولکول DNA، مورد استفاده قرار گیرد (۱۲،۱۳). PCR واکنشی است که به وسیله آن می توان به طور مصنوعی مولکول DNA را به صورت تک رشته تکثیر کرد (۱۴). ساز و کار این واکنش بدین صورت است که در ابتدا رشته های DNA الگو با حرارت در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد از هم جدا شده و بعد از آن با اتصال قطعات خاصی به نام پرایمر در دمایی خاص، طول سازی و در نهایت، همانند سازی از روی یکی از رشته های مورد نظر انجام می گیرد (۱۵). در PCR، مراحل سه گانه به صورت دنا تورا سیون، اتصال و طول سازی می باشد که دما و مدت زمان هر مرحله و تعداد سیکل های تکرار شونده، با هم متفاوتند (۵). با وجود دقتی که PCR (با استفاده از DNA استخراج شده) دارد، ولی در برخی موارد علاوه بر تحمل هزینه های مالی اضافی، سرعت کار را کاهش می دهد.

یکی از مراحل PCR، آماده سازی و استخراج DNA است. این کار معمولاً با روش های جوشاندن، استفاده از فنل کلروفرم و کیت های استخراج انجام می شود (۱۶). با حذف مرحله استخراج DNA می توان سرعت انجام PCR را هنگام مطالعه بر روی تعداد بسیار زیادی از نمونه ها بالا برد و از این زمان برای شناسایی بیشتر استفاده کرد (۱۷). در برخی باکتری ها از جمله *استافیلوکوک اورئوس* می توان با استفاده از روش PCR مستقیم و برداشت از کلنی های باکتریایی، مرحله استخراج DNA را حذف کرد. با توجه به اهمیت PCR برای تشخیص سریع، دقیق و کاهش هزینه تمام شده، این مطالعه با هدف مقایسه دو روش PCR با استفاده از DNA استخراج شده با کیت استخراج و PCR مستقیم انجام شد.

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی - تحلیلی طی یک دوره ۱۲ ماهه (از مهر ماه سال ۱۳۹۳ تا مهر ماه سال ۱۳۹۴)، تعداد ۳۹۱ نمونه بالینی شامل: نمونه های ادرار، خون، ترشحات زخم، خلط، لوله تراشه،

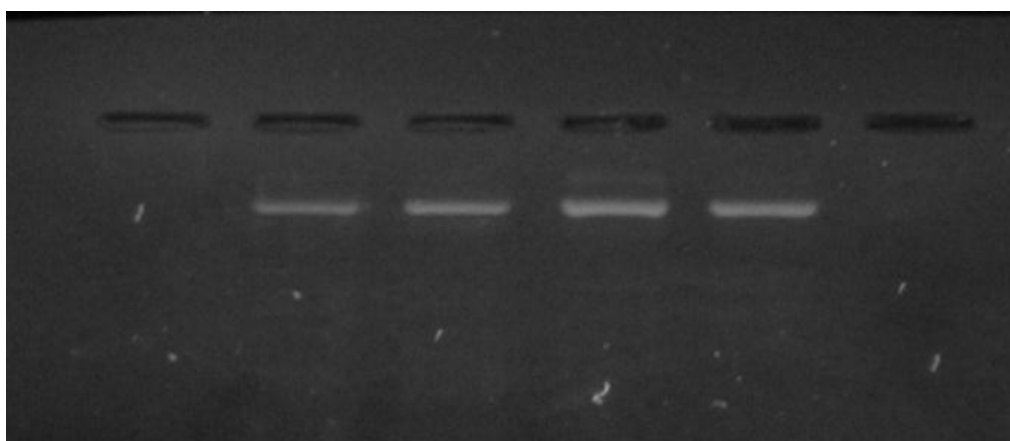
لوله سینه و سر سوند، به روش آسان و در دسترس از بیماران بستری در بخش های بیمارستان های آموزشی دانشگاه علوم پزشکی زاهدان گرفته شد. برای بررسی بیشتر، نمونه های جمع آوری شده به داخل میکروتیوب های پلاستیکی درب دار {حاوی محیط ترانسپورت BHI (Merck آلمان) با ۱۰٪ گلیسرول}، تلقیح و به آزمایشگاه میکروبی شناسی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان منتقل شدند.

برای تعیین هویت نمونه ها از نظر جنس و گونه، از کشت بر روی محیط Cetremide Agar (Merck آلمان) و گرمخانه گذاری در دمای ۴۲ درجه سانتیگراد استفاده شد. ایزوله های به دست آمده از نظر تولید آنزیم اکسیداز و تست OF، رشد در محیط های کشت TSI و سیمون سترات آگار (همگی Merck آلمان) بررسی شدند. برای تأیید نهایی، از تست های تکمیلی مانند کاتالاز، تولید H₂ و گاز، تولید رنگدانه، ایندول و متیل رد، همچنین داشتن حرکت در محیط SIM (Merck آلمان) استفاده گردید.

جهت استخراج DNA ژنومیک مراحل زیر انجام شد:

ایزوله های بالینی ذخیره شده 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 داده شده به ۵ میلی لیتر محیط کشت LB Broth (sigmaaldrich آمریکا) که قبلاً درون لوله های درب دار شیشه ای به تعداد ایزوله ها، تقسیم و شماری گذاری شده بود، تلقیح گردید و به مدت ۲۰ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد. بعد از سپری شدن زمان مورد نظر (۲۰ ساعت)، لوله ها از انکوباتور خارج شدند. در ادامه، ۱/۵ سی سی از محیط کشت حاصل، درون میکروتیوب های درب دار ۱/۵ پلاستیکی 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 DNA های استخراج شده، ابتدا با رقت سازی DNA های استخراج شده، OD آنها قرائت گردید، همچنین محصولات DNA به میزان ۵ لاند بعد از ترکیب با Loading dye (Thermofisher آمریکا) بر روی ژل آگارز ۱٪ لود شدند (شکل شماره ۱). DNA های حاصل تا زمان انجام آزمایش PCR، در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد ذخیره سازی شدند (۱۱).



شکل شماره ۱: کیفیت سنجی و تأیید استخراج DNA، به وسیله کیت استخراج.

جدول شماره ۱. مشخصات پرایمرهای مورد استفاده برای شناسایی ژن های *algD*, *ExoA*, *OprL* در ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا

رفرنس	ژن های مورد نظر	توالی پرایمرهای مورد استفاده	طول ژن (bp)
Rashno Taeه و همکاران (۹)	<i>exoA</i>	GACAACGCCCTCAGCATCACCAGC CGCTGGCCCATTCGCTCCAGCGCT	۳۹۶bp
Rashno Taeه و همکاران (۹)	<i>oprL</i>	ATGGAAATGCTGAAATTCGGC CTTCTTCAGCTCGACGCGACG	۵۰۴bp
Rashno Taeه و همکاران (۹)	<i>algD</i>	TTCCCTCGCAGAGAAAACATC CCTGGTTGATCAGGTGCATCT	۵۲۰bp

چند گانه آن، از کلنی تازه باکتری به صورت کشت‌های ۲۴ ساعته 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 آگارز ۱٪، الکتروفورز گردید. هنگام تهیه ژل به آن، ۵ میکرولیتر محلول Gel Red (Biotium آمریکا) اضافه شد. نتیجه نهایی به وسیله دستگاه Gel Documentation system CCD (مدل CCD-Tab1 کیازن ایران)، بررسی و از آن عکس تهیه گردید. از مارکر ۱۰۰bp فرمتاز (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 به دست آمده نیز از واکنش PCR با استفاده از DNA استخراج شده با کیت، استفاده گردید. در هر دو روش مورد استفاده؛ ژن‌های *algD*، *ExoA*، *OPrL* 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 مشاهده شده در روش PCR با استفاده از DNA استخراج شده با کیت، کاملاً واضح و پررنگ بود (شکل شماره ۴-۲). در روش PCR مستقیم، کیفیت باندها با توجه به روش اول، نسبتاً قابل قبول 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 فوتویی تعیین هویت شدند، با روش PCR با استفاده از DNA استخراج شده با کیت، ژن‌های *algD*، *ExoA*، *OPrL* به ترتیب در ۹۶/۴۷٪، ۹۵/۲۹٪ و ۹۵/۲۹٪ ایزوله مشاهده شدند (جدول شماره ۳).

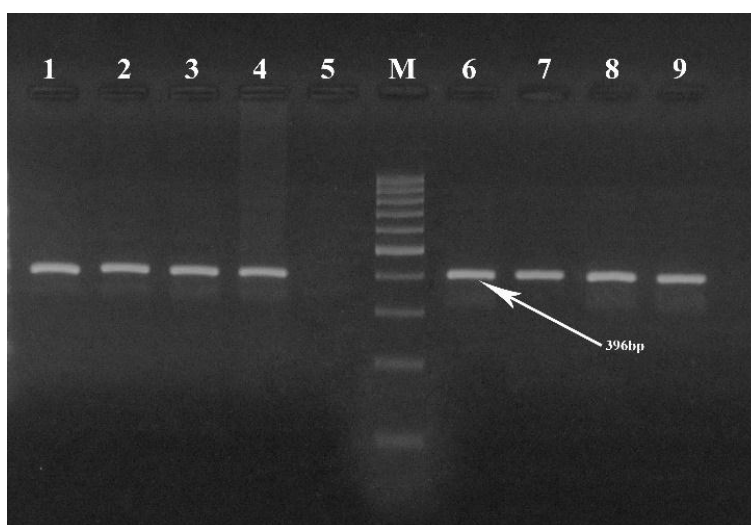
جهت انجام واکنش PCR، ۲۵ میکرولیتر از محلول نهایی شامل: ۱ میکرولیتر از DNA الگو، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر با غلظت ۱۰ پیکومولار و ۱۲/۵ میکرولیتر از Master Mix 2x (Ampliqon آلمان) (شامل: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ، Tris-Hcl PH8.5، unit 0/2، MmdNTP 4/4، 3mM MgCl_2 ، 0.2% Tween20 (Insert red dye and stabilizer، Ampliqon polymerase استفاده شد. برای رساندن به حجم نهایی، از آب مقطر دیونیزه استفاده گردید. از مخلوط PCR فاقد DNA الگو نیز به عنوان کنترل منفی استفاده شد (۱۴). سپس آزمون PCR برای ژن‌ها *algD*، *ExoA*، *OPrL* با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (BioRad آمریکا) شامل: دناتوراسیون اولیه در ۹۶ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه، ۴۰ سیکل دناتوراسیون در دمای ۹۶ درجه به مدت یک دقیقه، مرحله اتصال پرایمر در دمای ۵۵ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه و تکثیر قطعه هدف در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه برای ژن *exoA*، دناتوراسیون اولیه در ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه، ۴۰ سیکل دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه به مدت ۴۰ ثانیه، مرحله اتصال پرایمر در دمای ۵۷ درجه سانتیگراد به مدت ۴۰ 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 یک دقیقه، ۳۰ سیکل دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه به مدت یک دقیقه، مرحله اتصال پرایمر در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه و تکثیر قطعه هدف در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه 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 داده شده با فیلدوپلاتین برداشته شد و داخل میکس آماده شده تلقیح گردید. برای بهتر حل شدن کلنی، به مدت ۱۰ ثانیه میکس نهایی ورتکس شد. برای آماده سازی میکس نهایی، حجم نهایی مطابق با روش اول به ۲۵ میکرولیتر 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.

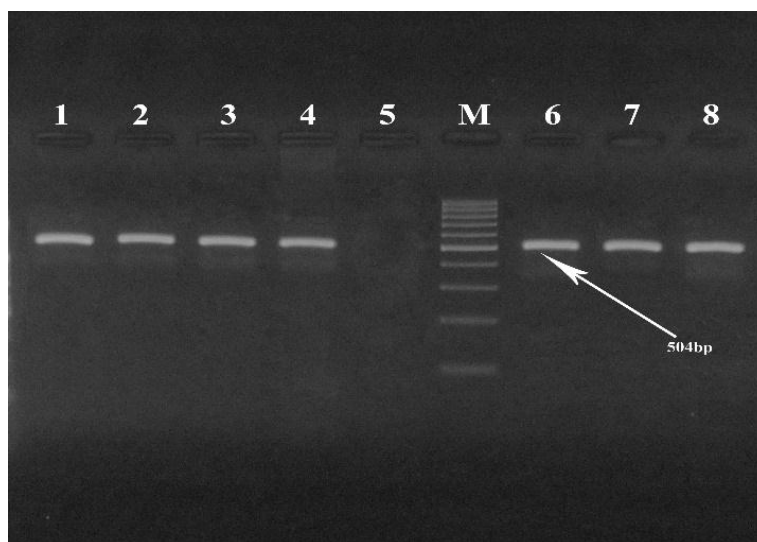
در روش PCR مستقیم؛ به جای استخراج DNA و انجام مراحل

جدول شماره ۳: نتایج به دست آمده از دو روش PCR با استفاده از DNA استخراج شده به وسیله کیت استخراج و PCR مستقیم در نمونه‌های بالینی سودوموناس آنروژینوزا

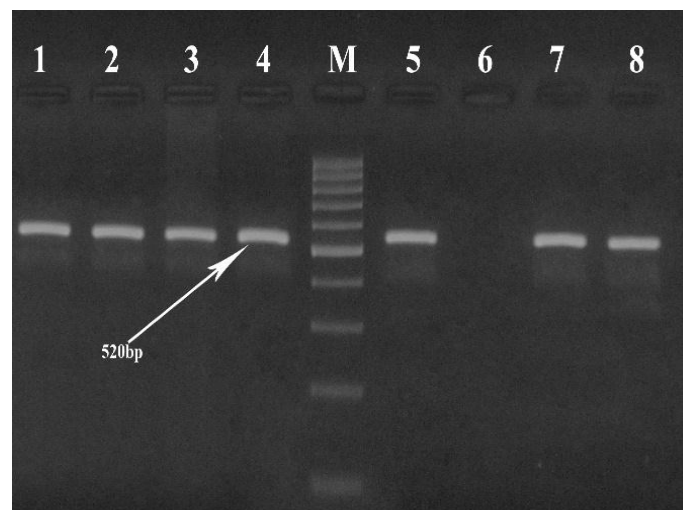
باکتری			نوع آزمایش PCR
سودوموناس آنروژینوزا (به روش فنوتیپی) (n=۸۵)			
تعداد (درصد)			
<i>algD</i>	<i>oprL</i>	<i>exoA</i>	PCR با استفاده از DNA استخراج شده
(۸۱/۹۵/۲۹)٪	(۸۲/۹۶/۴۷)٪	(۸۱/۹۵/۲۹)٪	PCR مستقیم
(۷۹/۹۲/۹۴)٪	(۸۱/۹۵/۲۹)٪	(۸۰/۹۴/۱۱)٪	



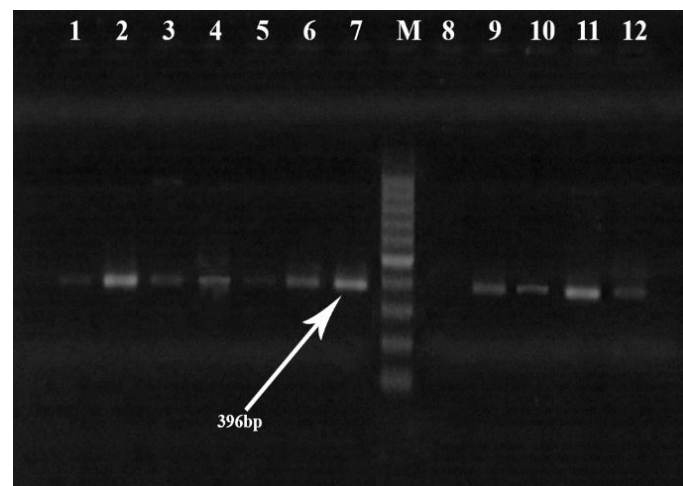
شکل شماره ۲: ژل الکتروفورز ۱/۵٪ محصولات ژن *exoA* با اندازه ۳۹۶ جفت باز در نمونه‌های بالینی سودوموناس آنروژینوزا با روش PCR با استفاده از کیت استخراج؛ چاهک M مارکر مولکولی مورد استفاده با طول ۱۰۰ جفت باز، چاهک‌های ۹ - نمونه‌های مثبت از نظر ژن *exoA*. چاهک ۵ کنترل منفی؛ چاهک ۶ کنترل مثبت.



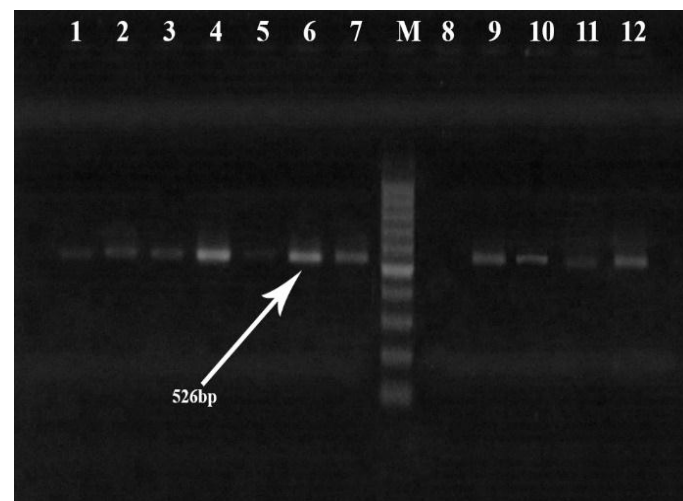
شکل شماره ۳: ژل الکتروفورز ۱/۵٪ محصولات ژن *oprL* با اندازه ۵۰۴ جفت باز در نمونه‌های بالینی سودوموناس آنروژینوزا با روش PCR با استفاده از کیت استخراج. چاهک M مارکر مولکولی مورد استفاده با طول ۱۰۰ جفت باز. چاهک‌های ۱ - ۸ نمونه‌های مثبت از نظر ژن *oprL*؛ چاهک ۵، کنترل منفی؛ چاهک ۶، کنترل مثبت.



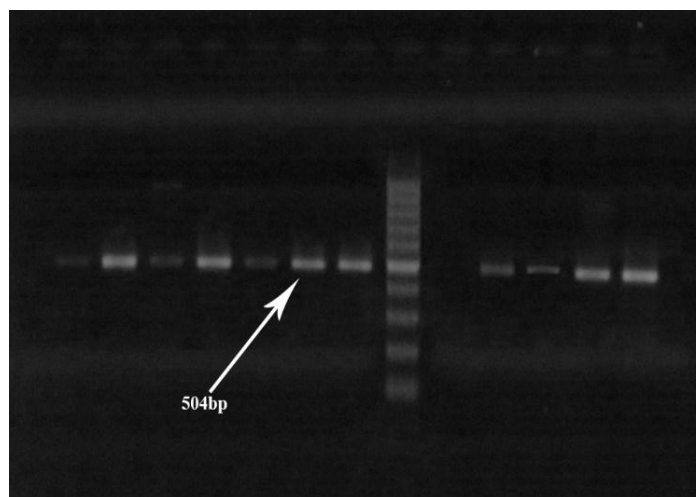
شکل شماره ۴: ژل الکتروفورز ۱/۵٪ محصولات ژن *algD* با اندازه ۵۲۰ جفت باز در نمونه‌های بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* با روش PCR با استفاده از کیت استخراج. چاهک M، مارکر مولکولی مورد استفاده با طول ۱۰۰ جفت باز؛ چاهک‌های ۱-۸ نمونه‌های مثبت از نظر ژن *algD*؛ چاهک ۵، کنترل مثبت؛ چاهک ۶، کنترل منفی.



شکل شماره ۵: ژل الکتروفورز ۱/۵٪ محصولات ژن *exoA* با اندازه ۳۹۶ جفت باز در نمونه‌های بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* با روش PCR مستقیم. چاهک M، مارکر مولکولی مورد استفاده با طول ۱۰۰ جفت باز؛ چاهک‌های ۱-۹ نمونه‌های مثبت از نظر ژن *exoA*؛ چاهک ۵، کنترل منفی؛ چاهک ۶، کنترل مثبت.



شکل شماره ۶: ژل الکتروفورز ۱/۵٪ محصولات ژن *algD* با اندازه ۵۲۶ 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 ۱-۹ نمونه‌های مثبت از نظر ژن *algD*؛ چاهک ۵، کنترل منفی؛ چاهک ۶، کنترل مثبت.



شکل شماره ۷: ژل الکتروفورز ۱/۵٪ محصولات ژن *oprL* با اندازه ۵۰۴ جفت باز در نمونه های بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* با روش PCR با استفاده از کیت استخراج چاهک M، مارکر مولکولی مورد استفاده با طول ۱۰۰ جفت باز؛ چاهک های ۹-۱ نمونه های مثبت از نظر ژن *oprL*؛ چاهک ۵، کنترل منفی؛ چاهک ۶، کنترل مثبت.

بحث

تشخیص باکتری های عامل بیماری و در کنار آن، مشخص کردن مقاومت آنتی بیوتیکی آنها می تواند در امر درمان و کنترل مصرف دارو بسیار مهم باشد. از این رو برای دست یافتن به یک تشخیص مطمئن و به صرفه، باید از روش های حساس استفاده کرد. یکی از بهترین و سریع ترین روش های ممکن برای این کار، شناسایی ژن های کد کننده این عوامل بوده که با حساسیت بسیار بالا و میزان خطای اندک، تشخیص را قابل اطمینان می کند (۱۸). با PCR می توان ژن های مورد نظر را بررسی کرد که بدین ترتیب اطلاعات دقیقی از نظر مولکولی در اختیار محقق قرار می گیرد. این روش به علت داشتن حساسیت و ویژگی بسیار بالا، نسبت به روش های قدیمی در شناسایی خصوصیات میکروارگانیسم ها، از سرعت خوبی برخوردار است (۱۹، ۲۰). این در حالی است که با افزایش روزافزون سویه های مقاوم در ایزوله های *سودوموناس آئروژینوزا*، به خصوص سویه های مولد ESBL، AmpC و تهدیدبرانگیز بودن آن در مقابل درمان، برای تشخیص سریع و جلوگیری از گسترش سویه های مقاوم، باید به روش های سریع و قابل اطمینان روی آورد (۱۹). با استفاده از روش های فنوتیپی و سرولوژیکال نمی توان عوامل ایجاد کننده عفونت های وابسته به *سودوموناس آئروژینوزا* مقاوم به درمان را به سرعت تشخیص داد و عامل پاتوژن را از بین برد (۲۰). با مشخص کردن ویژگی های ذاتی یا اکتسابی باکتری بیماری زا از جمله داشتن مقاومت به آنتی بیوتیک و تولید توکسین های خطرناک می توان در کمترین

زمان ممکن با تجویز مناسب ترین دارو در مناسب ترین دوز ممکن، علاوه بر درمان به موقع و کاهش خطر ناشی از عفونت، از بروز مقاومت های گسترده به دلیل تشخیص غلط و تجویز اشتباه نیز جلوگیری کرد (۲۱). اگرچه PCR یک روش ساده، آسان و در دسترس برای تکثیر ژنوم می باشد، اما به استخراج DNA که یک مرحله وقت گیر است، نیاز دارد. برای رسیدن به بهترین کیفیت و کمیت در فرآیند PCR، باید کیفیت DNA استخراجی را مدنظر قرار داد تا به بهترین تکثیر از قطعه مورد نظر دست یافت (۲۲). از این رو برای استخراج PCR، روش های متفاوتی از جمله جوشاندن، فیل کلروفرم، رسوب با اتانول، استفاده از دترجنت ها و استفاده از کیت های استخراج وجود دارد (۲۳). هریک از این روش ها در کنار وقت گیر بودن و تحمیل هزینه جانبی، دارای مشکلات و معایب زیادی نیز هستند (۱۶). روش فیل کلروفرم علاوه بر کند بودن آن، به دلیل ماده سمی و خطرناک بودن این ماده، یک روش غیرایمن بوده و کار کردن با آن در طولانی مدت باعث بروز مشکلاتی می شود (۲۴). روش رسوب با اتانول نیز می تواند 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 می کند (۲۲). روش جوشاندن نیز با داشتن شاخصه وقت گیر بودن، کیفیت نسبتاً پایینی را از DNA استخراج شده عرضه می کند (۲۵). نتایجی که در این بررسی به دست آمد گرچه برای برخی ژن ها از نظر کیفی شفافیت باندها پایین بود، اما از نظر کمی اختلاف بسیار کمی با نتایج به دست آمده از PCR با استفاده از DNA

احسنی و همکاران (سال ۱۳۹۱)، در مطالعه خود نشان دادند می توان از روش PCR مستقیم برای مطالعه بر روی ژن های عامل توکسین در کلستریدیوم دیفیسیل استفاده کرد. در این مطالعه مشخص گردید کیفیت باندهای به دست آمده در این روش با کیفیت باندهای حاصل در روش PCR با استفاده از DNA استخراج شده، کاملاً برابر است (۲۲). همچنین نتایج سایر تحقیقات نشان داده است روش PCR مستقیم علاوه بر اینکه در مطالعات باکتریایی قابل استفاده است در مطالعات غیرباکتریایی نیز می تواند کاربرد داشته باشد. به طوری که مطالعه Nishimura و همکاران (سال ۲۰۰۹)، نشان داد RT-PCR مستقیم از اختصاصیت و حساسیت مناسبی برای شناسایی نروویروس ها برخوردار بوده و حتی می شود از این روش برای بررسی حضور نروویروس در مدفوع استفاده کرد (۳۰). علاوه بر پروکاریوت ها، PCR مستقیم در یوکاریوت ها نیز مورد بررسی قرار گرفته است. در مطالعه فولادی و همکاران (سال ۱۳۸۶)، به بررسی مقایسه دو روش PCR مستقیم و سایر روش ها برای تشخیص لیشرمانیوز جلدی پرداخته شد. در کنار مطالعات فوق، همچنین تحقیق حاضر، عدم بررسی این روش در سایر باکتری ها با ساختارهای متفاوت و الگوی های منحصر به فرد، دیده می شود.

نتیجه گیری

با توجه به وقت گیر بودن مراحل استخراج DNA و پرهزینه بودن برخی کیت های استخراج DNA، همچنین وقت گیر بودن این کار برای بررسی نمونه ها در حجم بالا (با توجه به مراحل چندگانه استخراج)، استفاده از روش PCR مستقیم می تواند بسیار مفید باشد. علاوه بر این، در برخی روش های 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 قابل قبولی که این روش نسبت به روش PCR با DNA استخراج شده دارد، توصیه می گردد در مواردی که قطعیت آنها اثبات شده، از کلنی مستقیم برای انجام آزمایش های PCR استفاده شود.

استخراج شده با کیت داشت. با مقایسه نتایج حاصل از PCR مستقیم و روش فنوتیپی با روش معمول PCR که به عنوان گلد استاندارد در نظر گرفته شد، روش های فنوتیپی دارای خطای تشخیصی بودند. اما در کنار این موارد، برای تکثیر ژن های باکتریایی می توان بدون انجام استخراج DNA و با استفاده از کلنی های تازه کشت داده و تلقیح آنها در میکس نهایی، به نتایج قابل قبولی 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 توکسین های این باکتری می تواند مورد استفاده قرار گیرد و با در نظر گرفتن ارزش تشخیصی مناسب، مشخص کردند این روش در کنار روش هایی مانند ELISA و تزریق یک دوز کشنده توکسین به موش، دارای سرعت، دقت و ارزش اخباری قابل قبولی است (۲۵). Hiroshi Nakao و همکاران (سال ۱۹۹۷) نیز در یک مطالعه بر روی توکسین های دیفتری با استفاده از PCR مستقیم، مشخص کردند این روش دارای حساسیت قابل قبولی برای تشخیص سم دیفتری بوده و می توان به وسیله آن نمونه های 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، نشان دهنده تطابق این روش با روش مبتنی بر استخراج DNA بود و باندهای به دست آمده در هر دو روش تقریباً یکسان و قابل استناد بودند (۲۷). Inglis و همکاران (سال ۲۰۰۳) با استفاده از PCR مستقیم، ردیابی مولکولی گونه های کمپیلوباکتر را مورد بررسی قرار دادند (۲۸). van Hal و همکاران (سال ۲۰۰۷) نیز با مطالعه مولکولی بر روی استافیلوکوک ها مقاوم به متی سیلین نشان دادند روش PCR مستقیم می تواند یک روش مناسب در تشخیص این باکتری باشد. به طوری که حساسیت و ویژگی این روش در کنار کاهش قابل ملاحظه بار مالی، بیش از ۸۰٪ گزارش شد (۲۹). مطالعات مشابه انجام شده در ایران نیز مؤید این امر است که می توان با حذف مرحله استخراج و استفاده مستقیم از کلنی باکتری، سرعت کار را بالا برد و دقت را از دست نداد.

تشکر و قدردانی

دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، به‌خصوص خانم سپهری‌راد که
کمال همکاری را با گروه محقق این پژوهش داشتند، به عمل
می‌آورند.

بدین وسیله نویسندگان این مقاله مراتب تشکر و سپاس خود
را از مسئولین مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی - گرمسیری

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 opportunist. *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 Tae 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.

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.