

روش Multiplex PCR برای شناسایی سریع و حساس سودوموناس آئروژینوزا

Multiplex PCR assay for rapid and sensitive identification of *Pseudomonas aeruginosa* subtypes

زهره موسیوند^۱، حسین کمال الدینی^{۱*}، فاطمه حدادی^۱، محمدیوسف علیخانی^۲

۱- به ترتیب دانش آموخته کارشناسی ارشد، استادیاران، دانشگاه زابل، زابل، ایران

۲- دانشیار، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

Mosivand Z¹, Kamaladini H^{*1}, Haddadi F¹, Alikhani MY²

1- Graduate MSc Student, Assistance Professors, University of zabol, Zabol, Iran

2- Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Hamadan
University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: h.kamaladini@uoz.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۴/۱۰/۲۱ - تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۰/۲۶)

چکیده

سودوموناس آئروژینوزا (*Pseudomonas aeruginosa*) از مهم‌ترین عوامل مرگ و میر ناشی از عفونت‌های بیمارستانی می‌باشد. با توجه به تنوع ژنتیکی بالای باکتری سودوموناس آئروژینوزا روش‌های واکنش زنجیره‌ای پلیمرز متکی بر استفاده از یک ژن روش قابل اعتمادی در شناسایی این باکتری نمی‌باشد. هدف از این مطالعه بررسی کارایی Multiplex-PCR در شناسایی سودوموناس آئروژینوزا است. بهینه‌سازی Multiplex PCR و بررسی اختصاصیت و حساسیت آن با استفاده از سه ژن اختصاصی سودوموناس آئروژینوزا (*oprI*، *oprL* و *16s rDNA*) صورت پذیرفت. محصولات ۱۷۲، ۲۵۶ و ۹۵۶ جفت‌بازی توسط آغازگرها تکثیر شد. این روش دارای حساسیتی در حد ۸۰ نسخه از ژنوم هدف بوده و با DNA میکروارگانیزم‌های دیگر، امپلیکون ناخواسته‌ای مشاهده نشد. نتایج حاصله از این مطالعه مشخص می‌کند که این روش مولکولی در مقایسه با روش‌های RCR که در آن‌ها از یک ژن در تشخیص آلودگی سودوموناس آئروژینوزا استفاده می‌شود از حساسیت و اختصاصیت بالایی برخوردار می‌باشد. در مقایسه با آزمون بیوشیمیایی، روش MultiplexPCR سریع‌تر بوده و هم‌چنین به دلیل استفاده از سه ژن یک روش قابل اعتماد را برای شناسایی سودوموناس آئروژینوزا فراهم می‌کند.

واژه‌های کلیدی

تشخیص مولکولی

ژن *16s rDNA*

ژن *oprI*

ژن *oprL*

سودوموناس آئروژینوزا

تکنیک‌هایی مبتنی بر روش PCR و یا نشانگرهای ویژه نوکلئوتیدی می‌تواند به کار گرفته شود (Tafvizi et al. 2012). بسیاری از روش‌های تشخیصی بر اساس PCR برای شناسایی سودوموناس آئروژینوزا توسعه یافته‌اند (Motoshima et al. 2007)، با این حال بسیاری از دستورالعمل‌ها تنها یک ژن هدف را شناسایی می‌کنند که روش شناسایی جامع و قابل اعتمادی برای شناسایی سودوموناس آئروژینوزا نیست (McCulloch et al. 2011)، زیرا گونه سودوموناس آئروژینوزا گرفته شده از بیماران تنوع ژنوتیپی بالایی را نشان می‌دهد و چندین مطالعه عدم حضور یک یا چند ژن بیماری‌زا را در برخی از سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا تایید کرده‌اند (Bradbury et al. 2010). برای غلبه بر این مشکلات چندین دستورالعمل Multiplex PCR مانند Universal Primer-Multiplex-PCR گزارش شده است (Xu et al. 2012)، اما با توجه به مبادلات ژنتیکی بین سودوموناس آئروژینوزا و باکتری‌های مرتبط نزدیک به آن اغلب Multiplex PCR اختصاصیت پایینی دارد، بنابراین نیاز به طراحی Multiplex PCR جامع و قابل اعتماد برای تایید تشخیص سودوموناس آئروژینوزا وجود دارد. این مطالعه به بهینه‌سازی Multiplex PCR با هدف قرار دادن سه ژن اختصاصی سودوموناس آئروژینوزا (*oprI*، *oprL* و *16s rDNA*) به‌طور هم-زمان برای شناسایی جامع و تایید تشخیص سودوموناس آئروژینوزا می‌پردازد و هم‌چنین بررسی اختصاصیت و حساسیت Multiplex PCR در شناسایی سودوموناس آئروژینوزا مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. در این مطالعه از استرین‌های استاندارد فهرست شده در جدول ۱ استفاده شد.

جدول ۱- مشخصات استرین‌ها مورد استفاده.

بakteri	استرین	کنترل
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> -	ATCC 25922	+
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212	-
<i>Acinetobacter baumannii</i>	ATCC19606	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228	-

سودوموناس آئروژینوزا (*Pseudomonas aeruginosa*) یکی از مهم‌ترین پاتوژن‌های فرصت‌طلبی است که اغلب منجر به عفونت‌های بیمارستانی خطرناکی در افراد با سیستم ایمنی ضعیف می‌شود و سومین عامل عفونت‌های بیمارستانی بعد از استافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylococcus aureus*) و اشرشیاکلی (*Escherichia coli*) می‌باشد (Arvanitidou et al. 2010; Mirsalehian et al. 2005). این پاتوژن طیف گسترده‌ای از عفونت‌های بیمارستانی مانند عفونت زخم سوختگی، ذات‌الریه و عفونت‌های ادراری را ایجاد می‌کند (Doosti et al. 2012)، احتمال بهبودی عفونت‌های حاصل از این باکتری در صورت تشخیص و درمان سریع وجود دارد، اما در عفونت‌های مزمن هیچ آنتی بیوتیکی قادر به از بین بردن باکتری نمی‌باشد (Langton and Smyth 2009). غالباً شناسایی ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا با روش‌های فنوتیپی و بر اساس خصوصیات فیزیولوژیک آن‌ها صورت می‌گیرد. هرچند که به دلیل توانایی سازگاری با محیط‌ها و میزبان‌های متفاوت، تنوع ژنوتیپی زیادی در این باکتری وجود دارد که منجر به واکنش‌های فنوتیپی غیر معمول و در نتیجه تشخیص همراه با خطا در روش‌های فنوتیپی می‌شود (Finnan et al. 2004; Qin et al. 2003; Spilker et al. 2014).

ژن‌های کد کننده پروتئین‌های ویژه غشای خارجی از جمله لیپوپروتئین I (*oprI*) و لیپوپروتئین غشای خارجی مرتبط با پپتیدوگلیکان (*oprL*) از جمله ژن‌هایی هستند که می‌توان در تشخیص سودوموناس آئروژینوزا استفاده نمود و این دو ژن در مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری نقش دارند. *oprI* لیپوپروتئینی با وزن مولکولی کم است که به وفور در غشای خارجی جنس باکتری سودوموناس وجود دارد و برای شناسایی این جنس به کار می‌رود. *oprL* که پروتئین H2 نیز نامیده می‌شود، توسط زنجیره‌های آسیل چرب به صورت کووالان به پپتیدوگلیکان متصل شده و برای شناسایی گونه سودوموناس آئروژینوزا به کار می‌رود (Mashouf et al. 2008). از نقطه نظر عملی به کارگیری نشانگرهای الیگونوکلئوتیدی ویژه توالی‌های ژن (*16s rDNA*)، یکی از بهترین گزینه‌ها جهت شناسایی باکتری‌ها بر اساس خصوصیات فیلوژنتیکی است و به عنوان یک روش قابل اطمینان جهت شناسایی در بسیاری از گونه‌های باکتریایی توسط

استخراج شده با غلظت نهایی ۲۰ ng/μL و PCR RedMaster mix (2X) (هر تیوب حاوی ۰/۸ میلی مولار MgCl₂ و ۰/۲ میلی-مولار dNTPs و ۵ پیکومولار از هر آغازگر و یک واحد آنزیم Taq polymerase) انجام شد. توالی آغازگرهای اختصاصی مورد استفاده در جدول ۲ ذکر شده است. شرایط بهینه واکنش Multiplex PCR برای شناسایی سودوموناس آئروژینوزا طبق جدول ۳ می باشد. برای به دست آوردن بهترین دمای اتصال آغازگرها واکنش Multiplex PCR شیب دمایی انجام گرفت. برای بررسی تکثیر اختصاصی آغازگرهای طراحی شده استرین‌های استاندارد *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterococcus faecalis* و *Staphylococcus epidermidis* به عنوان کنترل منفی مورد مطالعه قرار گرفتند. تعیین حساسیت به دو روش شمارش کلونی و غلظت DNA صورت گرفت. برای تعیین تعداد باکتری در نمونه به روش شمارش کلونی^۱، یک کلونی ایزوله در ارلن حاوی ۵۰ میلی لیتر از محیط کشت نوترینت مایع که شامل پتون، عصاره گوشت و مخمر، کلرید سدیم، تلقیح شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در شیکر انکوباتور قرار گرفت.

¹ colony-forming units (CFU)

توالی کامل ژن‌های *oprL* (GI: Z50191.1)، *oprI* (GI: AB037545) و *16s rDNA* (GI: X58714.1) از پایگاه اطلاعاتی NCBI به دست آمد. ارزیابی مشخصات آغازگرهای طراحی شده با استفاده از نرم افزار IDT dna و بررسی اختصاصیت هر جفت آغازگرها در قسمت blast پایگاه اطلاعاتی NCBI صورت پذیرفت. استخراج DNA به روش Boilling انجام گرفت. ابتدا یک میلی لیتر از محیط کشت مایع حاوی باکتری داخل تیوب ۱/۵ ریخته شد، تیوب به مدت ۲ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۲۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد. رسوب تیوب در یک میلی لیتر بافر فسفات سالین (PBS) حل شد. تیوب به مدت یک دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۲۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد، در ادامه مرحله قبل تکرار و محلول رویی دور ریخته شد و رسوب در ۱۰۰ میکرو لیتر آب مقطر حل شد. تیوب در Thermomixer در دمای ۹۸ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد و سپس به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول رویی که حاوی DNA می باشد به تیوب جدید منتقل شد و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. تعیین غلظت‌های DNA با روش تعیین دانسیته نوری (OD) و میزان جذب در ۲۶۰ نانومتر به وسیله اسپکتروفتومتری با جذب نور ماورابنفش انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم ۲۵ میکرو لیتر شامل DNA

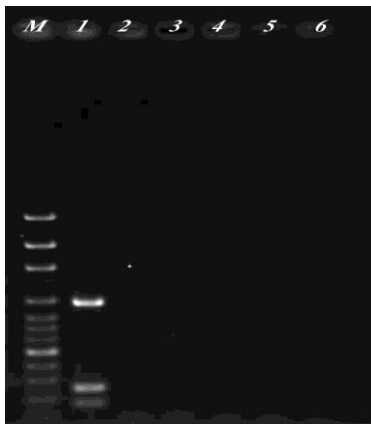
جدول ۲- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در واکنش Multiplex PCR.

اندازه محصول PCR	توالی آغازگر	آغازگر	ژن
bp ۲۵۶	5'TAGTGCTGGAAGGCCACACCGA3'	Forward	OPRL
	5'AGGAACGTCAGGACACGCAGGT3'	Reverse	
bp ۱۷۲	5'AAACCGAAGCTCGTCTGACCGC3'	Forward	OPRI
	5'TTGCGGCTGGCTTTTCCAGCA3'	Reverse	
bp ۹۵۶	5'GGGGGATCTTCGGACCTCA3'	Forward	16s rDNA
	5'TCCTTAGAGTGCCACCCG3'	Reverse	

جدول ۳- برنامه PCR-MP.

تکرار	زمان (ثانیه)	دما (درجه سانتی گراد)	مرحله
۱	۲۴۰	۹۴	pre-denaturation
۳۴ چرخه	۶۰	۹۴	Denaturation
	۴۵	۶۲	Annealing
	۳۰	۷۲	Extension
۱	۴۲۰	۷۲	Final extension

دیگر شامل اشیریشیا کلی، استافیلوکوکوس اورئوس، اسپیتوباکتر بومانی، انتروکوکوس فکالیس و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس با سه جفت آغازگر مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این بررسی‌ها مشخص نمود که آغازگرهای انتخاب شده به‌طور اختصاصی قادر به تشخیص عامل سودوموناس آئروژینوزا می‌باشد.

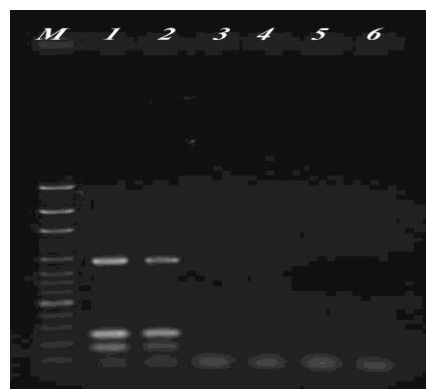


شکل ۱- ارزیابی تکثیر اختصاصی ژن‌های *oprI*، *oprL*، *16s rDNA*، M- DNA سایز مارکر، ۱- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853، ۲- *Escherichia coli* (کنترل منفی)، ۳- *Staphylococcus aureus* (کنترل منفی)، ۴- *Staphylococcus epidermidis* (کنترل منفی)، ۵- *Acinetobacter baumannii* (کنترل منفی)، ۶- *Enterococcus faecalis* (کنترل منفی).

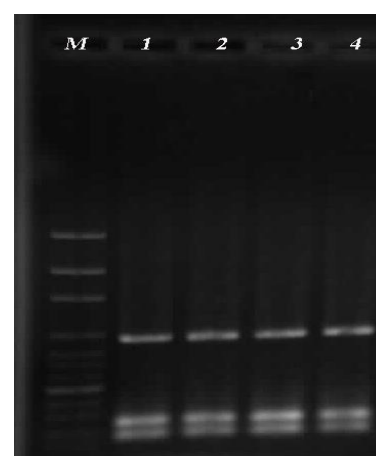
برای تعیین حساسیت آغازگرهای طراحی شده به روش غلظت DNA میزان ژنوم باکتری سودوموناس آئروژینوزا از غلظت اولیه $100 \text{ ng}/\mu\text{L}$ به ترتیب رقیق شده و واکنش PCR انجام شد و تا غلظت $10 \text{ ng}/\mu\text{L}$ باند 256 bp ، 172 ، 96 bp مشاهده شد (شکل ۲). در چاهک شماره ۳ که غلظت به $1 \text{ ng}/\mu\text{L}$ رسید هیچ بانده مشاهده نشد. شمارش کلونی در 0.2 ، $\text{OD}_{600 \text{ nm}}$ برابر با $4 \times 10^4 \text{ CFU}/\text{mL}$ به دست آمد. تکثیر قطعه مورد نظر توسط واکنش PCR تا رقت 10^{-4} از محیط کشت باکتری انجام شده در این رقت CFU/mL برابر با 4×10^4 محاسبه شد. با توجه به این- که $2 \mu\text{L}$ از محیط کشت در واکنش PCR استفاده شد، در این رقت تعداد باکتری برابر $80 \text{ CFU}/\text{mL}$ می‌باشد که نشان‌دهنده حساسیت واکنش برحسب تعداد باکتری است. با توجه به دوز عفونی سودوموناس آئروژینوزا با این روش می‌توان قبل از ایجاد بیماری نسبت به شناسایی آن اقدام نمود.

۱۰ لوله حاوی 900 میکرولیتر محیط مایع استریل تهیه شد و 100 میکرولیتر از کشت باکتری به لوله اول اضافه شد. پس از مخلوط کردن، مقدار 100 میکرولیتر از این لوله به لوله دوم و به همین طریق تا لوله ۱۰ ادامه یافت. هم‌زمان با تهیه رقت، مقدار 200 میکرولیتر از هر رقت به پتری دیش‌های حاوی محیط کشت نوترینت جامد اضافه شده و کاملاً در سطح محیط پخش و در دمای 37 درجه سانتی‌گراد در طول شب قرار گرفتند. پس از رشد کامل، پتری دیش‌های واجد 30 تا 300 کلونی شمارش و تعداد پرگنه تشکیل شده در هر دیش در فاکتور رقت (معکوس ضریب رقت) ضرب و نتیجه به‌عنوان شمارش CFU در یک میلی‌لیتر نمونه منظور شد. آزمایش سه بار تکرار شد. از هر کدام از 10 رقت تهیه شده دو میکرولیتر به واکنش PCR حاوی آغازگرهای اختصاصی اضافه و در دمای اتصال 62 درجه سانتی-گراد آزمون شد. حساسیت واکنش Multiplex PCR با استفاده از غلظت ژنوم استخراج شده با روش اسپکتروفتومتری در طول موج 260 نانومتر اندازه‌گیری شد، سپس غلظت‌های مختلفی از ژنوم باکتری *P.aeruginosa* از $100 \text{ ng}/\mu\text{L}$ - 0.1 تهیه شد. در نهایت با این رقت‌ها واکنش PCR انجام گرفت و نتایج تکثیر بررسی شد. آغازگرها و قطعات انتخاب شده جهت PCR توسط نرم‌افزار IDTdna (<https://eu.idtdna.com>) مورد بررسی قرار گرفتند و سه جفت آغازگر جهت تکثیر قطعه مورد نظر طراحی و کیفیت آن‌ها در الکتروفورز با ژل آگارز بررسی و تایید شد. عملکرد و تکثیر اختصاصی جفت آغازگرها قبل از مخلوط کردن آن‌ها برای انجام Multiplex PCR بررسی شد. قطعات مورد انتظار 172 ، 96 و 256 جفت‌باز مربوط به ژن‌های *oprI*، *oprL*، *16s rDNA* حاصل شد، سپس مخلوط آغازگرها برای انجام Multiplex PCR مورد استفاده قرار گرفت و نتایج وجود این سه ژن در باکتری سودوموناس آئروژینوزا تایید و مشخص شد که دمای بهینه اتصال برای انجام این واکنش 62 سانتی‌گراد می‌باشد. نتایج حاصل از Multiplex PCR باکتری سودوموناس آئروژینوزا و باکتری‌های استفاده شده به‌عنوان کنترل در شکل ۱ آورده شده‌است. نتایج، تکثیر قطعات مورد نظر را تنها در سودوموناس آئروژینوزا نشان داد و هیچ بانده برای باکتری‌های کنترل مشاهده نشد. نمونه ژنوم باکتری‌های استاندارد سودوموناس آئروژینوزا، همراه با گونه‌های

در تعیین حساسیت آغازگرهای طراحی شده ژن *16S rDNA* به روش شمارش کلونی، میانگین تعداد باکتری‌ها در $OD_{600} \times 10^2$ برابر با 10^4 CFU/mL به دست آمد. پس از تهیه زنجیره رقت نسبت به میزان حساسیت واکنش اقدام شد. همان‌گونه که در شکل ۴ مشاهده می‌شود تکثیر قطعه مورد نظر توسط واکنش PCR تا رقت پنجم از محیط کشت باکتری انجام شده است که در این رقت تعداد باکتری‌های واکنش PCR برابر 10^4 CFU/mL می‌باشد. واکنش Multiplex PCR با استفاده از ژنوم استخراج شده از هشت نمونه کلینی که با تست‌های بیوشیمیایی جنس و گونه آن‌ها تایید شده بود، انجام شد. در هر هشت نمونه سویه سودوموناس آئروژینوزا سه قطعه ژن‌های *oprL*، *oprI* و *16S rDNA* تکثیر شد (شکل ۳).



شکل ۲- تعیین حساسیت آغازگرهای اختصاصی ژن‌های *oprL*، *oprI* و *16S rDNA* با Multiplex PCR در غلظت‌های مختلف DNA ژنومی. M- DNA سایز مارکر، ۱- $100 \text{ ng/}\mu\text{L}$ ، ۲- $10 \text{ ng/}\mu\text{L}$ ، ۳- $1 \text{ ng/}\mu\text{L}$ ، ۴- $0.1 \text{ ng/}\mu\text{L}$ ، ۵- $0.01 \text{ ng/}\mu\text{L}$ ، ۶- $0.001 \text{ ng/}\mu\text{L}$.



شکل ۳- ژل الکتروفورز واکنش Multiplex PCR با استفاده از نمونه‌های کلینی، M- DNA سایز مارکر، ۱، ۲، ۳، ۴- نمونه‌های کلینی

استفاده از چندین ژن هدف برای شناسایی یک میکروارگانیسم، ضریب اطمینان را در ارایه نتایج افزایش خواهد داد (Aslani et al. 2011). بسیاری از محققان می‌کوشند تا اختصاصیت PCR را برای شناسایی سودوموناس آئروژینوزا افزایش دهند، اما به دلیل محدودیت‌های مختلف از جمله تنوع ژنتیکی و در دسترس نبودن توالی ژنومی گونه‌های نزدیک، یک روش شناسایی جامع و قطعی هنوز وجود ندارد. در شناسایی سودوموناس آئروژینوزا با استفاده از PCR دو ژن *oprL* و *toxA* درصد شناسایی از طریق بررسی حضور *oprL* بیش‌تر از ژن *toxA* گزارش شد (Xu et al. 2004). تشخیص سودوموناس آئروژینوزا بر اساس ژن *toxA* دارای حساسیت کمتری است که به معنای وجود جواب منفی کاذب می‌باشد، این امر به این دلیل است که برخی سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا (حدود پنج درصد) فاقد این ژن هستند که بیانگر بالا بودن تنوع ژنوتیپی این باکتری است و تشخیص‌های مولکولی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. در یک پژوهش با استفاده از روش Multiplex PCR و سه ژن هدف *algD*، *chitA* و *16S rDNA* شناسایی سودوموناس آئروژینوزا در بیماران تنفسی مورد بررسی قرار گرفت که نتایج حاکی از این بود که با استفاده از روش Multiplex PCR، ۷۸/۷ درصد از نمونه‌ها مثبت بودند در حالی‌که با استفاده از کشت ۵۰ درصد از نمونه‌ها مثبت بود (Da Silva et al. 2004). روش Multiplex PCR برای تشخیص سریع و حساس سودوموناس آئروژینوزا از نمونه‌های بیوپسی پوست سوخته با تکثیر هم‌زمان دو ژن لیپوپروتئین *oprL* و *oprI* استفاده شده است (Mashouf et al. 2008). همچنین برای تشخیص سودوموناس آئروژینوزا از دو ژن *oprL* و *16S rDNA* استفاده شده که حساسیت PCR بر اساس ژن *oprL* ۹۲ درصد و *16S rDNA* ۱۰۰ درصد گزارش شده است (Hassan et al. 2012). برای تشخیص سودوموناس آئروژینوزا ترکیبی از چهار ژن (*16S rDNA*، *gyrB*، *oprL* and *ETA*) در روش Multiplex PCR برای تشخیص جامع سودوموناس که قابل اجرا برای غربالگری عفونت زخم بود ارایه شد (Salman et al. 2013). با توجه به مطالعه‌ای دیگر ژن *ETA* تنها در ۸۳ درصد از نمونه‌ها قابل تشخیص بود، واکنش real time PCR اختصاصیت کمتر ژن *algD* و *ETA* در مقایسه با *oprL* را تایید کردند (Aslani et al.

سودوموناس آئروژینوزا گزارش شد (De Vosn et al. 1997). با توجه به اینکه جنس سودوموناس بر اساس ژن *oprI* تایید می‌شود می‌تواند گزینه‌ی مناسب در انتخاب ژن در واکنش Multiplex PCR باشد. به دلیل احتمال حضور پروتئین‌های مشابه با دو پروتئین غشایی *oprI* و *oprL* در سایر باکتری‌ها روش‌های تشخیص بر اساس این دو ژن ۱۰۰ درصد اختصاصی نمی‌باشد. بر این اساس در تحقیق حاضر از دو ژن *oprI* و *oprL* به همراه ژن *16S rDNA* برای افزایش اختصاصیت استفاده شد. استفاده هم-زمان از سه ژن *oprI*، *oprL* و *16S rDNA* حساسیت و اختصاصیت کافی برای تشخیص صحیح سودوموناس آئروژینوزا را فراهم می‌آورد. هم‌چنین به دلیل استفاده از Multiplex PCR این روش نسبت به روش‌های متداول سریع‌تر می‌باشد.

(2011). اختصاصیت کمتر ژن *ETA* و *algD* در مقایسه *oprI* به-وسیله دیگر محققین گزارش شده‌است (Da Silva Filho et al. 2004)، بنابراین در این مطالعه ژن *ETA* حذف شد و هم‌چنین برای تایید جنس سودوموناس ژن *oprI* مورد مطالعه قرار گرفت. در این تحقیق سه ژن بسیار اختصاصی سودوموناس آئروژینوزا انتخاب شد و واکنش Multiplex PCR برای شناسایی جامع و قابل اعتماد با تکثیر اختصاصی ۱۰۰ درصد، به دلیل استفاده از سه ژن اختصاصی *oprI*، *oprL* و *16S rDNA* و طراحی آغازگرهای اختصاصی و عدم تکثیر در ژنوم باکتری‌های کنترل منفی، انجام شد. اختصاصیت هر سه ژن در مطالعات مختلف به‌طور جداگانه گزارش شده‌است، تکثیر اختصاصی ۹۶/۵ درصد برای ژن *16S rDNA* در روش real time PCR (Deschaght et al. 2010) و تکثیر اختصاصی بر اساس PCR ژن *oprL* برای شناسایی

منابع

Arvanitidou M, Katikaridou E, Douboyas J and Tsakris, A (2005) Prognostic factors for nosocomial bacteraemia outcome: a prospective study in a Greek teaching hospital. *Journal of Hospital Infection* 61: 219-224.

Aslani MM, Sharafi Z, Shahcheraghi F, Nikbin VS, Ebrahimipour G and Hashemipour, M (2011) Molecular detection and identification of virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from wound and burn infections. *Pajoohandeh Journal* 15: 287-292.

Bradbury RS, Roddam LF, Merritt A, Reid DW and Champion AC (2010) Virulence gene distribution in clinical, nosocomial and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of medical microbiology* 59: 881-890.

Da Silva Filho LV, Tateno AF, Velloso Ld, Levi JE, Fernandes S, Bento CN, Rodrigues JC and Ramos SR (2004) Identification of *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* complex, and *Stenotrophomonas maltophilia* in respiratory samples from cystic fibrosis patients using multiplex PCR. *Pediatric pulmonology* 37: 537-547.

De Vosn D, Lim A, Pirnay JP, Struelens M, Vandenvelde C, Duinslaeger L, Vanderkelen A and Cornelis P (1997) 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*. *Journal of clinical microbiology* 35: 1295-1299.

Deschaght P, Schelstraete P, dos Santos Santiago GL, Van Simaey L, Haerynck F, De Wachter E, Malfroot A, Lebecque P, Knoop C and Casimir, G (2010) Comparison of culture and qPCR for the detection of *Pseudomonas*

aeruginosa in not chronically infected cystic fibrosis patients. *BMC microbiology* 10: 245.

Doosti M, Faghihi MHO, Ramazani A and Saini MR (2012) Comparison of Conventional Culture Methods and Polymerase Chain Reaction (PCR) for Specific Detection of *Pseudomonas Aeruginosa*. *Journal of Isfahan Medical School* 30(192).

Finnan S, Morrissey JP, Ogara F and Boyd EF (2004) Genome diversity of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients and the hospital environment. *Journal of clinical microbiology* 42: 5783-5792.

Hassan KI, Rafik SA and Mussum K (2012) Molecular identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Hospitals in Kurdistan region. *Journal of Advanced Medical Research* 2: 90-98.

Langton Hewer SC and Smyth AR (2009) Antibiotic strategies for eradicating *Pseudomonas aeruginosa* in people with cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev* 4.

Mashouf RY, Zamani A and Farahani HS (2008) Diagnostic multiplex polymerase chain reaction assay for the identification of *Pseudomonas aeruginosa* from the skin biopsy specimens in burn wound infections and detection of antibiotic susceptibility. *Saudi medical journal* 29: 1109-1114.

McCulloch E, Lucas C, Ramage G and Williams C (2011) Improved early diagnosis of *Pseudomonas aeruginosa* by real-time PCR to prevent chronic colonisation in a paediatric cystic fibrosis population. *Journal of Cystic Fibrosis* 10: 21-24.

Mirsalehian A, Feizabadi M, Nakhjavani FA, Jabalameli F, Goli H and Kalantari N (2010) Detection of VEB-1, OXA-10 and PER-1 genotypes in extended-spectrum lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients. *Burns* 36: 70-74.

Motoshima M, Yanagihara K, Fukushima K, Matsuda J, Sugahara K, Hirakata Y, Yamada Y, Kohno S and Kamihira, S (2007) Rapid and accurate detection of *Pseudomonas aeruginosa* by real-time polymerase chain reaction with melting curve analysis targeting *gyrB* gene. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 58: 53-58.

Qin X, Emerson J, Stapp J, Stapp L, Abe P and Burns JL (2003) Use of real-time PCR with multiple targets to identify *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermenting gram-negative bacilli from patients with cystic fibrosis. *Journal of clinical microbiology* 41: 4312-4317.

Salman M, Ali A and Haque A (2013) A novel multiplex PCR for detection of *Pseudomonas aeruginosa*: A major cause of wound infections. *Pakistan journal of medical sciences* 29: 957.

Spilker T, Coenye T, Vandamme P and LiPuma JJ (2004) PCR-based assay for differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from cystic fibrosis patients. *Journal of clinical microbiology* 42: 2074-2079.

Tafvizi F, Tajabadi Ebrahimi M and Khojare L (2012) Genotypic and Phylogenic Analysis of *Lactobacilli* Producing Bacteriocin Isolated from Traditional Dairy Products and Food. *Journal of Fasa University of Medical Sciences* 2: 84-90.

Xu J, Moore JE, Murphy PG, Millar BC and Elborn JS (2004) Early detection of *Pseudomonas aeruginosa* - comparison of conventional versus molecular (PCR) detection directly from adult patients with cystic fibrosis (CF). *Annals of clinical microbiology and antimicrobials* 3: 21.

Xu W, Zhai Z, Huang K, Zhang N, Yuan Y, Shang Y, and Luo Y (2012) A novel universal primer-multiplex-PCR method with sequencing gel electrophoresis analysis. *PLoS One* 7: e22900.