شناسایی اختصاصی هم زمان استرپتوکوکوس پنومونیه، هموفیلوس آنفلوآنزا و مایکوپلاسما پنومونیه در نمونه های خلط بیماران مشکوک به آنفلوانزا از طریق واکنش Multiplex PCR

امین معظمی [۱]، محمد حسن شیرازی [۲*]، محمد رضا پورمند [۲]، ندا اکبری [۳]، داود افشار [۴]، سارا حاجی خانی [۵]

۱. کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات اراک
۲. دانشیار گروه میکروب شناسی ،دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۳. استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات اراک
۴.دانشجوی دکترای تخصصی باکتری شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۵.کارشناس میکروب شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

*** نشانی برای مکاتبه:** میدان انقلاب ، دانشگاه علوم پزشکی تهران ، دانشکده بهداشت ،گروه پاتوبیولوژی ، بخش میکروب شناسی، پست الکترونیک : mhshirazi@tums.ac.ir

دریافت مقاله: اردیبهشت نود و دو پذیرش برای چاپ: تیر نود و دو

چکیده

سابقه و هدف: *استرپتوکوکوس پنومونیه، هموفیلوس آنفلوانزا و مایکوپلاسما پنومونیه از عوامل شایع پنومونی باکتریال می باشند. این عوامل هم چنین میتوانند در بیماران مبتلا به آنفلونزا منجر به سوپر اینفکشن باکتریال شوند. هدف از این تحقیق شناسایی اختصاصی هم زمان استرپتوکوکوس پنومونیه، هموفیلوس آنفلوانزا و مایکوپلاسما پنومونیه در نمونه های خلط بیماران مشکوک به آنفلوانزا از طریق واکنش مولکولی Multiplex PCR می باشد.*

روش کار: *در این مطالعه ۱۷۰ نمونه ی خلط در بیماران مشکوک به آنفلوانزا با گستره سنی۲ماه تا ۷۰ سال، ارسالی به آزمایشگاه رفرانس آنفلوانزا - دانشگاه علوم پزشکی تهران با روشMultiplex PCR آزمایش شد. اندازه قطعات آمپلیکون تکثیر یافته برای استرپتوکوکوس پنومونیه ۳۹۴ جفت باز ، برای هموفیلوس آنفلوانزا ۱۹۹ جفت باز و برای مایکوپلاسما پنومونیه ۴۱۶ جفت باز تعیین گردید.*

یافته ها: *از بین ۱۷۰ نمونه خلط در بیماران، ۳۰ مورد از نظر استرپتوکوکوس پنومونیه و هموفیلوس آنفلونزا مثبت گردید. از ۳۰ نمونه مثبت، ۲۷ نمونه(۱۵/۸٪) برای استرپتوکوکوس پنومونیه و ۳ نمونه(۱/۷٪) از نظر هموفیلوس آنفلوانزا مثبت بود.هیچ باندی برای مایکوپلاسما پنومونیه یافت نشد.*

نتیجه گیری: *این مطالعه نشان داد که روش مولکولیMultiplex-PCR قادر است در مدت زمان بسیار کوتاهی باکترهای مورد نظر را شناسایی کند و این روش می تواند به عنوان یک تکنیک تکمیلی مفید خصوصاً زمانی که نتایج رنگ آمیزی ،کشت باکتری و یا شناسایی سرولوژی منفی بوده به کار گرفته شود.*

واژگان کلیدی: *شناسایی، استرپتوکوکوس پنومونیه، هموفیلوس آنفلوانزا، مایکوپلاسما پنومونیه،Multiplex PCR*

مقدمه

عوامل باکتریال و ویروسی مختلفی در ایجاد عفونت های تنفسی نقش دارند و افتراق عوامل باکتریال از ویروسی در تعیین پروتوکل درمانی اهمیت به سزایی دارد. با این که باکتری های مختلفی در ایجاد عفونت های تنفسی نقش دارند اما تحقیقات جدید سه باکتری استرپتوکوکوس پنومونیه ، هموفیلوس آنفلوانزا و مایکوپلاسما پنومونیه را جزئی از عوامل شایع باکتریایی عفونت های تنفسی معرفی می کنند(۱). پنوموکوک شایع ترین علت پنومونی باکتریال در همه مراحل زندگی انسان بجز دوره ی نوزادی می باشد . پنوموکوک معمولاً بصورت پنومونی تی پیک لوکال تظاهر می کند اما می تواند به فرم های دیگری مانند پنومونی با افیوژن یا پنومونی های دو طرفه نیز دیده شود(۲). هموفیلوس آنفلوانزا یکی دیگر از دو علت مهم پنومونی باکتریال خصوصاً در کودکان زیر۵ سال می باشد و تظاهرات کلینیکی آن از پنوموکوک غیر قابل افتراق است، بطوری که علائم آن از عفونت خفیف تا شدید متفاوت می باشد(۳). مایکوپلاسما پنومونیه احتمالاً شایع ترین علت پنومونی آتی پیک خصوصا در کودکان بعد از ۵ سال می باشد. معمولاً در عکس ریه بصورت انفیلتراسیون پراکنده دیده می شود که گاهی نیز به صورت پنومونی بینابینی دو طرفه می باشد(۴).

نظر به اهمیت تشخیص سریع و دقیق این عوامل در عفونت های تنفسی، استفاده از روشی کارآمدکه بتواند آنها را بطور اختصاصی شناسایی نماید از ضروریات آزمایشگاه ها می باشد. امروزه در بسیاری از کشور ها استفاده از روش های مولکولی به منظور تشخیص عوامل بیماری زا و تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی نسبت به آنها در آزمایشگاه های میکروب شناسی پزشکی رو به افزایش است. روش های مولکولی دارای حساسیت و اختصاصیت بالا بوده و با کمک آن می توان عوامل باکتریال یا ویروسی را بطور هم زمان و اختصاصی شناسایی کرد(۵). هدف از این مطالعه،راه اندازی روش Multiplex PCRبرای تعیین و تشخیص افتراقی هم زمان سه عامل شایع در عفونت های تنفسی می باشد.

روش کار

برای انجام این تحقیق سویه های باکتری مورد آزمایش شامل هموفیلوس آنفلو انزا (ATCC49766) و استرپتوکوکوس پنومونیه (NCTC7465) از مرکز کلکسیون قارچ ها و باکتری های سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. ژنوم مایکوپلاسما پنومونیه (ATCC10119) از گروه میکروب شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران فراهم گردید.

رایج ترین روش های استخراج ژنوم شامل روش فنل کلروفرم، آلکالین لایزیز و روش Boiling می باشد که در این تحقیق استخراج ژنوم برای باکتری های استرپتوکوکوس پنومونیه و هموفیلوس آنفلوآنزابه روش Boiling انجام پذیرفت . در این روش کلنی تک از محیط مولر هینتون به محیط آب گوشت LB تلقیح و ۲۴ ساعت در گرم خانه ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد . بعد از ۲۴ ساعت، ۵ میکرو لیتر از محیط فوق را برداشته و با دور ۵۰۰۰ به مدت ۳ دقیقه، سانتریفوژ گردید. مایع رویی دور ریخته شده و به رسوب حاصل، مقدار ۲۰۰ میکرولیتر محلول STET اضافه گردید و ۴ دقیقه در آب جوش جوشانده شد. سپس ۳ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. مایع رویی به یک میکروتیوب استریل منتقل شده و به آن پروپانول ۹۶ درصد (دو برابر حجم آن) اضافه و سپس به مدت ۲۰ دقیقه در ۲۰ - درجه سلسیوس قرار داده شد. بعد از این مرحله میکروتیوب به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. مایع رویی دور ریخته شده و و به مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد تا به طور کامل خشک گردد. بعد از خشک شدن کامل میکروتیوب ها، ۵۰ میکرولیتر محلول TE به آن اضافه گردید و در ادامه جهت بررسی کیفیت DNA ژنومی روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شد(۶) .

برای استخراج ژنوم از نمونه های خلط بیماران نمونه خلط ۱۷۰ بیمار (۴۳ ٪مرد و ۵۷٪ زن) با گستره سنی ۲ ماه تا ۷۰ سال ، مشکوک به آنفولانزا ، ارسالی به مرکز رفرانس آنفولانزا- دانشکده بهداشت - دانشگاه علوم پزشکی تهران آزمایش شد. جهت لیز نمونه های خلط هم حجم نمونه ، به آن بافر فسفات سالین(PBS) اضافه گردید وسپس به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۲۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. این مرحله تا دو بار تکرار شد و سپس مایع رویی دور ریخته شد. در ادامه به محتویات میکروتیوب ها ۵ میکرولیتر پروتئناز K اضافه و در دمای ۵۵°C به مدت ۳ ساعت و سپس در دمای ۹۵°C به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. جهت جدا سازی پروتیئن ها ازروش (فنل – کلروفرم) استفاده شد. در این مرحله فنل – کلروفرم – ایزو الکل آمیل به ترتیب به نسبت ۱:۲۴:۲۵ به حجم کلی ۶۲۰ میکرولیتر به محلول اضافه و میکروتیوب های واجد محلول چندین بار وارونه شد تا محلول شیری رنگی حاصل گردد. سپس میکروتیوب ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردیدند که در انتها سه فاز: شفاف رویی حاوی ژنوم باکتریایی، سفید رنگ میانی شامل پروتئین ها و زیرین حاوی محلول فنل – کلروفرم – ایزو الکل آمیل، تشکیل شد. مایع شفاف رویی که حاوی ژنوم باکتریایی می باشد به دقت با سمپلر جمع آوری شده و به میکروتیوب دیگری منتقل گردید.سپس حدود ۲ برابر حجم آن، اتانل خالص سرد اضافه و به آرامی میکروتیوب ها را چند بار وارونه کردیم تا رشته های DNA ظاهرشدند. سپس میکروتیوب ها در دستگاه سانتریفوژ قرار داده و با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ گردیدند.مایع رویی دور ریخته شده و میکروتیوب ها به مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد تا به طور کامل خشک گردند .بعد از خشک شدن کامل میکروتیوب ها، ۵۰ میکرولیتر محلول TE به آن اضافه گردید(۷).

سه جفت آغازگر اختصاصی با استفاده از نرم افزار آنلاین Primer3 طراحی و در سایت تخصصی insilico به نشانیhttp://insilico.ehu.es/PCR بررسی شد و در ادامه نیز به وسیله نرم افزار های مولکولی(Oligo,BLAST) از لحاظ وجود لوپ، دمای ذوب و سایر خصوصیات پرایمر ها ارزیابی شد(۸). لوکوسی از ژنوم که اختصاصی برای هر یک از سه باکتری فوق بود انتخاب و جهت طراحی پرایمر به کار گرفته شد. ژن (blpA) برای استرپتوکوکوس پنومونیه ، ژن آنیدراز کربنیک برای هموفیلوس آنفلوانزا و ژن (gyrB) برای مایکوپلاسما پنومونیه جهت طراحی پرایمر استفاده شد. توالی پرایمرها در جدول یک نشان داده شده است.

جدول ۱ توالی پرایمر های مورد استفاده در این تحقیق

نام باکتری	توالی پرایمر ها	اندازه آمپلیکون
Streptococcus pneumoniae	F: CTTGCGCCTGCATTAACTCT R: TTAACCTTGGGCGGTAATCA	**۳۹۴bp**
Haemophilus influenza	F: CTGTTGTGCAATATGCCGTC R: ATATCGGCACGTTTTTCTGG	**۱۹۹ bp**
Mycoplasma pneumoniae	F: TTGTTTGTTCTGGCCCTTTAC R: CATCAATGTTTTCGGCTAAGG	**۴۱۶ bp**

واکنش PCR برای هر یک از گونه ها در شرایط زیر و در دستگاه ترموسایکلر اپندورف انجام گردید. جهت انجام فرایند PCR آنزیم Taq, PCR buffer mix MgCl2 ,dNTP DNA polymerase از شرکت kiagen teb خریداری شد. در این واکنش ۱ میکرولیتر از DNA الگو، ۰/۵ میکرولیتر از آنزیم DNAپلی مراز Taq، ۰/۵ میکرولیتر از هر آغازگر(۲۰ پیکومول در میکرولیتر)،۱/۵ میکرولیتر از مخلوط dNTPs (۲/۵ مولار) ،۲/۵ میکرولیتر بافرPCR(۱۰x)مخلوط با $Mgcl_2$ با یکدیگر مخلوط و حجم نهایی با آب مقطر دو بار تقطیر به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد(۹، جدول ۲و ۳).

جدول ۲ مقادیر مختلف ترکیبات جهت بهینه سازی واکنش pcr

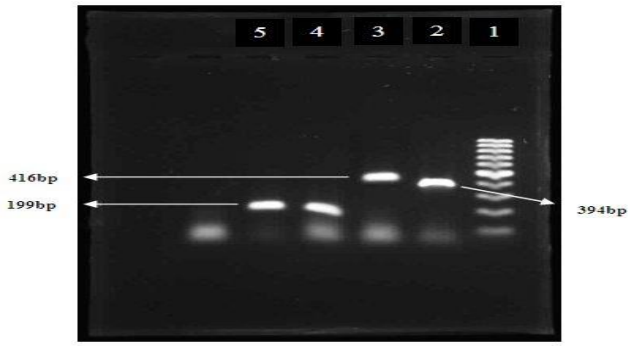
حجم	غلظت	اجزای واکنش
۱µl	۲µg/µl	DNA Templete
۲/۵µl	۱۰X	PCR Buffer mix $MgCl_2$
۰/۵µl	۲۰Pmol	Primer forward
۰/۵µl	۲۰Pmol	Primer reverse
۲µl	۲/۵Mm	dNTPs
۰/۵µl	۵۰۰U	Taq polymerase
۱۸µl	-	DDW
۲۵µl	-	Total

جدول ۳ برنامه دستگاه Termal cycler برای تکثیر قطعات

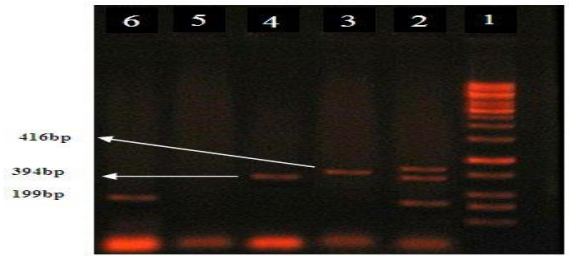
تعداد چرخه	زمان(دقیقه)	دما(سلسیوس)	مراحل
۱	۵	۹۵ C°	Initiation denaturation
۳۵	۱	۹۰C°	Denaturation
۳۵	۱	۵۴C°	Annealing
۳۵	۳	۷۲C°	Extension

پس از انجام واکنش ۵ میکرولیتر از محصولات واکنش به همراه ۱ میکرو لیتر محلول رنگ زا (red gel) در ژل آگارز ۲ ٪ به مدت ۳۰ دقیقه تحت تأثیر ولتاژ ۷۵ الکتروفورز شدند و قطعات تکثیر شده با استفاده از نشانگر Ladder 100 ارزیابی شد.

واکنش uniplex PCR با پرایمر های طراحی شده برای نمونه های ژنومی استرپتوکوکوس پنومونیه ، هموفیلوس آنفلوانزا و مایکوپلاسما پنومونیه انجام و الکتروفورز آنها توسط ژل ۲ ٪ انجام شد و نتیجه واکنش مطابق شکل ۱ بررسی شد. برای جستجوی استرپتوکوکوس پنومونه واکنش pcr با یک جفت پرایمر ویژه ژن blpA انجام شد که وجود قطعه ۳۹۴جفت باز مربوط به تکثیر بخشی از ژن blpA، نشان دهنده وجود این ژن در استرپتوکوک پنومونیه بودکه از این طریق نسبت به شناسایی این باکتری اقدام شد(شکل۱- ستون ۲). برای جستجوی هموفیلوس آنفلوانزا واکنش PCR با یک جفت پرایمر ویژه ژن انیدراز کربونیک انجام شد که وجود قطعه ۱۹۹جفت باز مربوط به تکثیر بخشی از ژن انیدراز کربونیک، نشان دهنده وجود این ژن در هموفیلوس آنفلوآنزا بود که از این طریق نسبت به شناسایی این باکتری اقدام شد(شکل۱-ستون ۵و۴). برای جستجوی مایکوپلاسما پنومونیه واکنش PCR با یک جفت پرایمر ویژه ژن gyrB انجام شد که وجود قطعه ۴۱۶ جفت باز مربوط به تکثیر بخشی از ژن gyrB، نشان دهنده وجود این ژن در مایکوپلاسما پنومونیه بود که از این طریق نسبت به شناسایی این باکتری اقدام شد(شکل ۱ ستون ۳). از نشانگر ۱۰۰ جفت باز برای کنترول استفاده شد(شکل ۱ ستون ۱). برای تشخیص همزمان ۳ باکتری استرپتوکوک پنومونیه، هموفیلوس آنفلوآنزا و مایکوپلاسما پنومونیه با یک واکنش از سه جفت پرایمر اختصاصی استفاده شد(شکل ۲ و ۳).



شکل ۱ نتایج حاصل از الکتروفورز محصول واکنش uniplex PCR ستون۱: نشانگر 100bp ستون ۲: واکنش pcr با آغازگر های SPR,SPF که قطعه ای به طول 394bp مربوط به ژن blpA استرپتوکوک پنومونیه را تکثیر نمود. ستون ۳: واکنش pcr با آغازگر های MPR,MPF که قطعه ای به طول 416bp مربوط به ژن gyrB مایکوپلاسما پنومونیه را تکثیر نمود. ستون ۵و۴: واکنش pcr با آغازگر هایHIR,HIF که قطعه ای به طول199bp مربوط به ژن carbonic هموفیلوس انفلوانزا را تکثیر نمود.



شکل ۲ واکنش مالتی پلکس PCR ستون ۱: نشانگر 100bp ستون ۲:واکنش Multiplex pcr ستون ۳: واکنش Uniplex pcr برای مایکوپلاسما پنومونیه ستون ۴: واکنش Uniplex pcr برای استرپتوکوک پنومونیه ستون ۶:واکنش Uniplex pcr برای هموفیلوس آنفلوانزا

شکل ۳ تکرار واکنش مالتی پلکس PCR جهت تأیید set up این واکنش ستون ۱: نشانگر 100bp ستون ۲: واکنش Multiplex pcr ستون ۳: واکنش Uniplex pcr برای استرپتوکوک پنومونیه ستون ۴: واکنش Uniplex pcr برای هموفیلوس آنفلوانزا ستون ۵:واکنش Uniplex pcr برای مایکوپلاسما پنومونیه

یافته ها

پس از انجام واکنش Multiplex-PCR بر روی نمونه ها ۳۰ نمونه مثبت شد، که از میان ۳۰ نمونه مثبت ۲۷ مورد (۱۵/۸ ٪)برای استرپتوکوکوس پنومونیه مثبت ،۳ مورد (۱/۷ ٪) برای هموفیلوس آنفلوانزا مثبت شد. هیچ باندی برای مایکوپلاسما پنومونیه یافت نشد.

بحث

واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR)یک واکنش سریع و حساس برای تشخیص DNA به عنوان شاخص حضور یک میکروارگانیسم در مقادیر بسیار کم است. این روش در قیاس با روش های دیگر به ویژه روش کشت، از حساسیت واختصاصیت بسیار بالاتری برخوردار است و بر خلاف روش کشت برای انجام آن نیازی به زنده بودن باکتری در نمونه مورد آزمایش نیست(۱۰). از سوی دیگر در بیماران عفونی تشخیص سریع عامل پاتوژن اهمیت بسیار بالایی دارد چراکه گاهی در صورت عدم درمان به موقع ، بیمار در مدت کمتر از ۱۲ ساعت فوت یا دچار ضایعات غیر قابل برگشت می شود. یکی از انواع روش های PCR، روش مالتیپلکسPCR است که برای تشخیص سریع و هم زمان عوامل عفونی از جمله عفونت های تنفسی باکتریال توجه فراوانی را به خود مشغول کرده است. از چالش های اصلی این روش وجود پرایمرهای متعدد است لذا طراحی این پرایمرها بایستی با دقت و اختصاصیت بالایی صورت گیرد. پژوهش گران با طراحی پرایمر های مختلف، اقدام به توسعه روش PCR جهت شناسایی باکتری هایی چون استرپتوکوکوس پنومونیه ،هموفیلوس آنفلوانزا و مایکوپلاسما پنومونیه نموده اند(۱۱-۱۴). استفاده از پرایمرهایی که اختصاصیت پائینی دارند در نمونه های تنفسی با توجه به وجود بار میکروبی زیاد آن می تواند به نتایج مثبت کاذب منجر گردد. لذا انجام واکنش PCR با پرایمرهای طراحی شده از روی نواحی حفاظت شده نمی تواند نتایج دقیقی را به همراه داشته باشد(۱۵). از این رو در این تحقیق به جهت پیش گیری از پاسخ های ناخواسته از پرایمر های اختصاصی جهت انجام واکنش مالتی پلکس PCR استفاده شد. این پرایمر های اختصاصی علاوه بر شناسایی تمام گونه های باکتری های استفاده شده در این تحقیق ، هیچ واکنش غیر اختصاصی با سایر باکتری های مشابه نداشتند.

REFERENCES

1.Scannapieco FA. Role of oral bacteria in respiratory infection. Journal of periodontology 1999;70(7):793-802.

2.Paisley JW, Lauer BA, McIntosh K, Glode MP, Schachter J, Rumack C. Pathogens associated with acute lower respiratory tract infection in young children. Pediatric infectious disease 1984;3(1):14.

3.Murphy TF, Apicella MA. Nontypable Haemophilus influenzae: a review of clinical aspects, surface antigens, and the human immune response to infection. Review of Infectious Diseases 1987;9 1-15:(1).

4.Hardy RD, Jafri HS, Olsen K, Hatfield J, Iglehart J, Rogers BB, et al. Mycoplasma pneumoniae induces chronic respiratory infection, airway hyperreactivity, and pulmonary inflammation: a murine model of infection-associated chronic reactive airway disease. Infection and immunity 2002;70(2):649-54.

5.Edwards MC, Gibbs RA. Multiplex PCR: advantages, development, and applications. Genome Research 1994;3(4):S65-S75.

6.Afshar D, Ranjbar R. A Specific Multiplex PCR For Detection Of Shigella Spp. The 13th Iranian & The Second International Congress of Microbiology. 2012.

7.Cloud JL, Carroll KC, Pixton P, Erali M, Hillyard DR. Detection of Legionella species in respiratory specimens using PCR with sequencing confirmation. Journal of clinical microbiology 2000;38(5):1709-12.

8.Rozen S, Skaletsky H .Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. Methods Mol Biol 2000;132:365-86.:365-86.

9.Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic press; 1990.

10.Khan IUH, Gannon V, Kent R, Koning W, Lapen DR, Miller J, et al. Development of a rapid quantitative PCR assay for direct detection and quantification of culturable and non-culturable Escherichia coli from agriculture watersheds. Journal of microbiological methods 2007;69(3):480-8.

11. Strålin, K., et al. "Design of a multiplex PCR for Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae, Mycoplasma pneumoniae and Chlamydophila pneumoniae to be used on sputum samples (2005)." Apmis 113(2): 99-111.

12.Moazami A,Shirazi MH,Malekshahi Z,Hajikhani S. Rapid and specific detection of Streptococcus pneumoniae by polymerase chain reaction.The 6th Iranian Congress of Clinical Microbiology & The First International Congress of Clinical Microbiology. October 2-4, 2012.

13. Oliveira S, Galina L, Pijoan C. Development of a PCR test to diagnose Haemophilus parasuis infections. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 2001;13(6):495-501.

14.Strlin K, Korsgaard J, Olcn P. Evaluation of a multiplex PCR for bacterial pathogens applied to bronchoalveolar lavage. European Respiratory Journal 2006;28(3):568-75.

15.Moazami A,Shirazi MH,Hajikhani S. Simultaneous detection of Streptococcus pneumoniae and Haemophilus influenzae in sputum samples Patients with suspected influenza by Multiplex PCR Reaction. The 21st Iranian Congress of Infectious Diseases and Tropical Medicine. January 19 -23, 2013