ژنتیک نوین
دوره دوازدهم، شماره ۱، بهار ۱۳۹۶
صفحه ۱۵۵ - ۱۴۹

روش Multiplex PCR برای شناسایی سریع و حساس سودوموناس آئروژینوزا

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

زهرا موسیوند[۱]، حسین کمال الدینی*[۱]، فاطمه حدادی[۱]، محمدیوسف علیخانی[۲]

۱- به‌ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، استادیاران، دانشگاه زابل، زابل، ایران
۲- دانشیار، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

Mosivand Z[1], Kamaladini H[*1], Haddadi F[1], Alikhani MY[2]

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 پلیمراز متکی بر استفاده از یک ژن روش قابل اعتمادی در شناسایی این باکتری نمی‌باشد. هدف ازاین مطالعه بررسی کارآیی Multiplex-PCR در شناسایی سودوموناس آئروژینوزا است. بهینه‌سازی Multiplex PCR و بررسی اختصاصیت و حساسیت آن با استفاده از سه ژن اختصاصی سودوموناس آئروژینوزا (*oprL*، *oprI* 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 میکروارگانیسم‌های 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 سودوموناس‌آئروژینوزا استفاده می‌شود از حساسیت و اختصاصیت بالایی برخوردار می‌باشد. در مقایسه با آزمون بیوشیمیایی، روش MultiplexPCR سریع‌تر بوده و هم‌چنین به‌دلیل 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

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-29]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.1.16.6]

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. 2005; Mirsalehian et al. 2010). 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 به‌دلیل 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. 2014; Qin et al. 2003; Spilker et al. 2004).

ژن‌های کد کننده پروتئین‌های ویژه غشای خارجی از جمله لیپوپروتئینI (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 به‌صورت کووالان به پپتیدوگلیکان متصل شده و برای شناسایی گونه سودوموناس آئروژینوزا به کار می‌رود (Mashouf et al. 2008). از نقطه‌نظر عملی به‌کارگیری نشانگرهای الیگونوکلئوتیدی ویژه توالی‌های ژن (*16S rDNA*)، یکی از بهترین گزینه‌ها جهت شناسایی باکتری‌ها بر اساس خصوصیات فیلوژنتیکی است و به‌عنوان یک روش قابل‌اطمینان جهت شناسایی در بسیاری از گونه‌های باکتریایی توسط 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 سودوموناس‌آئروژینوزا توسعه‌یافته‌اند (Motoshima et al. 2007)، با این‌حال بسیاری از دستورالعمل‌ها تنها یک ژن هدف را شناسایی می‌کنند که روش شناسایی جامع و قابل اعتمادی برای شناسایی سودوموناس‌آئروژینوزا نیست (McCulloch et al. 2011)، زیرا گونه سودوموناس آئروژینوزا گرفته‌شده از بیماران تنوع ژنوتیپی بالایی را نشان می‌دهد و چندین مطالعه عدم حضور یک یا چند ژن بیماری‌زا را در برخی از سویه‌های سودوموناس‌آئروژینوزا تایید کرده‌اند (Bradbury et al. 2010). برای غلبه بر این مشکلات چندین دستورالعمل Multiplex PCR مانند Universal Primer-Multiplex-PCR گزارش شده‌است (Xu et al. 2012)، اما با توجه به مبادلات ژنتیکی بین سودوموناس‌آئروژینوزا و باکتری‌های مرتبط نزدیک به آن اغلب Multiplex PCR اختصاصیت پایینی دارد، بنابراین نیاز به طراحی Multiplex PCR جامع و قابل‌اعتماد برای تایید تشخیص سودوموناس‌آئروژینوزا وجود دارد. این مطالعه به بهینه‌سازی Multiplex PCR با هدف قرار دادن سه ژن اختصاصی سودوموناس‌آئروژینوزا (*oprL*، *oprI* و *16s rDNA*) به‌طور هم‌زمان برای شناسایی جامع و تایید تشخیص سودوموناس آئروژینوزا می‌پردازد و هم‌چنین بررسی اختصاصیت و حساسیت Multiplex PCR در شناسایی سودوموناس‌آئروژینوزا مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. در این مطالعه از استرین‌های استاندارد فهرست شده در جدول ۱ استفاده شد.

جدول ۱- مشخصات استرین‌ها مورد استفاده.

باکتری	استرین	کنترل
Pseudomonas aeruginosa	ATCC 25922	+
Escherichia coli	ATCC 25922	-
Staphylococcus aureus	ATCC 25923	-
Enterococcus faecalis	ATCC 29212	-
Acinetobacter baumannii	ATCC19606	-
Staphylococcus epidermidis	ATCC 12228	-

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-29]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.1.16.6]

توالی کامل ژن‌های *oprL* (GI: Z50191.1)، *oprI* (GI: X58714.1) و *16s rDNA* (GI: AB037545) از پایگاه اطلاعاتی NCBI به‌دست آمد. ارزیابی مشخصات آغازگرهای طراحی‌شده با استفاده از نرم‌افزار IDTdna و بررسی اختصاصیت هر جفت آغازگرها در قسمت blast پایگاه اطلاعاتی NCBI صورت پذیرفت. استخراج DNA به‌روش Boilling انجام گرفت. ابتدا یک میلی‌لیتر 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 ۲٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. رسوب تیوب در یک میلی‌لیتر بافرفسفات سالین (PBS) حل شد. تیوب به مدت یک دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۲٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد، در ادامه مرحله قبل تکرار و محلول رویی دور ریخته شد و رسوب در ۱۰۰ میکرولیتر آب‌مقطر حل شد. تیوب در Thermomixer در دمای ۹۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد و سپس به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱٤۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول رویی که حاوی DNA می‌باشد به تیوب جدید منتقل شد و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. تعیین غلظت‌های DNA با روش تعیین دانسیته نوری (OD) و میزان جذب در ۲٦۰ نانومتر به‌وسیله اسپکتروفتومتری با جذب نور ماورابنفش انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل DNA استخراج‌شده با غلظت نهایی ۲۰ng/µL و PCR RedMaster mix(2X) (هر تیوب حاوی ۰/۸ میلی‌مولار $MgCl_2$ و ۰/۲ میلی‌مولار dNTPs و ۵ پیکومولار از هر آغازگر و یک واحد آنزیم Taq polymerase) انجام شد. توالی آغازگرهای اختصاصی مورداستفاده در جدول ۲ ذکر شده‌است. شرایط بهینه واکنش Multiplex PCR برای شناسایی سودوموناس‌آئروژینوزا طبق جدول ۳ می‌باشد. برای به‌دست آوردن بهترین دمای اتصال آغازگرها واکنش Multiplex PCR شیب دمایی انجام گرفت. برای بررسی تکثیر اختصاصی آغازگرهای طراحی‌شده استرین‌های استاندارد *Escherichia coli*، *Staphylococcus aureus*، *Enterococcus faecalis*، *Acinetobacter baumannii*، *Staphylococcus epidermidis* به‌عنوان 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[1]، یک کلونی ایزوله در ارلن حاوی ۵۰ میلی‌لیتر از محیط کشت نوترینت مایع که شامل پتون، عصاره گوشت و مخمر، کلرید سدیم، تلقیح شده و به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در شیکر انکوباتور قرار گرفت.

[1] colony-forming units (CFU)

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

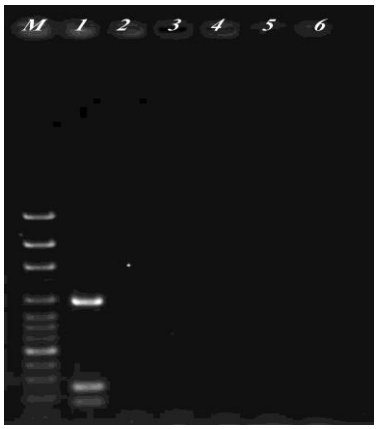
ژن	آغازگر	توالی آغازگر	اندازه محصول PCR
OPRL	Forward	5'TAGTGCTGGAAGGCCACACCGA3'	bp۲۵٦
	Reverse	5'AGGAACGTCAGGACACGCAGGT3'	
OPRI	Forward	5'AAACCGAAGCTCGTCTGACCGC3'	bp۱۷۲
	Reverse	5'TTGCGGCTGGCTTTTTCCAGCA3'	
16s rDNA	Forward	5'GGGGGATCTTCGGACCTCA3'	bp۹۵٦
	Reverse	5'TCCTTAGAGTGCCCACCCG3'	

جدول ۳- برنامه MP- PCR.

مرحله	دما (درجه سانتی‌گراد)	زمان(ثانیه)	تکرار
pre-denaturation	۹٤	۲٤۰	۱
Denaturation	۹٤	٦۰	۳٤ چرخه
Annealing	٦۲	٤۵	
Extension	۷۲	۳۰	
Final extension	۷۲	٤۲۰	۱

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-29]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.1.16.6]

۱۰ لوله حاوی ۹۰۰ میکرولیتر محیط مایع استریل تهیه شد و ۱۰۰ میکرولیتر از کشت باکتری به لوله اول اضافه شد. پس از مخلوط کردن، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از این لوله به لوله دوم و به همین طریق تا لوله ۱۰ ادامه یافت. هم‌زمان با تهیه رقت، مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از هر رقت به پتری دیش‌های حاوی محیط کشت نوترینت جامد اضافه‌شده و کاملاً در سطح محیط پخش و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در طول شب قرار گرفتند. پس از رشد کامل، پتری دیش‌های واجد ۳۰ تا ۳۰۰ 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 هرکدام از ۱۰ رقت تهیه شده دو میکرولیتر به واکنش PCR حاوی آغازگرهای اختصاصی اضافه و در دمای اتصال ٦٢ درجه سانتی-گراد آزمون شد. حساسیت واکنش Multiplex PCR با استفاده از غلظت ژنوم استخراج شده با روش اسپکتروفتومتری در طول موج ٢٦٠ نانومتر اندازه‌گیری شد، سپس غلظت‌های مختلفی از ژنوم باکتری *P.aeruginosa* از ۱۰۰ng/µL– ۰/۱ تهیه شد. در نهایت با این رقت‌ها واکنش PCR انجام گرفت و نتایج تکثیر بررسی شد. آغازگرها و قطعات انتخاب‌شده جهت PCR توسط نرم‌افزار IDTdna (https://eu.idtdna.com) موردبررسی قرار گرفتند و سه جفت آغازگر جهت تکثیر قطعه موردنظر 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 ۱۷۲، ۲٥٦ و ۹٥٦ جفت‌باز مربوط به ژن‌های *oprL* ، *oprI*، *16s rDNA* حاصل شد، سپس مخلوط آغازگرها برای انجام Multiplex PCR مورد استفاده قرار گرفت و نتایج وجود این سه ژن در باکتری سودوموناس‌آئروژینوزا تایید و مشخص شد که دمای بهینه اتصال برای انجام این واکنش ٦٢ سانتی‌گراد می‌باشد. نتایج حاصل از Muliplex PCR باکتری سودوموناس‌آئروژینوزا و باکتری‌های استفاده شده به‌عنوان کنترل در شکل ۱ آورده شده‌است. نتایج، تکثیر قطعات مورد نظر را تنها در سودوموناس‌آئروژینوزا نشان داد و هیچ باندی برای باکتری‌های کنترل مشاهده نشد. نمونه ژنوم باکتری‌های استاندارد سودوموناس‌آئروژینوزا، همراه با گونه‌های دیگر شامل اشریشیا کلی، استافیلوکوکوس اورئوس، اسینتوباکتر 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 سودوموناس‌آئروژینوزا می‌باشد.

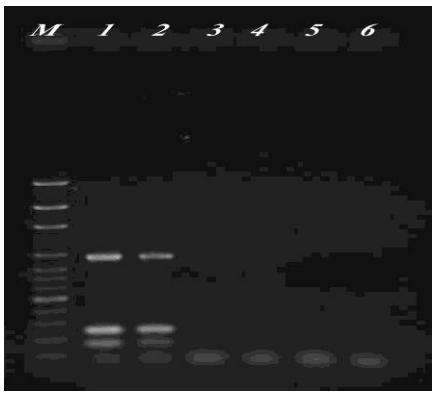


شکل ۱- ارزیابی تکثیر اختصاصی ژن‌های oprL، oprI، 16s rDNA. M- DNA سایز مارکر، ۱- Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853، ۲- Escherichia coli (کنترل منفی)، ۳- Staphylococcus aureus (کنترل منفی)، ٤- Staphylococcus epidermidis (کنترل منفی)، ٥- Acinetobacter baumannii (کنترل منفی)، ٦- Enterococcus faecalis (کنترل منفی).

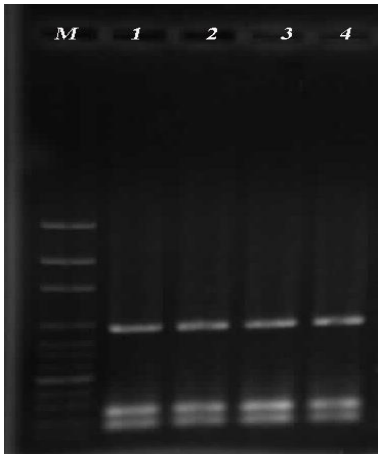
برای تعیین حساسیت آغازگرهای طراحی‌شده به روش غلظت DNA میزان ژنوم باکتری سودوموناس‌آئروژینوزا از غلظت اولیه ۱۰۰ng/µL به‌ترتیب رقیق شده و واکنش PCR انجام شد و تا غلظت ۱۰ng/µL باند ۲٥٦bp، ۱۷۲، ۹٥٦ مشاهده شد (شکل ۲). در چاهک شماره ۳ که غلظت به ۱ng/µL رسید هیچ باندی مشاهده نشد. شمارش کلونی در ۰/۲ OD_{600} nm, برابر با 4×10^{8}CFU/mL به‌دست 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 ۲µL از محیط کشت در واکنش PCR استفاده شد، در این رقت تعداد باکتری برابر CFU/mL ۸۰ می‌باشد که نشان‌دهنده حساسیت واکنش برحسب تعداد باکتری است. با توجه به دوز عفونی سودوموناس‌آئروژینوزا با این روش می‌توان قبل از ایجاد بیماری نسبت به شناسایی آن اقدام نمود.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-29]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.1.16.6]

در تعیین حساسیت آغازگرهای طراحی‌شده ژن *16s rDNA* به روش شمارش کلونی، میانگین تعداد باکتری‌ها در ۰/۲ OD600 nm, برابر با ٤×۱۰^۸CFU/mL به‌دست آمد. پس از تهیه زنجیره رقت نسبت به میزان حساسیت واکنش اقدام شد. همان‌گونه که در شکل٤ مشاهده می‌شود تکثیر قطعه مورد نظر توسط واکنش PCR تا رقت پنجم از محیط کشت باکتری انجام شده‌است که در این رقت تعداد باکتری‌های واکنش PCR برابر CFU/mL ۸ می‌باشد. واکنش Multiplex PCR با استفاده از ژنوم استخراج شده از هشت نمونه کلینیکی 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، 16s rDNA با Multiplex PCR در غلظت‌های مختلف DNA ژنومی. M- DNA سایز مارکر، ۱- ۱۰۰ ng/µL، ۲- ۱۰ ng/µL ۳-۱ ng/µL، ٤-۰/۱ ng/µL، ٥- ۰/۰۱ ng/µL، ٦-۰ Lng/µL.



شکل ۳- ژل الکتروفورز واکنش Multiplex PCR با استفاده از نمونه‌های کلینیکی، M- DNA سایزمارکر، ۱،۲،۳،٤- نمونه‌های کلینیکی

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 به‌دلیل 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 سودوموناس‌آئروژینوزا 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 سودوموناس‌آئروژینوزا 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 سودوموناس‌آئروژینوزا (حدود پنج درصد) فاقد این ژن هستند که بیانگر بالا بودن تنوع ژنوتیپی این باکتری است وتشخیص‌های مولکولی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. در یک پژوهش با استفاده از روش Multiplex PCR و سه ژن هدف *algD*، *chit A* 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 سودوموناس‌آئروژینوزا از نمونه‌های بیوپسی پوست سوخته با تکثیر هم‌زمان دو ژن لیپوپروتئین *oprL* و *oprI* استفاده شده‌است (Mashouf et al. 2008). همچنین برای تشخیص سودوموناس‌آئروژینوزا از دو ژن *oprL* و *16S rDNA* استفاده شده که حساسیت PCR بر اساس ژن *oprL* ۹۲ درصد و *16S rDNA* ۱۰۰ درصد گزارش شده‌است (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.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-29]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.1.16.6]

2011). اختصاصیت کمتر ژن *ETA* و *algD* در مقایسه *oprl* به‌وسیله 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 *oprL*، *oprI* 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 سودوموناس آئروژینوزا گزارش شد (De Vosn et al. 1997). با توجه به اینکه جنس سووموناس بر اساس ژن *oprI* تایید می‌شود می‌تواند گزینه‌ی مناسب در انتخاب ژن در واکنش Multiplex PCR باشد. به‌دلیل احتمال حضور پروتئین‌های مشابه با دو پروتئین غشایی *oprL* و *oprI* در سایر باکتری‌ها روش‌های تشخیص بر اساس این دو ژن ۱۰۰درصد اختصاصی نمی‌باشد. بر این اساس در تحقیق حاضر از دو ژن *oprL* و *oprI* به‌همراه ژن *16S rDNA* برای افزایش اختصاصیت استفاده شد. استفاده هم‌زمان از سه ژن *oprL*، *oprI* و *16s rDNA* حساسیت و اختصاصیت کافی برای تشخیص صحیح سودوموناس‌آئروژینوزا را فراهم می‌آورد. هم‌چنین به‌دلیل استفاده از Multiplex PCR این روش نسبت به روش‌های متداول سریع‌تر می‌باشد.

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.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-29]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.1.16.6]

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.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-29]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.1.16.6]