طراحی واکنش زنجیره ای پلیمراز برای تشخیص مولکولی *هموفیلوس آنفولانزا* در نمونه های بالینی سینوزیت

محمدحسن شاه حسینی[۱] ، پریسا افتخاری[۲]، کیومرث امینی *[۳]، پریسا مبصری[۴]

۱. دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر قدس، شهر قدس، ایران
۲. کارشناس ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه، ساوه، ایران
۳. استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه، ساوه، ایران
۴. دکتری، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران

***نشانی برای مکاتبه:** گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه، ساوه، ایران، Dr_kumarss_amini@yahoo.com تلفن: ۰۹۱۲۵۴۵۴۰۷۴

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

چکیده

سابقه و هدف: *هموفیلوس آنفولانزا یک باکتری گرم منفی محدود به انسان است که بخشی از فلور نازوفارنکس طبیعی در اکثر انسان ها است. هموفیلوس آنفولانزا می تواند بیماری هایی مانند پنومونی، مننژیت، باکترمی، سینوزیت و اوتیت میانی حاد را ایجاد کند. روش های غیرکشتی مانند PCR در دسترس در طول دو دهه گذشته بوده اند که تشخیص سریع و دقیق بیماری های باکتریایی را فراهم می کند. هدف از این مطالعه طراحی یک آزمایش PCR برای تشخیص سریع باکتری هموفیلوس آنفولانزا است.*

روش کار: *این مطالعه ژن هدف P6 بود، بنابراین پرایمرهای مخصوص برای آن طراحی شد. واکنش PCR بر DNA ژنوم هموفیلوس آنفولانزا تنظیم شد. برای ایجاد کنترل مثبت، محصول PCR در pTZ57R / T کلون شد و به E. coli JM107 انتقال داده شد. حساسیت این آزمایش با رقت سریالی کنترل مثبت مورد آزمایش قرار گرفت. در مجموع ۷۲ نمونه بالینی جمع آوری شده از بیماران مبتلا به سینوزیت با استفاده از PCR مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.*

یافته ها: *نتایج PCR باند مورد انتظار با اندازه ۲۷۳bp نشان داد. نتایج حساسیت نشان داد که محدودیت تشخیص این آزمایش ۱CFU/ml بود. پس از PCR با هیچ یک از میکروارگانیسم ها مورد آزمایش هیچ تکثیری مشاهده نشد. ۱۹ مورد مثبت(۲۶٪) از هموفیلوس آنفولانزا در نمونه ها در این مطالعه وجود داشت.*

نتیجه گیری: *روش PCR در این تحقیق نشان داده شده که روش سریع، حساس، بسیار اختصاصی و ارزان تر از روش های تجاری هستند. روش های PCR می تواند به راحتی توسط آزمایشگاه های عمومی کشورهای در حال توسعه برای اهداف تشخیصی مورد استفاده قرار گیرد.*

واژگان کلیدی: هموفیلوس آنفولانزا، تشخیص سریع، PCR

مقدمه

هموفیلوس آنفولانزا یکی از بیماری های رایج عمده انسان ها و همراه با پنومونی اکتسابی از جامعه، باکتریمی، مننژیت و اوتیت است. در حالی که درمان ضد میکروبی سنتی تاثیرگذار به اثبات رسیده است جداسازی ایزوله های مقاوم به مواد آنتی باکتریایی هموفیلوس آنفولانزا به سرعت در حال افزایش است(۱). روشها برای جداسازی و شناسایی سویه های هموفیلوس آنفولانزا پیچیده و وقت گیر است، با توجه به مشکل تشخیص با جنس های هموفیلوس نزدیک مانند هموفیلوس پاراآنفولانزا که کامنسال دهان و دندان انسان است ، تشخیص کلاسیک، که وابسته به آزمایش های مبتنی بر رشد، مورفولوژی کلنی، آزمایش و فاکتور مورد نیاز رشد X (همین) و V(NAD)، آزمایشات پورفیرین و تعیین سرولوژیک، وقت گیر و بغرنج است. به رغم این مشکلات، همچنان بیشتر آزمایشگاه های تشخیصی از این تکنیک شناسایی متعارف استفاده می کنند. روش های حساس و اختصاصی که بتوانند در آزمایشگاه بالینی انجام شود در تشخیص زود هنگام و درمان آنتی بیوتیکی موثر است. روش های مولکولی به طور ذاتی ارزشمند هستند زیرا تشخیص می تواند با حساسیت و ویژگی بالایی به دست آید و برای میکروارگانیسم های غیر زنده قابل استفاده هستند(۲).

سینوزیت یک بیماری منحصر به فرد با انواع تظاهرات است. سینوس ها در استخوان های صورت در اطراف بینی قرار دارند(۳). سینوس فکی در زایگوم است، سینوس پیشانی نزدیک ابروها ، سینوسی پرویزنی بین چشم ها و سینوس شب پره‌ای در پشت سینوس پرویزنی قرار دارد(۴). سینوزیتیت التهاب سیستم تنفسی فوقانی است. عفونت یکی از علل التهاب سینوسی است. عوامل تولید سینوزیت ممکن است به شرح زیر طبقه بندی شود:

۱-عوامل التهابی شامل عفونت های فوقانی سیستم تنفسی، که به علت سرما، آلرژی رینیت، دستکاری دندان و شنا ایجاد می شود. ۲- عوامل سیستمیک شامل کمبود ایمنی، سندرم سیلیاری بی حرکتی، فیبروز کیستیک، رینیت حاملگی و کم کاری تیروئید. ۳- عوامل مکانیکی شامل آترزی کانال، پولیپ بینی، آسیب جدی بین بینی، بدن خارجی، تروما، تومورهای بینی، هیپرتروفی بدن مخروطی و آدنوئید هیپرتروفی. ۴- عوامل دارویی شامل قرصهای کنترل تنفس، بتا مسکن، داروهای اضطراب، آسپرین و کوکائین. سینوزیت بر اساس مدت زمان علائم طبقه بندی می شود(۵).

سینوزیت حاد کمتر از ۳۰ روز طول می کشد. شکست در درمان سینوزیت حاد منجر به سینوزیت مزمن می شود که بیش از ۹۰ روز طول می کشد(۶، ۳). سینوزیت مزمن در هر دو فرم ائوزینوفیلیک یا نوتروفیلیک ، اما ابتدا در فرم ائوزینوفیلیک وجود دارد. در چنین مواردی، معمولا پولیپ ها پیدا می شوند *استافیلوکوک اورئوس* ارگانیک غالب است (۷). انسداد مکانیکی، عدم تخلیه سینوس ها، تومورهای بینی و پولیپ بینی بین عوامل ایجاد کننده سینوزیت مزمن می باشد(۴). در یک فرد سالم، سینوس ها استریل هستند اما ممکن است توسط برخی از میکروارگانیسم ها مانند ویروس ها، قارچ ها و باکتری ها کلونیزه شوند(۵). در سینوزیت حاد باکتریایی، باکتری های هوازی و بی هوازی نظیر *موراکسلا کاتارالیس*، *استرپتوکوکوس پنومونیه و هموفیلوس آنفولانزا* میکروارگانیسم های غالب هستند(۹، ۸). در سینوزیت مزمن درصد از میکروارگانیسم ها کاهش یافته و با استافیلوکوک و باکتری های بی هوازی، از جمله *پرووتلا* و *فوزوباکتریوم* جایگزین می شوند(۱۱، ۱۰). هدف از مطالعه حاضر طراحی واکنش زنجیره ای پلیمراز برای تشخیص مولکولی باکتری *هموفیلوس آنفولانزا* در نمونه های بالینی سینوزیت و تعیین حساسیت و ویژگی آن بود.

روش کار

ابتدا باکتری گونه استاندارد ATCC 49247 از شرکت بهار افشان تهیه شد، سپس با استفاده از کیت DNG(سیناکلون- ایران) Plus DNA Extraction Solutionاز باکتری استخراج DNA صورت گرفت. به منظور بهینه کردن مقدار پرایمرهای forward و reverse در غلظت های بین ۰/۱ تا ۱ میکرو مولار، Mgcl2 در غلظت های بین ۰/۵ تا ۵ میلی مولار dNTPs در غلظت های بین ۰/۵ تا ۰/۷۵ میلی مولار انجام شد. برای انجام این واکنش، مخلوط واکنش دارای بافر 10x PCR ۲/۵ میکرولیتر، $Mgcl_2$ ۰/۷۵ میکرولیتر، dNTPs ۰/۵ میکرولیتر، آنزیم Taq DNA Polymerase ۰/۴ میکرولیتر، پرایمرها هر یک ۱ میکرولیتر و ۵ میکرولیتر DNAهای استخراج شده از نمونه مورد مطالعه در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد. برنامه دستگاه ترموسایکلر شامل مراحل زیر بود: یک مرحله واسرشت اولیه در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ چرخه تکثیر با شرایط واسرشت در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال در ۵۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه ، تکثیر با دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و نهایتا یک مرحله تکثیر نهایی در ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه صورت گرفت (۱۲). جهت بررسی تکثیر قطعه مورد نظر، نمونه به همراه بافر لود کننده بر روی ژل آگارز ۱ درصد حاوی اتیدیوم بروماید، به همراه مارکر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی در ولتاژ ۱۰۰ ولت، الکتروفورزگردید و با استفاده از نور UV در دستگاه ژل داکیومنتشن بررسی گردید.

جهت ساخت کنترل مثبت، کلونینگ محصول PCR ژن (*P6*) در وکتور pTZ57R/T انجام شد. برای این منظور ابتدا محصول PCRبا استفاده از دستور العمل کیت (بیونیر، کره) ®AccuPrep PCR Purification Kitخالص سازی شد. سپس واکنش اتصال میان محصول PCR خالص شده ژن و وکتور pTZ57R/T مطابق با دستورالعمل کیت (فرمنتاز، لیتوانی) Ins TAclone PCR cloning kitانجام گرفت. در دمای ۲۲ درجه سانتی گراد برای ۴ ساعت انکوبه شد تا فرآیند لایگیشن یا ورود قطعه هدف داخل پلاسمید با موفقیت انجام گیرد. محصول واکنش اتصال به باکتری Ecoli JM107 انتقال داده شد. در نهایت باکتری های ترانسفورم شده در محیطLB آگار حاوی آمپی سیلین (۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر)، نالیدیکسیک اسید (۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر) و ۵- برومو ۴- کلرو ۳- ایندولیل بتا دی گالاکتوپیرانوزید (X-Gal) (۴۰ میکروگرم بر میلی لیتر)، ایزوپروپیل بتا دی تیو گالاکتو پیرانوزید (IPTG) (۳۸/۴ میکروگرم بر میلی لیتر) منتقل شد. ۴ تا ۶ کلنی سفید جهت حضور ورود DNA با روش استخراج پلاسمید با استفاده از کیت AccuPrep Plasmid Mini Extraction Kit(بیونیر، کره) انجام گرفت. به منظور حذف پرایمر دایمرها و خالص کردن محصول PCR ، محصول PCR از ژل Low Melting Point تخلیص گردید.

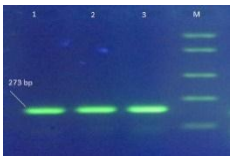
جهت تعیین حساسیت، ابتدا غلظت DNA استخراج شده از سوش استاندارد *هموفیلوس آنفلوانزا* که میزان OD آن را با دستگاه نانودراپ اندازه گرفته شده و مشخص است استفاده کرده و رقت های متوالی از آن تهیه شد. تست PCR تشخیصی مطابق شرایط

ذکر شده بر روی آنها انجام شد. در نهایت کمترین غلظت از آن که باند واضح و مشخصی را در الکتروفورز روی ژل آگاروز نشان داد به عنوان حد تشخیص آزمون تعیین شد.

جهت تعیین اختصاصیت آزمون PCR بهینه شده، DNA باکتری های شایع دیگر در سینوزیت نظیر *استافیلوکوکوس اورئوس، موراکسلا کاتارالیس، پنوموکوک، سودوموناس آئروژینوزا، لژیونلا پنوموفیلا، سالمونلا تیفی، اشریشیا کلای* را استخراج کرده و آزمون PCR بهینه شده را برای آنها به همراه نمونه کنترل مثبت و منفی مورد ارزیابی قرار داده شد. آزمون PCR بهینه شده بر روی DNA استخراج شده از نمونه های سینوزیت گرفته شده از بیماران بیمارستان رسول اکرم(ص) در طول عمل جراحی fess، به همراه نمونه کنترل مثبت، که الگوی آن DNA استخراج شده از سوش استاندارد *هموفیلوس آنفلوانزا* بود و نمونه کنترل منفی انجام شد.

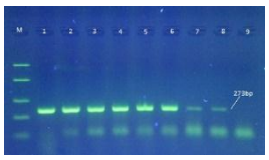
یافته ها

آزمون PCR با استفاده از DNA استخراج شده از سوش استاندارد *هموفیلوس آنفلوانزا* ATCC 49247، بهینه گردید. نتایج الکتروفورز محصول واکنش PCR ژن *P6* باند مورد انتظار ۲۷۳ جفت باز را نشان داد. ایده‌آل‌ترین غلظت Mgcl2 برای انجام واکنش ۱/۵ میلی مولار ، بهینه غلظت dNTPs ۰/۵ میلی مولار و بهینه غلظت پرایمرهای forward و reverse در ۰/۴ میکرومولار به‌دست آمد. در واکنش PCR مربوط به نمونه کنترل منفی هیچ باندی در ژل آگارز مشاهده نشد. این نتیجه صحت واکنش PCR را تایید نمود. ۲۰ ساعت بعداز ترانسفورماسیون، کلنی‌های سفید و آبی بر روی پلیت LB-Agar حاوی Amp نمایان گشت. اگر insert به طور صحیح در جایگاه کلونینگ که درون ژن LacZ است در جهت صحیح وارد شده باشد، کلنی‌های سفید رنگ بر روی پلیت ظاهر می‌شود. اگر insert درون وکتور پلاسمیدی صحیح وارد نشده باشد، در اثر تجزیه X-Gal در مجاورت IPTG کلنی‌های آبی رنگ بر روی محیط Amp + LB Agar رشد می‌کند. انتخاب کلنی ها به روش غربالگری آبی/ سفید صورت گرفت و پس از استخراج پلاسمید بر روی آنها واکنش PCR صورت گرفت. نتایج PCR حضور ژن *P6* را در پلاسمید pTZ57R/T-p6 را تایید کرد (شکل ۱).



شکل ۱- نتایج PCR آزمون سه کلون مثبت هموفیلوس آنفلوانزا: ستون M شاخص مولکولی ۱۰۰جفت بازی، ستون ۱-۳ کلون مثبت

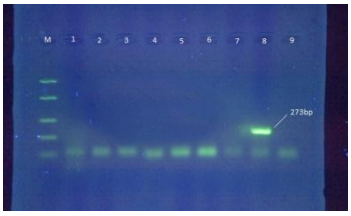
جهت تعیین حساسیت واکنش PCR سری های رقتی که از DNA استخراج شده باکتری تهیه شده بود انجام شد و آخرین رقتی از آن که باند واضحی را بر روی ژل آگاروز ایجاد نمود رقت 10^{-6} بود. بنابراین حد تشخیص یا حساسیت روش PCR ۱CFU/ml (Colony-forming unit/ml) باکتری به دست آمد (شکل ۲).



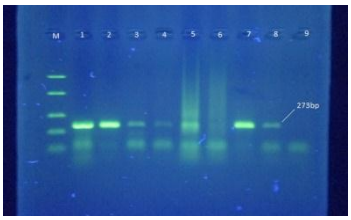
شکل ۲- نتایج آزمون حساسیت PCR بهینه شده هموفیلوس آنفلوانزا: ستون M شاخص مولکولی ۱۰۰جفت بازی، ستون ۱ کنترل مثبت، ستون ۲ محصول PCR با غلظت DNA یک میلیون باکتری، ستون ۳ محصول PCR با غلظت DNA صد هزار باکتری، ستون ۴ محصول PCR با غلظت DNA ده هزار باکتری، ستون ۵ محصول PCR با غلظت DNA هزار باکتری، ستون ۶ محصول PCR با غلظت DNA صد باکتری، ستون ۷ محصول PCR با غلظت DNAده باکتری، ستون ۸ محصول PCR با غلظت DNA یک باکتری ، ستون ۹ کنترل منفی

نتایج تعیین ویژگی واکنش، هیچ گونه تکثیری را در PCR بر روی ژنوم باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس، موراکسلا کاتارالیس، پنوموکوک، سودوموناس آئروژینوزا، لژیونلا پنوموفیلا، سالمونلا تیفی، اشریشیا کلای نشان نداد. این آزمایش تایید کننده ویژگی واکنش PCR فوق بود (شکل ۳).

نتایج حاصل از آزمون PCR بهینه شده بر روی DNAهای استخراج شده از نمونه های سینوزیت در ۱۹ مورد از ۷۲ نمونه (۲۶٪) سینوزیت گرفته شده از بیماران مثبت گردید (شکل ۴).



شکل ۳- نتایج آزمون ویژگی PCR بهینه شده هموفیلوس آنفلوانزا: ستون M شاخص مولکولی ۱۰۰جفت بازی، - ستون ۱ محصول PCR استافیلوکوکوس اورئوس، ستون ۲ محصول PCR موراکسلا کاتارالیس، ستون ۳ محصول PCR استرپتوکوکوس پنومونیه، ستون ۴ محصول PCR سودوموناس آئروژینوزا، ستون ۵ محصول PCR لژیونلا پنوموفیلا ، ستون ۶ محصول PCR سالمونلا تیفی، ستون ۷ محصول PCR اشریشیا کلای ، ستون ۸ کنترل مثبت، ستون ۹ کنترل منفی.



شکل ۴- آزمون PCR بهینه شده، ستون M شاخص مولکولی ۱۰۰جفت بازی، ستون ۱ کنترل مثبت با DNA ی هموفیلوس، ستون ۲-۸ نمونه های سینوزیت *هموفیلوس آنفلوانزا*، ستون ۹ کنترل منفی

بحث

خانواده پاستورلاسه شامل جنس هموفیلوس، پاستورلا و اکتینوباسیلوس است. جنس هموفیلوس شامل یک عدد از گونه هایی است که انواع مختلفی از عفونت ها را ایجاد می کند اما یک مورفولوژی مشترک و عوامل مورد نیاز مشتق از خون در طول رشد که با توجه به جنس نام آن را به اشتراک بگذارید. هموفیلوس آنفولانزا، یک باکتری باسیل یا کوکوباکسیل گرم منفی، به فراونی از دستگاه تنفسی فوقانی سالم اشخاص ایزوله شده است. می توان آن را از نازوفارنکس تا ۸۰٪ از جمعیت طبیعی بازیابی کرد. پاتوژن اصلی، می تواند به انواع کپسول دار یا تیپی تقسیم شود ، که از آن هفت نوع (از طریق f) بر اساس ساختار آنتی ژنیک پلی ساکارید کپسول و سویه های بدون کپسول یا غیر قابل تیپبندی وجود دارد. هموفیلوس آنفولانزا نوع B در واقع این پرخطرترین ارگانیسم در این گروه، معمولا باعث حمله قلبی و مننژیت در کودکان کمتر از ۲ سال می شود. سویه های غیر تیپی علل شایع بیماری های تنفسی در نوزادان، کودکان و بزرگسالان است. هموفیلوس پاراآنفولانزا موجب پنومونی یا اندوکاردیت باکتریایی می شود. دیگر گونه های هموفیلوس باعث بیماری کمتر می شوند(۱۶-۱۳).

کنترل مثبت یکی از مهم ترین اجزای تست های تشخیصی، نمونه است. DNA ژنومیک پیش از این به عنوان کنترل مثبت در تست های تشخیصی جهت تشخیص باکتری ها استفاده می شد. اما از آنجا DNA ژنومیک که به دلیل اندازه ی بالایی که دارد، حساسیت زیادی به تغییرات دمای محیط دارد و ممکن است تخریب گردد و در نتیجه منجر به مشاهده نتایج منفی کاذب PCR گردد. در این مطالعه برای رفع این مشکل و جهت پایداری بیشتر ژن مورد نظر که برای تشخیص به کار می رود، ابتدا ژن P6 تکثیر شد، پس از کلون محصول PCR این ژن در پلاسمید pTZ57R/T از آن به عنوان کنترل مثبت استاندارد در تست PCR استفاده شد.

روش های غیر کشتی مانند PCR در طول دو دهه گذشته در دسترس بوده است که تشخیص زودرس و دقیق بیماری باکتریایی را فراهم می کند. به علت نتایج سریع، حساس و خاص، PCR یک ابزار مهم برای بهبود تشخیص چنین میکروارگانیسم هایی است. مزیت اضافی PCR نسبت به روش های آزمایشگاهی مرسوم امکان تشخیص DNA ژنومی از نمونه های بالینی بدون نیاز به کشت قبلی است. اخیرا استفاده از یک روش PCR کمی به نام Real Time-PCR، تشخیص عوامل عفونی بر اساس روش های مولکولی را بهبود داده است. هزینه های بالاتر مواد و تجهیزات می تواند یک نقص احتمالی در اجرای این روش در آزمایشگاه های عمومی کشورهای در حال توسعه باشد. استفاده از یک روش PCR ابتدایی، هنوز هم مناسب تر برای اهداف تشخیصی در آزمایشگاه های کم بودجه است(۱۷).

Ketel و همکاران پروتئین غشاء خارجی (P6) را توصیف کردند که به طور انحصاری در همه سویه های هموفیلوس آنفلوانزا وجود دارد و مرتبط با وجود کپسول نیست، مناسب برای جداسازی بین سویه های کپسول دار و غیر کپسول دار از طریق یک PCR ساده است. شکست در تکثیر ژن bexA و تکثیر ژن P6 سویه های Hi غیر کپسول دار را نشان می دهد. استفاده تنها از پرایمر برای تشخیص ژن P6 برای تشخیص سویه های Hi کافی خواهد بود(۱۸).

در مطالعه ی Kassaa و همکاران حد تشخیص ژنوم حداقل ۱۰ نسخه ژنی و از پرایمرهای P6 و16S rRNA جهت تشخیص هموفیلوس آنفلوانزا جمع آوری شده از نمونه های بیماران استفاده کردند(۱۹). در مطالعه ی Filippis و همکاران حد تشخیص ژنوم حداقل ۱۰ نسخه ژنی و از پرایمرهای P6 و bexA جهت تشخیص هموفیلوس آنفلوانزا در مایع مغزی نخاعی و خون جمع آوری شده از بیماران مشکوک به مننژیت استفاده کردند(۲۰). در مطالعه ی Billal و همکاران حد تشخیص ژنوم DNA را ۲ $\times 10^{-3}$ نانوگرم

ژنوم و از پرایمرهای P6 (ژن کد کننده پروتئین غشای خارجی)، cpsb(ژن کد کننده کپسول پلی ساکاریدی تیپ b)، bexA (ژن کد کننده کپسول پلی ساکاریدی)TEM-1 (ژن بتالاکتاماز) جهت تشخیص هموفیلوس آنفلوانزا در ترشحات نازوفارژینال جمع آوری شده از کودکان با اوتیت حاد استفاده کردند. بر اساس مطالعه ی Torigoe و همکاران جهت سنجیدن حساسیت روش PCR از روش سریال دایلوشن با رقت ۱۰ برابری تهیه و حد تشخیص را $۱۰^{۳}$ کپی از ژنوم در هر لوله تعیین و از پرایمرهای ژن P6 جهت تشخیص هموفیلوس آنفلوانزا استفاده کردند(۲۱). در مطالعه ی Ueyama و همکاران از پرایمرهای ژن P6 جهت تشخیص هموفیلوس آنفلوانزا در ترشحات نازوفارژینال در ۱۰۲ بیمار دارای اوتیت مدیا و ۱۱۱ نمونه کنترل سالم استفاده کردند(۲۲). بر اساس مطالعه ی Yadav و همکاران از پرایمرهای ژن P4 ژن کد کننده پروتئین غشای خارجی جهت تشخیص هموفیلوس آنفلوانزا استفاده کردند(۲۳). در مطالعه ی jalali و همکاران از پرایمرهای ژن P6 جهت تشخیص هموفیلوس آنفلوانزا در ترشحات نازوفارژینال جمع آوری شده از کودکان استفاده کردند(۲۴). در مطالعه ی سعادتی و همکاران پس از کشت باکتری و اندازه گیری جذب نوری محیط کشت، ابتدا از محیط مورد نظر تا $۱۰^{-۱۰}$ رقت تهیه کرده و برای محاسبه تعداد باکتری در هر رقت فرایند شمارش باکتری (Colony count) استفاده شد و حساسیت ۱۵۰۰۰ CFU/ml تعیین و از پرایمرهای ژن lic1 جهت تشخیص هموفیلوس آنفلوانزا استفاده کردند(۲۵). در مطالعه ی Khodashahri و همکاران از پرایمرهای ژن Omp6 جهت تشخیص گونه هموفیلوس آنفلوانزا و ژن bexA جهت تشخیص هموفیلوس آنفلوانزا کپسول دار و هموفیلوس آنفلوانزا غیر قابل تیپبندی استفاده کردند(۲۶).

در مطالعه abdeldaim و همکاران یک real-time PCR حساس و ویژه با استفاده از پروتئین غشای خارجی P6 به عنوان یک ژن هدف برای تشخیص هموفیلوس آنفلوانزا را توسعه داد. روش P6 قادر به تشخیص نسخه های ژنوم <۳۰ در هر لوله واکنش بود ، هنگامی که رقت های سریال DNA هدف با غلظت شناخته شده به طور مکرر برای تشخیص ظرفیت تشخیص روش مورد آزمایش قرار گرفتند. ویژگی P6 PCR علاوه بر سه روش PCR دیگر (rnpB، 16SrRNA و bexA) در DNA از ۲۹ سویه باکتری مورد آزمایش قرار گرفت نشان دهنده ۱۱ گونه و شامل ۷ ایزوله بالینی هموفیلوس پاراآنفلوانزا است. آزمایش P6 تمام سویه ها کپسول دار و غیر کپسول دار هموفیلوس آنفلوانزا را تشخیص داد و ویژگی بیشتری نسبت به PCR های rnpB و 16S rRNA داشت. bexA PCR دارای ویژگی (به جز هموفیلوس پاراهمولیتیکوس) بود، اما نتوانست چهار نوع کپسول دار (سویه های a, e, f و b) و هیچکدام از آنها پنج سویه غیر کپسول دار را شناسایی کند. تمام ژن های هدف دارای محدودیت برای استفاده تشخیصی بودند. مشکل مشخصی برای ویژگی PCR هموفیلوس آنفلوانزا عمدتا توسط تبادل ژنتیکی مکرر با ترانسفرماسیون و نوترکیبی در ژن هموفیلوس توضیح داده می شود(۲۷).

بر اساس گزارش های قبلی بر اساس روش های کشت معمول، میزان مثبت هموفیلوس آنفلوانزا در نازوفارنژیال کودکان سالم بین ۹ تا ۲۰٪ متغیر است. در مطالعه Ueyama ، میزان مثبت DNAژن P6 در ترشحات نازوفارنکس افراد سالم ۴۶٪ بود که به طور قابل توجهی بالاتر از میزان مثبت هموفیلوس آنفلوانزا تشخیص داده شده با روش کشت معمول بود. گزارش های قبلی نیز نشان می دهد که میزان حامل هموفیلوس آنفلوانزا در نازوفارنژیال کودکان مبتلا به اوتیت یا بیماران با اوتیت مدیا بالاتر از افراد سالم بودند. وی DNA ژن P6 را از نازوفارنکس در ۸۶٪ بیماران مبتلا به اوتیت مدیا یافت. این یافته ها نشان می دهد که PCR حساس تر از روش کشت معمولی در تشخیص هموفیلوس آنفلوانزا است(۲۲).

در مطالعه ی Billal و همکاران ابتدا PCR multiplex را برای شناسایی هموفیلوس آنفولانزا و تعیین خصوصیات کپسول پاتوژن جدا شده در ترشحات نازوفارنژیال به کار برد. هموفیلوس آنفولانزا در بین ۶۸-۷۲٪ در میان ترشحات شناسایی شد. تقریبا ۸۲/۴٪ به وسیله کشت و ۷۲/۲٪ توسط PCR multiplex ایزوله های هموفیلوس آنفولانزا سویه های غیر قابل تیپبندی بودند. Ueyama و همکاران گزارش دادند که بیش از ۹۰٪ سویه ها در ناحیه نازوفارنکس غیر قابل تیپبندی بودند. حدود ۱۷/۶٪ کشت و ۲۷/۸٪ PCR از هموفیلوس آنفولانزا سویه های Hib بود. نظارت بر بیماری های عفونی دستگاه تنفسی کودکان در طول سال۱۹۸۰-۱۹۹۱ نشان داد که تنها ۲/۶٪ از ایزوله ها سویه های نوع b بودند(۲۰).

در تحقیق Jalali و همکاران شیوع هموفیلوس آنفولانزا در نمونه های نازوفارنکس میان کودکان کمتر از ۶ سال ۲۸٪ بود، که با نتایج مطالعات مشابه در کشورهای بدون واکسن که میزان حاملین را از ۱۲٪ تا ۷۲٪ گزارش کردند موافق است(۲۴). در مطالعه ای توسط Ghazvini و همکاران گزارش دادند که شیوع حاملین آنفلوآنزا ۸/۲۳٪ است (۲۸). در مطالعه ای توسط Shoma و همکاران ،این شیوع آن ۱۰/۷٪ بود (۲۹). در مطالعه ای توسط خوشدل و همکاران ۱۱/۱٪ حاملین هموفیلوس آنفولانزا در نمونه های حلقی بودند (۳۰). میزان بالاتر (۲۶٪) از حاملین هموفیلوس آنفولانزا در سال های اخیر ممکن است به دلیل دقیق بودن آزمایش برای شناسایی این باکتری و یا عدم بهداشت در مراکز مورد مطالعه باشد. بر اساس یک مطالعه در تایلند در سال ۲۰۱۰، شیوع حاملین در کودکان کمتر از ۶ سال ۴۴/۴٪ بود (۳۱). شیوع حاملین در کودکان کمتر از ۶ سال در فرانسه ۴۰/۹٪ بود(۳۱). مطالعات دیگر در لهستان و ترکیه میزان حاملین را به ترتیب ۶/۷٪ و ۸/۲۲٪ در کودکان زیر ۶ سال اثبات کردند(۳۳، ۳۲). همه اینها مطالعات قبل از برنامه واکسیناسیون انجام شد. این شیوع آنفلوآنزا در ایران با تایلند، فرانسه، لهستان و ترکیه که واکسیناسیون علیه Hib برنامه ایمن سازی روتین در این کشورها نیست قابل مقایسه است. این

مطالعه نشان داد که PCR ژن P6 هموفیلوس آنفلوانزا روشی با حساسیت و ویژگی بالایی است و ظرفیت بالایی برای استفاده به عنوان ابزاری در تشخیص سریع سینوزیتیت ناشی از این باکتری به ویژه در موارد مصرف آنتی بیوتیک توسط بیمار را دارد.

REFERENCES

1. Hasegawa K, Chiba N, Kobayashi R, Murayama SY, Iwata S, Sunakawa K, et al. Rapidly increasing prevalence of beta-lactamase-nonproducing, ampicillin-resistant Haemophilus influenzae type b in patients with meningitis. Antimicrob Agents Chemother. 2004; 48(5):1509-14.
2. Brown PD, Lerner SA. Community-acquired pneumonia. Lancet. 1998; 352(9136):1295-302.
3. Paju S, Bernstein JM, Haase EM, Scannapieco FA. Molecular analysis of bacterial flora associated with chronically inflamed maxillary sinuses. J Med Microbiol 2003; 52: 591e7.
4. Nazar H. Sinusitis review. MED 2011; 5: 5649e57.
5. Tammemagi CM, Davis RM, Benninger MS, Holm AL, Krajenta R. Secondhand smoke as a potential cause of chronic rhinosinusitis: a case-control study. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 2010; 136: 327e34.
6. Bucholtz GA, Salzman SA, Bersalona FB, Boyle TR, Ejercito VS, Penno L, et al. PCR analysis of nasal polyps, chronic sinusitis, and hypertrophied turbinates for DNA encoding bacterial 16S rRNA. Am J Rhinol. 2002; 16: 169e73.
7. Rombaux P, Collet S, Hamoir M, Eloy P, Bertrand B, Jamart F, et al. The role of nasal cavity disinfection in the bacteriology of chronic sinusitis. Rhinology. 2005; 43: 125e9.
8. Brook I. Discrepancies in the recovery of bacteria from multiple sinuses in acute and chronic sinusitis. J Med Microbiol. 2004; 53: 879e85.
9. Brook I. Bacteriology of chronic sinusitis and acute exacerbation of chronic sinusitis. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 2006; 132: 1099e101.
10. Brook I. Microbiology and antimicrobial management of sinusitis. J Laryngol Otol. 2005; 119:251e8.
11. Mantovani K, Bisanha AA, Demarco RC, Tamashiro E, Martinez R, Anselmo-Lima WT. Maxillary sinuses microbiology from patients with chronic rhinosinusitis. Braz J Otorhinolaryngol. 2010; 76: 548e51.
12. Tian GZ, Zhang LJ, Wang XL, Zhang L, Li SF, Gu CM, Sun J, Cui BY. Rapid Detection of Haemophilus influenzae and Haemophilus parainfluenzae in Nasopharyngeal Swabs by Multiplex PCR Biomed Environ Sci, 2012; 25(3): 367-371
13. Nwaohiri N, Urban C, Gluck J, et al. Tricuspid valve endocarditis caused by *Haemophilus parainfluenzae*: a case report and review of the literature. Diagn Microbiol Infect Dis, 2009; 64, 216-9.
14. Tian GZ, Zhang L, Li MC, et al. Genotypic characteristics of *Haemophilus influenzae* isolates from pediatric pneumonia patients in Chengdu city, Sichuan, China. J Microbiol, 2009; 47, 494-7.
15. van Ketel RJ, de Wever B, van Alphen L. Detection of *Haemophilus influenzae* in cerebrospinal fluids by polymerase chain amplification DNA amplification. J Med Microbiol, 1990; 33, 271-6.
16. Harrison LH, Simonsen V, Waldman EA. Emergence and disappearance of a virulent clone of *Haemophilus influenzae* biogroup aegyptius, cause of Brazilian purpuric fever. Clin Microbiol Rev, 2008; 21(4): 594-605.
17. de Filippis I, de Andrade CF, Caldeira N, de Azevedo AC, de Almeida AE.Comparison of PCR-based methods for the simultaneous detection of Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae, and Streptococcus pneumoniae in clinical samples. Braz J Infect Dis. 2016; 20(4): 335-41.
18. van Ketel RJ, de Wever B, van Alphen L. Detection of Haemophilus influenzae in cerebrospinal fluids by polymerase chain reaction DNA amplification. J Med Microbiol. 1990; 33: 271–6.
19. Kassaa I, Hamze M, Dabboussi F, Mallat H, Achkar M, Hlais S. Prevalence of type b Haemophilus influenzae and antibiotic resistance in 52 clinical isolates in north Lebanon. East Mediterr Health J. 2014; 19 Suppl 3:S105-10.
20. Billal DS, Hotomi M, Suzumoto M, Yamauchi K, Kobayashi I, Fujihara K, et al. Rapid identification of nontypeable and serotype b Haemophilus influenzae from nasopharyngeal secretions by the multiplex PCR. Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 2007; 71: 269-74.

21. Torigoe H, Seki M, Yamashita Y, Sugaya A, Maeno M. Detection of Haemophilus influenzae by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of the outer membrane protein P6 gene. Jpn J Infect Dis. 2007; 60: 55-8.
22. Ueyama T, Kurono Y, Shirabe K, Takeshita M, Mogi G. High incidence of Haemophilus influenzae in nasopharyngeal secretions and middle ear effusions as detected by PCR. J Clin Microbiol. 1995; 33: 1835-8.
23. Yadav MC, Chakraborti A, Ray P, Sapru S, Majumdar S, Narang A. Rapid detection of Haemophilus influenzae by hel gene polymerase chain reaction. Lett Appl Microbiol. 2003; 37(3): 190-5.
24. Jalali1P, Mousavi SF, Rezaei N. Carriage Rate of Nasopharyngeal Haemophilus Influenzae among Children under 6 Years Old in Tehran, Iran J Med Microbiol Infec Dis. 2014; 2 (1): 23-27.
25. 9-Saadati M, Nazarian S, Barati B, Mehdizadeh H. Detection of Streptococcus pneumoniae and Haemophilus influenzae by Multiplex polymerase chain reaction (mPCR) assay. Iran biol J. 2008; 21: 83-93.(Full Text in Persian)
26. Khodashahri SB, Siadat SD, Rahbar M, Abdollahpour-Alitappeh M, Vaziri F, Rahnamaye-Farzami M, et al. Genotyping of Haemophilus influenzae type b strains and their incidence in the clinical samples isolated from Iranian patients. Iran J Microbiol. 2015; 7(3): 136–143.
27. Abdeldaim GMK, Strålin K, Kirsebom LA, Olcén P, Blomberg J, Herrmann B. Detection of Haemophilus influenzae in respiratory secretions from pneumonia patients by quantitative real-time polymerase chain reaction. Diagn Microbiol Infect Dis. 2009; 64: 366-73.
28. Ghazvini K, Bakhshaee M, Naderi M, Zamanian A, Ghanaat J, Bagheri M. Prevalence and Antimicrobial susceptibility of Haemophilus influenzae among healthy children in Mashhad. Iranian Journal of Otorhinolaryngology. 2007; 19 (48): 101-6. (Full Text in Persian)
29. Shoma S, Rahman M, Yasmin M. Rapid detection of Haemophilus influenzae type b in Bangladeshi children with pneumonia and meningitis by PCR and analysis of antimicrobial resistance. J Health Popul Nutr. 2001; 19 (4): 268-74.
30. Khoshdel A, Kasiri KA, Kheiri S, Doosti A, Fadaee J. The prevalence of serotypes of Haemophilus influenzae in healthy children 1 to 5 years referred to Imam Ali clinic of Shahrekord in 2012. J Shahrekord Univ Med Sci. 2015; 17(1): 41-50. (Full Text in Persian)
31. Talon D, Leroy J, Dupont MJ, Bertrand X, Mermet F, Thouverez M, Estavoyer JM. Antibiotic susceptibility and genotypic characterization of Haemophilus influenzae strains isolated from nasopharyngeal specimens from children in day-care centers in eastern France. Clin Microbiol Infect. 2000; 6 (10): 519-24.
32. Sulikowska A, Grzesiowski P, Sadowy E, Fiett J, Hryniewicz W. Characteristics of Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae, and Moraxella catarrhalis isolated from the nasopharynges of asymptomatic children and molecular analysis of S. pneumoniae and H. influenzae strain replacement in the nasopharynx. J Clin Microbiol. 2004; 42 (9): 3942-9.
33. Bakir M, Yagci A, Ulger N, Akbenlioglu C, Ilki A, Soyletir G, Basaran M. Pharyngeal colonization with Haemophilus influenzae type b among healthy Turkish infants and children. Pediatr Int. 2002; 44 (4): 381-6.