دوماهنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست-پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال هجدهم، شماره ۴، صفحه ۷۲۸ – ۷۲۰ (مهر و آبان ۱۳۹۴)
ISMJ 2015;18(4): 720-728

ارزیابی شیوع عفونت با سودوموناس ائروژینوزا در بیماران مبتلا به سینوزیت مزمن جراحی شده در بیمارستان رسول اکرم (ص) به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

هانیه شفیع‌نیا [۱]، محمدحسن شاه‌حسینی [۲ و ۳*]، منصور بیات [۴]، محمدامین محمودی [۳]، مهرداد ربیعی نعمت‌آباد [۳]، محمد فرهادی [۵]

[۱] گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، ایران
[۲] گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهر قدس، تهران، ایران
[۳] مؤسسه ایرانیان ژن فناور (IGF)، تهران، ایران
[۴] گروه تخصصی قارچ‌شناسی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، ایران
[۵] مرکز تحقیقات گوش، گلو، بینی و سر و گردن، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

(دریافت مقاله: ۹۲/۱۲/۲۰- پذیرش مقاله: ۹۳/۵/۲۲)

چکیده

زمینه: سینوزیت مزمن یکی از شایع‌ترین بیماری‌های مزمن است که افراد تمام گروه‌های سنی را تحت‌تاثیر قرار می‌دهد. این بیماری یک فرایند التهابی است که سینوس‌های پارانازال را درگیر می‌کند. در مورد انتشار گونه‌های باکتریایی ایجادکننده این بیماری اطلاعات دقیقی در دسترس نیست. ***Pseudomonas aeruginosa*** یکی از پاتوژن‌های مهم در بیماران دارای نقص در سیستم ایمنی می‌باشد. بنابراین این میکروارگانیسم یکی از مهم‌ترین عوامل ایجادکننده سینوزیت مزمن می‌باشد. هدف این مطالعه تشخیص مولکولی سینوزیت‌های ناشی از ***Pseudomonas aeruginosa*** می‌باشد.

مواد و روش‌ها: پنجاه نمونه‌از ترشحات سینوس‌های فکی و پیشانی بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان رسول اکرم (ص) در هنگام عمل جراحی جمع‌آوری شدند. DNA باکتریایی توسط کیت DNP استخراج شد و با به کاربردن سکانس هدف ژن oprL (پروتئین غشای خارجی) و طراحی پرایمر به تشخیص این باکتری اقدام شد. تست PCR بهینه و سپس حساسیت و اختصاصیت بررسی گردید. محصول تکثیری به روش T/A Cloning کلون و جهت سکانسینگ و کنترل مثبت مورد استفاده واقع شد.

یافته‌ها: محصول PCR با اندازه bp ۵۰۴ به‌طور صحیح تکثیر و بر روی ژل الکتروفورز ۱/۵ درصد مشاهده و از طریق سکانسینگ تأئید شد. ارزیابی پرایمرهای انتخابی با هشت DNA مختلف، ۱۰۰ درصد اختصاصیت را نشان داد. حساسیت تست بهینه شده PCR هم ۱۰cfu ارزیابی گردید. از ۵۰ نمونه مورد بررسی، ۲۲ درصد نمونه‌ها از جهت *سودوموناس آئروزینوزا* مثبت تشخیص داده شد.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که تشخیص مولکولی ***Pseudomonas aeruginosa*** با به‌کاربردن ژن هدف oprL یک روش مؤثر و سریع جهت شناسایی *سودوموناس آئروزینوزا* می‌باشد.

واژگان کلیدی: سینوزیت، *سودوموناس ائروژینوزا*، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، تشخیص مولکولی

* تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهر قدس، گروه میکروبیولوژی
Email:shahhosseiny@yahoo.com

مقدمه

سینوزیت مزمن یکی از شایع‌ترین بیماری‌های مزمن است که افراد تمام گروه‌های سنی را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۱).

در واقع سینوزیت التهاب سینوس‌های پارانازال است که ممکن است به علت عفونت، آلرژی یا بیماری‌های خودایمنی ایجاد شود (۲). سینوس‌های پارانازال یک واحد پیچیده از چهار جفت حفره پرشده از هوا در محل ورودی مسیر هوایی فوقانی را تشکیل می‌دهند که شامل سینوس‌های فکی، پیشانی، پروانه‌ای و اتموئید می‌باشد (۳).

مرحله اولیه سینوزیت یک عفونت ویروسی است که عموماً بیش از ۱۰ روز طول می‌کشد و در ۹۹ درصد موارد به‌طور کامل درمان می‌شود ولی در تعداد اندکی از بیماران ممکن است یک عفونت باکتریایی حاد ثانویه گسترش یابد که معمولاً توسط باکتری‌های هوازی ایجاد می‌شود. (۴). در اکثر موارد سینوزیت مزمن به‌علت سینوزیت حادی که یا درمان نشده است یا به درمان پاسخ نداده است ایجاد می‌شود. باکتری‌هایی که احتمال می‌رود در سینوزیت مزمن دخالت داشته باشند و در نمونه‌های به‌دست‌آمده توسط اندوسکوپی سینوس‌ها در بیماران مبتلا به سینوزیت مزمن گزارش شده‌اند عبارتند از: *Pseudomonas aeruginosa*، استافیلوکوکوس‌های کواگولازمنفی، *Staphylococcus aureus*، *Haemophilus influenza*، *Moraxella catarrhalis*، *Streptococcus pneumonia*، *Streptococcus intermedius*، گونه‌های نوکاردیا و باکتری‌های بی‌هوازی. (۵)

سودوموناس ائروژینوزا به‌ندرت به عنوان عامل ایجادکننده سینوزیت مزمن در افراد سالم گزارش شده است در حالی‌که اکثراً به صورت قسمتی از عفونت چند میکروبی در میان افراد دارای نقص ایمنی مشاهده شده است (۶).

تشخیص کلاسیک این باکتری معمولاً بر مبنای روش‌های میکروسکوپی و کشت انجام می‌شود. این تکنیک‌ها وقت‌گیر، با حساسیت نسبتاً پایین و نیازمند امکانات و همین‌طور تجربه کافی جهت تفسیر نتایج می‌باشد. در چند دهه گذشته، روش‌های مولکولی متعددی به ویژه روش‌های بر مبنای تکثیر توالی اسیدهای نوکلئیک اختصاصی پاتوژن‌ها توسعه یافته‌اند که امکان شناسایی سریع میکروارگانیسم‌ها با حساسیت و اختصاصیت بسیار بالا نسبت به روش‌های سنتی را مهیا ساخته‌اند. یکی از مهم‌ترین این روش‌ها تکنیک PCR است (۷). با توجه به اهمیت تشخیص سریع و دقیق *سودوموناس ائروژینوزا* در بیماران مبتلا به سینوزیت مزمن به منظور درمان به‌موقع و جلوگیری از بروز عوارض ثانویه و همچنین با توجه به وقت‌گیر بودن روش کشت، لزوم متدی سریع، حساس، آسان در عین حال کم هزینه، اختصاصی و در دسترس ضروری می‌نماید. تحقیق حاضر با توجه به شرایط ذکر شده PCR را برای تشخیص سریع *سودوموناس ائروژینوزا* در نمونه‌های بیماران مبتلا به سینوزیت مزمن مراجعه کننده به بیمارستان رسول اکرم (ص) مورد بحث و بررسی قرار می‌دهد. در این پژوهش از روش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن oprL به منظور شناسایی *سودوموناس ائروژینوزا* استفاده شده است.

مواد و روش‌ها

استخراج DNA از سوش استاندارد *سودوموناس ائروژینوزا*

به منظور بهینه نمودن تست PCR جهت تشخیص *سودوموناس ائروژینوزا* در نمونه‌های بالینی، سوش

استاندارد *P.aeruginosa* به شماره ATCC 27853 تهیه گردید و در محیط بروسلا بلاد آگار در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ روز کشت داده شد و از کلنی‌های حاصل، DNA با روش DNP با استفاده از کیت DNP(sinaclon) استخراج گردید. روش استخراج به صورت خلاصه بدین صورت بود که یک لوپ از *سودوموناس ائروژینوزا* را در ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حل نموده و سپس ۴۰۰ میکرولیتر بافر لیز کننده (DNG) به آن افزوده، در نهایت ۳۵۰ میکرولیتر محلول رسوب دهنده (ایزوپروپانول) به لوله فوق افزوده، ۱۰ بار وارونه کرده سپس به مدت ۱۰ دقیقه با ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه (rpm) سانتریفیوژ گردید. محلول رویی را تخلیه و ۱۰۰۰ میکرولیتر محلول شستشو (اتانول ۷۰ درصد) به لوله اضافه نموده، ۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور سانتریفیوژ گردید. اتانول را تخلیه نموده و لوله را ۵ دقیقه در گرمخانه ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده تا کاملاً خشک شد. در نهایت به منظور تهیه محلول DNA، ۱۰۰µl آب دوبار تقطیر استریل به لوله اضافه نموده، به مدت ۵ دقیقه در ۶۵°C قرار داده شد.

بهینه نمودن تست PCR

پرایمرهای مورد استفاده جهت آزمون PCR در این مطالعه از مقاله جیرو (Jiru) و همکاران در سال ۲۰۰۴ استفاده گردید (جدول ۱) (۸).

جدول ۱) توالی پرایمرهای مورد نیاز جهت واکنش PCR

پرایمر	توالی
Forward	5`-ATGGAAATGCTGAAATTCGGC-3`
Reverse	5`-CTTCTTCAGCTCGACGCGACG-3`

در این روش جهت بهینه کردن تکنیک PCR، غلظت و حجم مناسب اجزای مورد نیاز این متد بررسی و ارزیابی شد که در نهایت مقادیر مورد نیاز در یک تست PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر به‌دست آمد (جدول ۲). همچنین پروفایل دمایی از طریق روش گرادیانت جهت تکثیر ژن oprL به‌صورت مقابل بهینه گردید: دمای واسرشت شدن: ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای چسبیدن: ۶۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و دمای طویل شدن: ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه و به منظور حصول نتیجه بهتر، طویل شدن نهایی را به مدت ۵ دقیقه در همین دما ادامه دادیم و این روند به تعداد ۳۵ سیکل انجام گردید. تست PCR در شرایط بهینه شده انجام گرفت و محصول PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد حاوی سایبر گرین در بافر ۰/۵X TBE الکتروفورز گردید.

جدول ۲) بهینه کردن غلظت و حجم اجزای مورد نیاز جهت تهیه مخلوط PCR

اجزای مورد نیاز	حجم
بافر ۱۰X	۲/۵ میکرولیتر
منیزیم‌کلراید	۰/۷۵ میکرولیتر (محلول ۱/۵ میلی‌مولار)
dNTPs	۰/۵ میکرولیتر (محلول ۰/۲ میلی‌مولار)
پرایمر جلویی	۱میکرولیتر (محلول ۰/۶ میکرومولار)
پرایمر عقبی	۱میکرولیتر (محلول ۰/۶ میکرومولار)
آنزیم Taq DNA polymerase	۰/۴ میکرولیتر (آنزیم با فعالیت 2U)
الگوDNA	۵ میکرولیتر
D.D.W	۱۴ میکرولیتر
حجم نهایی	۲۵ میکرولیتر

کلونینگ محصول PCR

بعد از خالص‌سازی، محصول PCR با استفاده از کیت T/A cloning فرمنتاس (cat:K1214) و وکتور pTZ57R کلون گردید. پلاسمیدهای حاصل با Plasmid Mini Extraction Kit کمپانی Bioneer استخراج گردید. سپس با روش PCR، پلاسمیدهای حاوی محصول PCR تأئید گردید.

تعیین حساسیت تست PCR

بدین منظور، یک سوسپانسیون از کشت تازه‌ی

سودوموناس ائروژینوزا که غلظت آن در OD=۶۰۰nm برابر با ۰/۹×۱۰۹CFU/ml می‌باشد تهیه گردید و با روش DNG plus، DNA آن استخراج گردید. از DNA استخراج شده رقت تهیه شد به این ترتیب که در ۷ میکروتیوب میزان ۹۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر وارد کردیم. سپس به لوله اول ۱۰ میکرولیتر از DNA استخراج شده اضافه نمودیم. در مرحله بعد ۱۰ ماکرولیتر از لوله اول برداشت نموده و به لوله دوم منتقل نمودیم. به همین ترتیب ادامه دادیم و رقت های سری از نمونه را به‌دست آوردیم.

تعیین ویژگی تست PCR

جهت تعیین ویژگی، DNAهای انسان (Human)، موش (Mouse)، *ساکارومیسس سرویزیه* (*Saccharomyces cerevisiae*)، *اشرشیاکلی* (*Escherichia coli*)، *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* (*Mycobacterium tuberculosis*)، *توکسوپلاسما گوندی* (*Toxoplasma gondii*) و ویروس HCV استخراج گردید و مورد تست PCR قرار گرفت.

جمع‌آوری نمونه

جهت تهیه نمونه از بیماران، به بخش گوش و حلق و بینی بیمارستان رسول اکرم (ص) مراجعه کردیم. نمونه‌گیری از بیمارانی انجام شد که توسط محمد فرهادی پزشک متخصص گوش و حلق و بینی بیمارستان رسول اکرم (ص) در آن‌ها بیماری سینوزیت تشخیص داده شده بود و بیماری به مرحله مزمن رسیده و تشخیص جراحی برای آن‌ها داده شده بود. ما ظرف مدت ۸ ماه ۵۰ نمونه در حین عمل جراحی سینوس‌ها تهیه کردیم به این صورت که زمانی که پزشک جراح سینوس‌ها را باز می‌کرد قبل از اینکه چرک داخل سینوس را تخلیه کند یک سواب استریل را وارد سینوس کرده و آن را وارد ویال‌های حاوی سرم فیزیولوژی استریل کردیم و برای آزمایشات مولکولی به آزمایشگاه مؤسسه تحقیقاتی ایرانیان ژن فناور منتقل کردیم. سپس لوله‌ها را به دمای ۴C° منتقل و تا زمان استخراج نگهداری کردیم. لازم به ذکر است نمونه‌گیری با هماهنگی کامل با بیمارستان و بیماران انجام شد.

استخراج DNA از نمونه‌ها با کمک کیت DNP سیناکلون از نمونه‌های مایع و بافت بیوپسی بیماران انجام گردید به این طریق که۱۰۰ میکرولیتر بافر پروتئاز و ۵ میکرولیتر آنزیم پروتئاز K مقاوم به حرارت را به بافت بیوپسی سینوس اضافه کرده سپس در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه گشت. سپس۴۰۰ میکرولیتر محلول لیز کننده DNG به آن اضافه کرده و حدود ۵ ثانیه ورتکس گردید و ۳۵۰ میکرولیترالکل رسوب دهنده DNA ایزوپروپانول به مخلوط فوق اضافه کرده و حدود ۱۰ بار وارونه گردید.لوله به‌مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰rpm سانتریفوژ گردید. پس از خالی کردن لوله برای شستشو، ۱۰۰۰µl الکل ۷۰ درصد به آن اضافه نموده و ۱۰ بار وارونه گردید لوله به‌مدت ۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰rpm سانتریفوژ گشت. لوله را دکانته کرده و پس از اینکه کاملاً خالی شد در Dry plate در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا کاملاً الکل موجود در لوله از بین برود پس از خشک شدن کامل، ۱۰۰µl آب دوبار تقطیر استریل دیونیزه به لوله اضافه کرده و برای بهتر حل شدن DNA در آب حدود ۵ دقیقه دوباره لوله در Dry plate در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. برای هر ۵۰ نمونه تست PCR انجام گرفت. نتایج تست بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد و سایبر گرین ونور UV توسط دستگاه ترنس ایلومینیتور مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها

بهینه نمودن تست PCR

پس از بهینه کردن تست PCR از جهت اجزا و پروفایل حرارتی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی *سودوموناس ائروژینوزا* طبق برنامه حرارتی مناسب، یک دور PCR در مورد آن اجرا شد و DNA سوش استاندارد در کنار نمونه کنترل منفی و در کنار سایز مارکر بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد مورد ارزیابی قرار گرفت. در الکتروفورز محصول PCR، باند اختصاصی حاصل از آمپلیکون مورد نظر که ۵۰۴ جفت باز طول داشت، قابل رویت بود.

تعیین حساسیت تست PCR

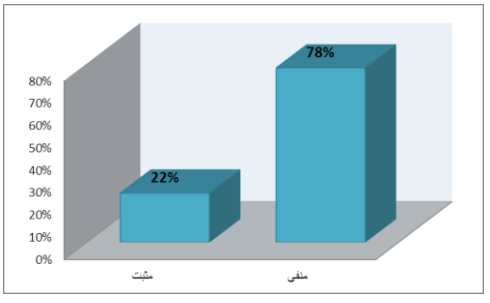
تست حساسیت PCR با تهیه رقت‌های متوالی از DNA *سودوموناس ائروژینوزا* انجام گرفت که نتایج حساسیت تست PCR نشان داد که با وجود فقط ۱۰ کپی از DNA، تکثیر انجام می‌گیرد و در تیترهای کمتر از ۱۰ کپی از DNA باندی مشاهده نشد که نشان از حساسیت بالای تست می‌باشد.

تعیین ویژگی تست PCR

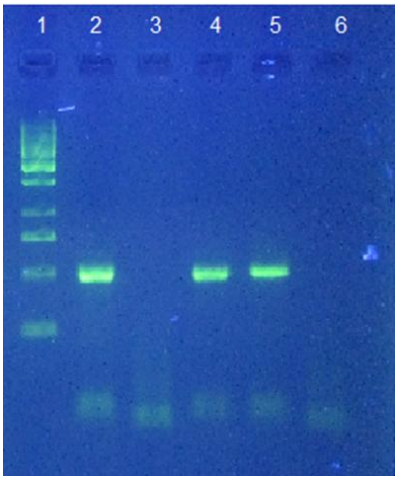
تست ویژگی PCR با DNA گونه‌های مختلف مانند انسان (Human)، موش (Mouse)، *ساکارومیسس سرویزیه* (*Saccharomyces cerevisiae*)، *اشرشیاکلی* (*Escherichia coli*)، *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* (*Mycobacterium tuberculosis*)، *توکسوپلاسما گوندی* (*Toxoplasma gondii*) و cDNAی ویروس HCV انجام گرفت و هیچ نوع محصول و باند ناخواسته‌ای مشاهده نگردید که نشان‌دهنده این است که تست PCR دارای ویژگی بسیار بالایی می‌باشد و فقط با DNA *سودوموناس ائروژینوزا* واکنش نشان داده است.

انجام تست PCR بر روی نمونه‌های بیماران

DNA تعداد ۵۰ نمونه از سینوس‌های پارانازال به روش DNP استخراج گردید و مورد تست PCR قرار گرفتند. تعداد ۱۱ نمونه (۲۲ درصد) نتیجه مثبت قطعی نشان دادند (نمودار ۱). شکل ۱ نتیجه تست PCR، در تعدادی از نمونه‌های مورد مطالعه را نشان می‌دهد.



نمودار ۱) نتیجه تست PCR بر روی نمونه‌های بیماران مبتلا به سینوزیت مزمن



شکل ۱) نتیجه تست PCR نمونه‌های شماره ۳۶ تا ۳۸: لاین ۱: سایز مارکر فرمنتاس Kb DNA Ladder۱، لاین ۲: کنترل مثبت. لاین ۳: محصول واکنشPCR نمونه ۳۶(منفی)، لاین ۴: محصول واکنش PCR نمونه ۳۷ (مثبت)، لاین ۵: محصول واکنشPCR نمونه ۳۸ (مثبت)، لاین ۶: کنترل منفی

بحث

بیماری‌های سینوس‌های پارانازال بخش قابل ملاحظه‌ای از هزینه‌های درمانی سالانه را به‌خود اختصاص داده است. معمولاً مطالعات میکروبیولوژیک بر روی سینوزیت مزمن نشان داده است که این

عفونت با جداسازی ۶-۱ ایزوله در هر نمونه، یک عفونت چند میکروبی می‌باشد (۵).

در زمینه تشخیص سینوزیت مزمن تاکنون مطالعات فراوانی صورت گرفته است. به عنوان مثال در سال ۱۹۸۲ شاپیرو (Shapiro) و همکاران در مطالعه‌ای سینوس‌های فکی ۲۰ بیمار با سیستیک‌فایبروزیس را با روش‌های رادیوگرافی و آسپیراسیون سینوس‌ها تحت شرایط کاملاً استریل مورد آزمایش قرار دادند و از روش کشت برای تشخیص عوامل ایجاد کننده این بیماری استفاده کردند که باکتری شناسایی شده در ۱۳ نفر از ۲۰ نفر یعنی ۶۵ درصد نمونه‌ها *Pseudomonas aeruginosa* بود (۹). همچنین در سال ۲۰۰۲ در مطالعه‌ای پیکورن (Pikorn) و همکاران با استفاده از کشت سواب و آسپیراسیون اندوسکوپیک از ۸۱ بیمار مبتلا به سینوزیت مزمن کشت تهیه کردند و دریافتند که مهم‌ترین پاتوژن‌های ایجاد کننده این بیماری *Staphylococcus aureus* (۲۶ درصد)، استافیلوکوکوس‌های کواگولاز منفی (۱۸ درصد) و *Pseudomonas aeruginosa* (۱۲ درصد) می‌باشد (۱۰). در همان سال فاینگلد (Finegold) و همکاران در مطالعه‌ای که برای ارزیابی یافته‌های باکتریولوژیک در ارتباط با سینوزیت فکی مزمن باکتریایی انجام دادند از ۸۲ بیماران قبل از درمان نمونه‌گیری کردند و با کشت دادن نمونه‌ها در ۱۵/۷ درصد آن‌ها *سودوموناس آئروژینوزا* را تشخیص دادند (۱۱).

بنابراین می‌توان گفت *سودوموناس ائروژینوزا* یکی از عوامل شایع ایجاد کننده سینوزیت مزمن می‌باشد. استفاده از روش‌های مولکولی همچون PCR که تکنیکی ساده و سریع است و در موارد تعداد زیاد نمونه در مدت زمان کوتاهی قابل انجام است، خطاهای تشخیصی را به میزان بسیار بیشتری پائین می‌آورد و حساسیت روش‌های تشخیصی را بالا می‌برد. به همین جهت ما در این مطالعه از روش PCR که یک روش دقیق‌تر و سریع‌تر است و دارای حساسیت و اختصاصیت بیشتری نسبت به روش کشت می‌باشد برای شناسایی *سودوموناس ائروژینوزا* در بیماران مبتلا به سینوزیت مزمن استفاده کردیم.

در زمینه تشخیص سینوزیت‌های سودوموناسی با روش PCR تاکنون کمتر مطالعه شده است ولی مواردی از تشخیص این باکتری به روش PCR با نمونه‌های دیگر انجام گرفته است. برای تشخیص این ارگانیسم به روش PCR عموماً از ژن‌های ETA و oprL استفاده شده است به عنوان مثال در سال ۱۹۹۴، خان (Khan) و همکاران با استفاده از تکثیر قطعه bp ۳۹۶ منطقه اگزوتوکسین A (ETA) در سکانس ژن *P.aeruginosa* روش PCR را برای تشخیص این ارگانیسم در نمونه‌های بالینی و محیطی انجام دادند. حساسیت و اختصاصیت این تست به ترتیب ۱۰۰ درصد و ۹۸ درصد بود که اعتبار این روش در مطالعات تشخیصی و اپیدمیولوژیکی را تأیید کرد (۱۲). همچنین در سال ۲۰۰۴، جیرو و همکاران میزان جداسازی *سودوموناس آئروژینوزا* توسط روش کشت و روش PCR از نمونه خلط ۵۷ بیمار مبتلا به سیستیک فایبروزیس را با هم مقایسه کردند. روش PCR با استفاده از از ژن‌های هدف oprL و ETA انجام شد. در این مطالعه هماهنگی کامل بین روش کشت و PCR مشاهده شد و لوکوس oprL نسبت به لوکوس ETA حساس‌تر شناخته شد (۸).

در سال ۲۰۰۹، پیتر دشات (Pieter Deschaght) و همکاران برای تشخیص *سودوموناس آئروژینوزا* در نمونه‌های خلط بیماران مبتلا به سیستیک‌فایبروزیس

سه روش کشت، PCR معمولی و real-time PCR با استفاده از ژن هدف oprL را مورد مقایسه قرار دادند. در این مطالعه هیچ تفاوتی بین تشخیص این ارگانیسم با استفاده از روش‌های کشت، PCR و real-time PCR مشاهده نشد (۱۳). همچنین در سال ۲۰۱۰، این دانشمندان از روش PCR برای تشخیص *سودوموناس آئروژینوزا* در بیماران مبتلا به سیستیک فایبروزیس (CF) استفاده کردند و نشان دادند که استفاده از این متد برای شناسایی ژن OprL *سودوموناس آئروژینوزا* دارای اختصاصیت بالا و بسیار مناسب‌تر از روش‌های کلاسیک مانند کشت می‌باشد و می‌تواند برای تشخیص سریع *سودوموناس آئروژینوزا* در بیماران مبتلا به CF بسیار مورد استفاده قرار بگیرد (۱۴). در مطالعه حاضر هم در روش PCR از لوکوس oprL استفاده شد و حساسیت و اختصاصیت ۱۰۰ درصد به‌دست آمد. نمونه‌های این مطالعه مشخصاً از بیماران مبتلا به سینوزیت مزمن در حین عمل جراحی گرفته شدند و در ۲۲ درصد آن‌ها *سودوموناس آئروژینوزا* تشخیص داده شد.

همان‌طور که ذکر شد *سودوموناس ائروژینوزا* یکی از شایع‌ترین عوامل ایجادکننده سینوزیت مزمن بوده که میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن بسیار بالا است و تنها راه کنترل بیماری پیشگیری از طریق تشخیص به‌موقع بیماری می‌باشد. بنابراین تشخیص سریع این باکتری می‌تواند در شناسایی عامل بیماریزا در مراحل اولیه بیماری و کنترل آن نقش به‌سزایی داشته باشد. تکنیک PCR که در این مطالعه برای تشخیص *سودوموناس ائروژینوزا* استفاده شد دارای دقت و صحت بالایی است و از این روش می‌توانیم در تشخیص سریع این ارگانیسم در بیماران مبتلا به سینوزیت و همچنین سایر عفونت‌های ناشی از این باکتری استفاده کنیم.

سپاس و قدردانی

بدین وسیله کمال تشکر و قدردانی خود را از کمک‌های بی‌شائبه مؤسسه دانش بنیان ایرانیان ژن فناور و پرسنل محترم این موسسه و همچنین جناب آقای دکتر محمد فرهادی رئیس بخش گوش و حلق و بینی بیمارستان رسول اکرم (ص) و جناب آقای دکتر محبی ابراز می‌نمائیم.

References:

1.Pleis JR, Lucas JW, Ward BW. Summary health statistics for US adults: National Health Interview Survey, 2008. Vital and health statistics Series 10, Data from the National Health Survey 2009:1-157.
2.Anon, JB. Upper respiratory infections. Am J Med 2010; 123: S16-25.
3.Wormald P. Treating acute sinusitis. Australian Prescriber 2000; 23: 39-42.
4.Brown CA, Paisner HM, Biel MA, et al. Evaluation of the microbiology of chronic maxillary sinusitis. Ann Otol Rhinol Laryngol 1998; 107: 942-5.
5.Brook I. Acute and chronic bacterial sinusitis. Infect Dis Clin North Am 2007; 21: 427-48.
6.Danielides V, Nousia CS, Gesouli E, et al. Recurrent facial pain due to Pseudomonas aeruginosa sinusitis. Rhinology 2002; 40: 226-8.
7.Vernet G. Molecular diagnostics in virology. J Clin Virol 2004; 31: 239-47.
8.Jiru Xu, E Moore J, G Murphy P, et al. Early detection of Pseudomonas aeruginosa – comparison of conventional versus molecular (PCR) detection directly from adult patients with cystic fibrosis (CF). Ann Clin Microbiol Antimicrob 2004; 3: 21.
9.Shapiro ED, Milmoe GJ, Wald ER, et al. Bacteriology of the maxillary sinuses in patients with cystic fibrosis. J Infect Dis 1982; 146: 589-93.

10.Tantili Pikorn P, Fritz M, Tanabodee J, et al. Comparison of endoscopic culture techniques for chronic rhinosinusitis. Am J Rhinol 2002; 16: 255-60.
11.Finegold SM, Flynn MJ, Rose FV et al. Bacteriologic findings associated with chronic bacterial maxillary sinusitis in adults. Clin Infect Dis 2002; 35: 428-33.
12.Khan AA, Cerniglia CE. Detection of Pseudomonas aeruginosa from clinical and environmental samples by amplification of the exotoxin A gene using PCR. Appl Environ Microbiol 1994; 60: 3739-45.
13.Deschaght P, De Baere T, Van Simaey L, et al. Comparison of the sensitivity of culture, PCR and quantitative real-time PCR for the detection of Pseudomonas aeruginosa in sputum of cystic fibrosis patients. BMC Microbiol 2009; 9: 244.
14.Deschaght P, Schelstraete P, Santiago GL, et al. Comparison of culture and qPCR for the detection of Pseudomonas aeruginosa in not chronically infected cystic fibrosis patients. BMC Microbiol 2010; 10: 245.

ISMJ 2015; 18(4): 720-728

Original Article

Evaluation of prevalence of Pseudomonas aeruginosa infection in operated patients with Chronic Sinusitis in Rasoule Akram Hospital by Polymerase Chain Reaction (PCR)

H. Shafienia [1], MH. Shahhosseiny [2,3*], M. Bayat [4], MA. Mahmoudi [3], M. Rabiei Nematabad [3], M. Farhadi [5]

[1] Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University,Tehran, Iran
[2] Department of Microbiology, Shahr-e-Qods branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[3] Iranian Gene Fanavar Institute (IGF), Tehran, Iran
[4] Department of veterinary Mycology , Science and research branch , Islamic Azad university, Tehran,Iran
[5] Research Center for Diseases of Ear, Nose and Throat, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received 11 Mar, 2014 Accepted 13 Aug, 2014)

Absract

Background: Chronic sinusitis(CS) is one of the most prevalent chronic illnesses that affecting persons of all age groups. It is an inflammatory process that involves the paranasal sinuses. There isn't definitive and consistent data concerning the distribution of bacterial species in patients with Chronic Sinusitis. *Pseudomonas aeruginosa* has emerged as a potential pathogen in the immunocompromised patients, so this microorganism is one of the most important cause of Chronic sinusitis. The purpose of this study is molecular detection of sinusitis caused by *P.aeruginosa*.

Material and Methods: 50 specimens was provided from the secretion of maxillary and frontal sinuses of patients from Rasoule Akram hospital during operation. Genomic bacterial DNA was extracted by DNP kit and detection of this bacteria was proceeded by employing sequence-specific target namely the outer membrane protein (oprL) gene locus and designing primers. PCR optimized and sensitivity and specificity tests was performed. Amplicon was cloned by T/A Cloning method and was used for sequencing and positive control.

Results: The product of optimized PCR with 504 bp length correctly amplified and observed on electrophoreses gel 1.5% and confirmed by sequencing. Evaluation of the selected primers with 8 various DNA demonstrated 100% specificity. Sensitivity of optimized test was Evaluated 10 CFU of bacteria. From the 50 samples, 22% of specimens were positive for *P.aeruginosa*.

Conclusion: This study indicates that molecular detection of *P.aeruginosa* employing the oprL gene target is a rapid and useful technique for detection of *P.aeruginosa*.

Key words: Sinusitis, *Pseudomonas aeruginosa*, Polymerase Chain Reaction, Molecular Diagnosis

***Address for correspondence*: Mohammad Hassan Shahhosseiny, Department of Microbiology, Islamic Azad University, Qods branch, Tehran, Iran. Email: shahosseiny@yahoo.com