Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences and Health Services
Vol. 36, No. 4, Oct. – Nov. 2014, Pages: 56-61

Development of a Multiplex PCR for Detection of Common Causative Agent of Respiratory Tract Infections Include *Streptococcus Pneumonia, Staphylococcus Aureus, KlebsiellaPneumonia and Mycobacterium Tuberculosis*

Abbas Rami[1], Fatemeh Kazemi-Lomedasht[2], Mohammad Reza Pourshafie[1*]

[1]Department of Microbiology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
[2]Biotechnology Research Center, Venom and BiotherapeuticsMolecules Lab, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Received: 3 Nov, 2013 Accepted: 10 Feb, 2014

Abstract

Background and Objectives: Pneumonia is caused by a range of microorganisms. The incidence of bacterial pneumonia can be divided into two categories: hospital-acquired pneumonia and community-acquired pneumonia. Community acquired Pneumonia is a related leading cause in different populations. *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumonia* are the most common cause of hospital-acquired pneumonia, and *Streptococcus pneumonia* and *mycobacterium tuberculosis* are Cause of community-acquired pneumonia. The aim of this was to investigate the common causative factors of respiratory tract infections include *Streptococcus pneumonia, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumonia and mycobacterium tuberculosis* using multiplex PCR was the main aim of this study.

Materials & Methods: This study was experimental development. Multiplex PCR is a rapid, accurate molecular method for the simultaneous detection of two or more specific genes in a reaction.In this study, multiplex PCR method for simultaneous detection in the genome-specific sequences leading causes of pneumonia (*Streptococcus pneumonia, mycobacterium tuberculosis, Staphylococcus aurous and Klebsiella pneumonia*) was done. Specific genes that we chose in this study were: *ply* (pneumolysin) for *Streptococcus pneumonia, nuc* (thermonuclease) for the *staphylococcus aureus, gyrA* (gyrase A) for *Klebsiella pneumoniae* and pncA gene for *Mycobacterium tuberculosis*, also the *16s* ribosomal gene was used as a positive control.

Results: After set-up procedure and observing specific bands, sequencing was confirmed the accuracy of observed bands.Our results showed that the detection of *Streptococcus pneumoniae, Staphylococcus aureus, Klebsiellapneumoniae and Mycobacterium tuberculosis* in a Multiplex PCR reaction is possible.

Conclusion: In fact, this method can be used for direct and simultaneous detection of these agents in the respiratory specimens.

Keywords: Multiplex PCR ،Respiratory Tract Infections, *Streptococcus Pneumonia, StaphylococcusAureus, KlebsiellaPneumonia, Mycobacterium Tuberculosis*

*Corresponding author:
E-mail:pourshafie@pasteur.ac.ir

مقاله پژوهشی

طراحی یک روش مولتیپلکس پی سی آر برای شناسایی باکتری های شایع عامل عفونت های تنفسی

عباس رمی[۱]، فاطمه کاظمی لمعه دشت[۲]، محمد رضا پورشفیع[۱*]

[۱]بخش میکروب‌شناسی، انستیتو پاستور ایران،تهران، ایران
[۲]مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، آزمایشگاه ونوم و فرآورده های بیولوژیک، انستیتو پاستور ایران،تهران، ایران

دریافت: ۹۲/۸/۱۲ پذیرش: ۹۲/۱۱/۲۱

چکیده

زمینه و اهداف:پنومونی بوسیله طیف وسیعی از باکتری‌ها و ویروس‌ها ایجاد می‌شود. پنومونی اکتسابی از جامعه، یک عامل برجسته بیماری در جوامع مختلف است. پنومونی باکتریال از نظر نحوه ابتلا به دو دسته تقسیم می‌شود: پنومونی‌های اکتسابی از بیمارستان و پنومونی‌های اکتسابی از جامعه *استافیلوکوکوس اورئوس و کلبسیلا پنومونیه* از شایع‌ترین عوامل پنومونی‌های اکتسابی از بیمارستان هستند و *استرپتوکوک پنومونیه و مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* باکتری‌های شاخص پاتوژنی می‌باشند که عامل پنومونی‌های اکتسابی از جامعه هستند. هدف از انجام این مطالعه تشخیص عوامل عفونی ذکر شده از طریق مولتیپلکس پی سی آر (Multiplex Polymerase Chain Reaction) می باشد.

مواد و روش ها: مولتیپلکس پی سی آر روش مولکولی دقیق و سریعی است که برای تشخیص هم‌زمان دو یا چندین ژن اختصاصی در یک واکنش بکار می‌رود. این مطالعه از نوع توسعه تجربی می باشد در آن از روش مولتیپلکس پی سی آر برای تشخیص همزمان سکانس‌های اختصاصی ژنوم عوامل برجسته پنومونی (*استرپتوکوکوس پنومونیه، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، استافیلوکوکوس اورئوس و کلبسیلا پنومونیه*) بهره می‌گیریم. ژن‌های اختصاصی که ما در این مطالعه انتخاب کردیم:پنومولیزین برای *استرپتوکوکوس پنومونیه*، ترمونوکلئاز برای *استافیلوکوکوس اورئوس*، ژیراز برای *کلبسیلا پنومونیه* و *pncA برای مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* می‌باشند. همچنین ما در این مطالعه از ژن *s16* ریبوزومی بعنوان کنترل مثبت استفاده کردیم.

یافته ها: بعد از ست کردن روش و مشاهده‌ی باندهای اختصاصی، جهت تایید نهایی باندهای مورد نظر از ژل استخراج گردید و برای تعیین توالی (Sequencing) فرستاده شد.نتایج مطالعه ما نشان داد که تشخیص همزمان *استرپتوکوکوس پنومونیه، استافیلوکوکوس اورئوس، کلبسیلا پنومونیه و مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* در یک واکنش پی سی آر میسر می‌باشد.

نتیجه گیری: در واقع می‌توان از این روش در تشخیص مستقیم و همزمان این عوامل در نمونه‌های تنفسی بهره‌گیری کرد.

کلید واژه ها: مولتیپلکس پی سی آر، عفونت های تنفسی، *استرپتوکوکوس پنومونیه، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، استافیلوکوکوس اورئوس و کلبسیلا پنومونیه*

* ایمیل نویسنده: pourshafie@pasteur.ac.ir

مقدمه

پنومونی بیماری است که از زمان‌های بسیار دور شناخته شده بود(۱). **عفونت‌های مجاری تنفسی تحتانی**یکی از عوامل شایع ایجادکننده بیماری‌های جدی کشنده و ناتوان‌کننده در کودکان و بزرگسالان در سراسر دنیا می‌باشند(۲). پاتوژن‌های عامل LRTI در سه گروه دسته‌بندی می‌شوند:

۱)**باکتری‌های مرسوم(تیپیک)** شامل *استرپتوکوکوس پنومونیه، هموفیلوس آنفلوانزا، استافیلوکوکوس اورئوس* و ارگانیسم‌های گرم منفی مختلف

۲)**ویروس‌های تنفسی** از جمله RSV ، *آنفلوانزا* و *پاراآنفلوانزا.*

۳)**باکتری‌های غیرتیپیک**: *مایکوپلاسما پنومونیه، کلامیدیاپنومونیه،*

کلامیدیا پسی‌تاسی و گونه‌های مختلف *لژیونلا*.واژه آتیپیکبیانگر تفاوت‌های علائم بالینی در سه دسته پاتوژن‌های فوق است. البته عوامل دیگری هم می‌توانند باعث ایجادLRTI شوند از جمله قارچ‌ها، باکتری‌های بی‌هوازی، مایکوباکتریوم‌ها مثل*توبرکلوزیس*(۲-۳). پنومونی یا پنومونیت، التهاب داخلی و پیرامونی فضاهای آلوئولی ریه است(۴). این بیماری از عفونت‌های مجاری تنفسی تحتانی است که بشکل عمده از معضلات بهداشتی در سراسر جهان بشمار می رود. مرگ ومیر ناشی از پنومونی‌های باکتریایی ۲/۷ برابر بیشتر از پنومونی‌های ویروسی می‌باشد(۴).پاتوژن‌های مسبب پنومونی، روش‌های اکتساب آنها و نتایج بالینی مختلف تیپ‌های متفاوت پنومونی منجر به شناخت سه تیپ از این بیماری شده است: ۱) پنومونی‌های اکتسابی از جامعه ۲) پنومونی‌های اکتسابی از بیمارستان و ۳) پنومونی در بیماران سرکوب ایمنی(۱). حدود ۴۰ تا ۶۰٪ از این بیماریها بدون تشخیص باقی می‌مانند که علت آن عدم مراجعه بیمار، عدم ارجاع پزشک و نیز در اختیار قرار ندادن نمونه برای آزمایش می‌باشد. دلیل دیگر حساسیت و اختصاصیت متغیر در روش‌های تشخیصی معمول است(۵). اکثر این عفونت‌ها بطور موفقیت‌آمیزی توسط عوامل ضد میکروبی قابل درمان هستند(۶). تعیین هویت عوامل ایجادکننده پنومونی دارای اهمیت بالایی مخصوصا از نظر بهداشت عمومی و برنامه‌ریزی جهت درمان بیماری می‌باشد(۲). تست‌های تشخیصی نقش حیاتی را در انتخاب داروی ضدمیکروبی مناسب و نتیجه مطلوب بالینی بازی می‌کنند(۶). در اکثر مطالعات بیشترین موارد ایجادکننده پنومونی اکتسابی از جامعه *راسترپتوکوکوس‌پنومونیه* در تمام گروه‌های سنی حتی کودکان شامل می‌شود(۴-۵, ۷). در پنومونی‌های اکتسابی از بیمارستان ارگانیسم‌های گرم منفی مثل *کلبسیلا پنومونیه*، *سودوموناس* وگرم مثبت مثل *استافیلوکوکوس اورئوس* در بیشتر موارد مشاهده شده‌اند(۴, ۸-۱۰). از روش‌های متنوعی برای تشخیص پنومونی بهره‌گیری شده‌است؛ مثلا جداسازی باکتری از خون، مایع جنب(Pleural)، بیوپسی بافت ریه، برونکوسکوپی، برونکوآلوئولار لاواژ(BAL)و کشت آن(۱۱). نتایج کشت خلط و خون ممکن است تا ۲-۳ روز در دسترس قرار نگیرند. تست‌های سرولوژی نیز تا موقعی که نمونه دوم سرم بعد از ۲-۳ هفته گرفته نشوند قابل اعتماد و معتبر نیستند(۱۲).متدهایی بر پایه تکثیر اسیدهای نوکلئیک(NAAT(nucleicacidamplificationtests طراحی شده است که از نظر صحت(accuracy)، حساسیت و زمان جوابدهی بهینه شده‌اند و برای ردیابی پاتوژن‌های تنفسی مورد استفاده قرار می‌گیرند(۱۳).روش مولتیپلکس پی سی آریکی از انواع روش‌های PCR است که در آن دو یا چند سکانس هدف را با استفاده از دو یا چند جفت پرایمر در یک واکنش واحد می‌توان تکثیر داد. این روش می‌تواند به‌طور قابل توجهی حفظ زمان و کاهش زحمت و هزینه در آزمایشگاه مورد استفاده قرار گیرد(۱۳). ما در این مطالعه به طراحی و بهینه‌سازی یک روش مولتیپلکس پی سی آر برای شناسائی همزمان چهار مورد از مهمترین باکتری‌های تنفسی می‌پردازیم. این باکتری‌ها شامل*استرپتوکوکوس‌پنومونیه* و *مایکوباکتریوم‌توبرکلوزیس* برای پنومونی‌های اکتسابی از جامعه و *استافیلوکوکوس‌اورئوس و کلبسیلاپنومونیه*برای پنومونی‌های اکتسابی از بیمارستان می‌باشند.

مواد و روش‌ها

همه سویه‌ها در محیط کشت بلادآگار کشت داده شدند. محیط‌های حاوی *استافیلوکوک* و *کلبسیلا* در دمای ۳۷درجه به مدت یک شبانه روز انکوبه شدند. *پنوموکوک* نیز در محیط بلادآگار و دمای ۳۷ و ۵٪ دی‌اکسیدکربن به‌مدت یک شبانه روز انکوبه شد. سویه مورد استفاده *مایکوباکتریوم* نیز در بخش سل و تحقیقات ریوی و در محیط لون اشتاین به مدت چهار هفته کشت داده شد.در این مطالعه ژن‌هایی از باکتری‌ها انتخاب شدند که در باکتری مورد نظر منحصربه‌فرد بوده و نیز در تمام سویه‌های آن باکتری بصورت داخلی و حفاظت شده حضور داشته باشند. این ژن‌ها در مطالعات گوناگونی برای شناسائی این باکتری‌ها مورد بصورت اختصاصی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. برای *استرپتوکوک‌پنومونیه*، *استافیلوکوکوس‌اورئوس*، *کلبسیلاپنومونیه*، *مایکوباکتریوم‌توبرکلوزیس* به ترتیب، ژن‌های اختصاصی *pncA*،*gyrA*،*nuc*،*ply* مورد هدف قرار گرفت. این ژن‌ها از سایت NCBI استخراج و پرایمرهای انتخابی از مقاله با آنها چک شد. برخی از پرایمرها نیز بر همین مبنا طراحی و چک شد(جدول ۱).

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده

نام باکتری	توالی پرایمر ۵ ۳	طول محصول
کلبسیلا پنومونیه	F: GTCTGGCGTATGTTGACGATGAA R:GTTTCTGCAGACGCAGATCCAGA	۸۱۶
استافیلوککوس اورئوس	F: GCGATTGATGGTGATACGGTT R: AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC	۲۷۹
استافیلوککوس پنومونیه	F: CCCACTCTTCTTGCGGTTGA R: TGAGCCGTTATTTTTTCATACTG	۲۰۹
مایکوباکتریوم توبرکلوزیس	F:ATGCGGGCGTTGATCATCGTC R: CGGTGTGCCGGAGATGCGG	۱۸۶
۱۶S مشترک	F:GCAAACAGGATTAGATACCC R: CGTCATCCCCACCTTCCTCC	۴۲۷

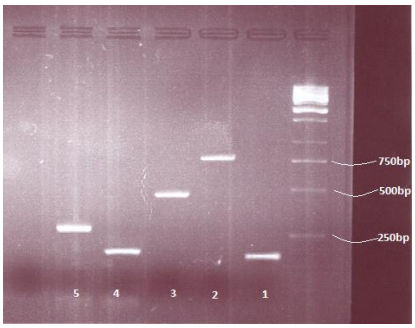
این پرایمرها تماما در سایت NCBI بلاست شده و الگوهای مناسبی از نظر اختصاصیت مشاهده شد. همچنین برای چک کردن و آنالیز آنها از نظر درصد تشکیل لوپ، جفت‌شوندگی بازها، ΔGو غیره از نرم‌افزار generuner و سایتMPCR بهره‌گیری شد. بعد از رشد باکتری‌ها در محیط‌های کشت و بعد از پروسه استخراج DNA با استفده از کیت استخراج peQ-lab، آزمون singlePCR برای تک‌تک باکتری‌های مورد مطالعه، طبق پروتکل زیر انجام شد:بعد از انجامPCR(شرایط دمایی واکنش:۹۵ درجه ۳۰ ثانیه، ۹۴ درجه ۳۰ثانیه، ۷۲ درجه ۷۰ ثانیه و تعداد ۴۵ سیکل)برای سکانس مورد نظر هر باکتری، استخراج‌های DNA مخلوطی از کلنی‌های **دوتائی**(*کلبسیلا و استافیلوکوک*)(گروه A)، **سه‌تائی**(*کلبسیلا، استافیلوکوک و پنوموکوک*)(گروه B) و **چهارتائی**(گروه C)انجام گرفت تا روند بهینه‌سازیMultiplexPCR سویه‌ها با این ترتیب صورت گیرد. به طور جداگانه روند بهینه‌سازی هر یک از این سه مخلوط DNA در مراحل کلی زیر به انجام رسید(بجز مرحله ۵):

۱) انتخاب حداقل متریال مورد نیاز برای حصول مطلوب‌ترین باندها؛
۲) انتخاب مطلوب‌ترین دمای آنیلینگ برای بدست آوردن بهترین باندها و حذف باندهای کاذب احتمالی؛ بعد از انجام گرادیانت پی سی آرمناسب‌ترین دمای آنیلینگ ۶۲درجه تعیین شد..
۳) انتخاب تعداد سیکل‌های مناسب(۴۵) برای برطرف شدن مشکل کمرنگ بودن ویا پررنگ بودن بیش از حد باندها؛
۴) انتخاب مدت‌زمان مناسب برای extention؛
۵) بررسی و سنجش حداقل حجم و رقت DNA قابل شناسائی توسط این روش تشخیصی؛ رقت‌هایی سریالی از سوسپانسیون‌های هر یک از سه مخلوط میکروبی با مرجعیت دو مک‌فارلند (6×10^8cfu/ml)، بر پایه‌ی ۰/۱ و تا ۵ رقت در سرم فیزیولوژی استریل تهیه شد که در نتیجه‌در آخرین رقت 6×10^4cfu/ml سلول باکتری وجود دارد(شکل ۱).DNAای این ۱۵ لوله استخراج و الکتروفورز انجام شد(شکل ۲).
۶) انجام مولتیپلکس پی سی آر؛ بعد از انتخاب و هم‌خوان کردن دمای آنیلینگ و میزان پرایمرها و دیگر متریال PCR، ۵ رقت DNA از هر سه گروه باکتری که تهیه شده بود مورد آزمایش مولتیپلکس پی سی آر قرار گرفت.
۷) تعیین توالی (Sequencing).

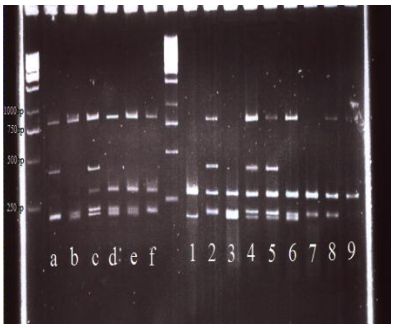
یافته ها

استخراج DNAبا استفاده از کیت استخراج DNA انجام گردید و سپس آزمون پی سی آر به صورت جداگانه برای تک تک کلنی ها به انجام رسید(شکل شماره۱).پس از مشاهده‌ی باندهای اختصاصی گرادیانت پی سی آر برای کلنی ها به ترتیب قابل مشاهده در شکل ۱ ب گذاشته شد. تست‌های مولتیپلکس پی سی آر برای گروه‌های ترکیبی A تا C در ۵ رقت به انجام رسید(شکل ۲). گروه A شامل باکتری های پنوموکوک(۲۰۹ bp) و *استافیلوکوک*(۲۷۹ bp)، *کلبسیلا*(۸۱۶ bp) می باشد(شکل ۲ الف). گروه B شامل باکتری های به *مایکوباکتریوم*(۱۸۶ bp)، *کلبسیلا*(۸۱۶ bp)، *پنوموکوک*(۲۰۹ bp) و *استافیلوکوک*(۲۷۹ bp) می باشد(شکل ۲ب). گروه C شامل باکتری های *مایکوباکتریوم،کلبسیلا،پنوموکوک و استافیلوکوک و همچنین* کنترل مثبت ژن *۱۶s* باکتری ها تحت عنوان universal(۴۲۷bp) می باشد(شکل ۲ج)

بعد از ست کردن روش مولتیپلکس پی سی آر در نمونه های ذکر شده و کنترل مثبت، باندهای اختصاصی در ژل الکتروفورز مشاهده گردید. باندهای مورد نظر از ژل استخراج گردید(با استفاده از کیت استخراج از ژل کیاژن) و جهت تایید نهایی برای سکوئنسینگ ارسال گردید. نتایج سکوئنسینگ با فرمهای FASTAیِ سکانس‌ها در سایت NCBI مقایسه شد که در همه آنها بیش از ۹۰٪ تشابه وجود داشت.و در واقع سکوئنسینگ صحت انجام پی سی آر و وجود باندهای اختصاصی را تایید کرد.

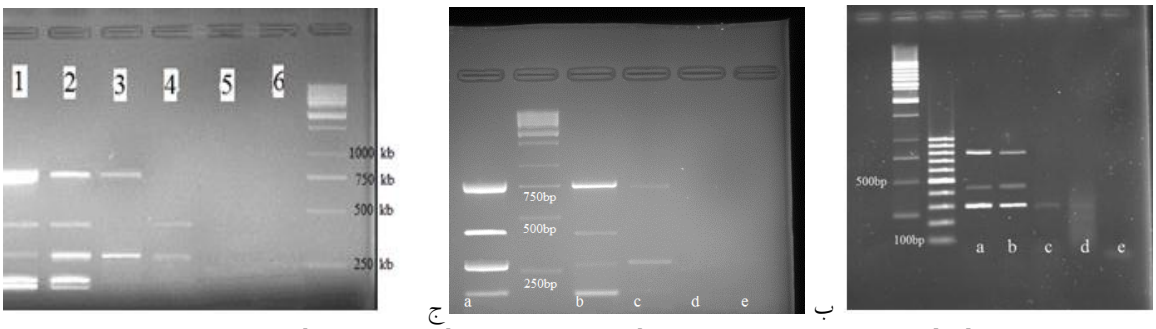


الف



ب

شکل ۱:الف) نتایج PCR سکانس‌های حاصل ازDNA استخراج شده به روش کیت استخراجDNA؛ باندهای شماره ۱ تا ۵ به‌ترتیب مربوط به *مایکوباکتریوم(۱۸۶ bp)، کلبسیلا(۸۱۶ bp)، universal(۴۲۷bp)،پنوموکوک(۲۰۹ bp) و استافیلوکوک(۲۷۹ bp)* می‌باشند.ب) الکتروفورز از آزمون PCR-gradiant؛ واکنش‌های a تا f به ترتیب در دماهای آنیلینگ ۶۳/ ۶۲/۵/ ۶۲/ ۶۱/ ۵۹/۵ و ۵۸/۷درجه و واکنش‌های ۱ تا ۹ نیز به ترتیب با دمای آنیلینگ ۶۴/ ۶۳/ ۶۲/۵/ ۶۲/ ۶۱/ ۵۹/۵/ ۵۸/۷/ ۵۸ و ۵۷درجه به انجام رسید.



ج ب الف

شکل۲:الف)نتایج Multiplex-PCR باکتری‌های گروهA: *پنوموکوک*(۲۰۹ bp) و *استافیلوکوک*(۲۷۹ bp)، *کلبسیلا*(۸۱۶ bp)، *مارکر به ترتیب از پایین به بالا*(۱۰۰-۲۰۰-۳۰۰-۴۰۰-۵۰۰-۶۰۰-۷۰۰-۸۰۰-۹۰۰-۱۰۰۰). *ب)*نتایج PCR گروهB:مایکوباکتریوم(۱۸۶ bp)، کلبسیلا(۸۱۶ bp)، پنوموکوک(۲۰۹bp) و استافیلوکوک(۲۷۹ bp). ج) نتایج PCR گروه C: *مایکوباکتریوم*(۱۸۶ bp)، *کلبسیلا*(۸۱۶ bp)، *universal* (۴۲۷ bp)،*پنوموکوک*(۲۰۹ bp) و *استافیلوکوک*(۲۷۹bp)

بحث

در این مطالعه ما از روش MultiplexPCR برای تشخیص همزمان *استرپتوکوکوس‌پنومونیه*، *مایکوباکتریوم‌توبرکلوزیس*، *استافیلوکوکوس‌اورئوس* و *کلبسیلاپنومونیه* استفاده کردیم. مطالعات متعددی از این روش برای تشخیص عوامل مختلف عفونت‌های سیستم تنفسی تحتانی اعم از عفونت‌های آتیپیک و تیپیک استفاده کرده‌اند. و در واقع مطالعه‌ی ما تاییدکننده‌ی مطالعات آنان بوده است. در ذیل به بررسی برخی از این مطالعات پرداخته می‌شود:

تورمن و همکاران در سال ۲۰۱۱ ، شناسایی همزمان گونه های باکتریایی *مایکوپلاسما پنومونیه*، *کلامیدیا پنومونیه* و *لژیونلا پنوموفیلا* را در نمونه های کلینیکی به روش MultiplexPCR بررسی کردند. در این مطالعه که در آتلانتای امریکا انجام شد، از سکانس های اختصاصی *MP181* در *مایکوپلاسما پنومونیه*، *Pan-leg*در *لژیونلا پنوموفیلا* که در ژن *ssrA* وجود داشت و *CP-arg*در *کلامیدیا پنومونیه* که در ژن کد کننده‌ی پروتئین ممانعت کننده‌ی آرژنین قرار داشت، بهره گیری شد. کارائی نهایی در این مطالعه ۹۰٪ تا ۱۰۰٪ بود. در سال ۲۰۰۸ لونز و همکاران، گونه های باکتریایی *مایکوپلاسما پنومونیه*، *کلامیدیا پنومونیه* و *لژیونلا پنوموفیلا* را در نمونه های بالینی در دانشگاه آنتورپ نوترلند به روش MultiplexPCR مورد بررسی و شناسایی قرار دادند. در این مطالعه که بر روی ۱۴۷ بیمار مبتلا به پنومونی اکتسابی از جامعه صورت گرفت، از ژن های(cytadhesin) *p1* برای *مایکوپلاسما پنومونیه*، قطعه‌ی *pst1* برای کلامیدیا پنومونیه و ژن*mip* برای *لژیونلا پنوموفیلا* بهره گیری شد.در سال ۲۰۰۶ کایس و همکاران به شناسایی گونه های باکتریایی *پنوموکوک*، *هموفیلوس آنفلوانزا* و *موراکسلا کاتارالیس* در نمونه های سیستم تنفسی تحتانی به طور همزمان پرداختند. آنها در این مطالعه که در دانشگاه کارولینسکا صورت گرفت از ژن های پنومولیزین برای *پنوموکوک*، فومارات ردوکتاز برای *هموفیلوس آنفلوانزا* و *ompB* برای *موراکسلا کاتارالیس* استفاده کردند. تکنیک MultiplexPCR در این مطالعه با کارایی ۱۰۰٪ به نتیجه رسید.یاجان وانگ و همکاران در سال ۲۰۰۸ یک روشMultiplexPCRرا برای شناسائی همزمان عوامل باکتریال تیپیک و آتیپیک پنومونی در کودکان بهینه‌سازی کردند. در این مطالعه، باکتری‌های استافیلوکوکس‌اورئوس، پنوموکوک، استرپتوکوکوس‌پایوژن، موراکسیلاکاتارالیس، هموفیلوس‌آنفلوانزای بدون کپسول، Hip، *بوردتلاپرتوزیس*، *کلبسیلاپنومونیه*، *لژیونلاپنوموفیلا*، *کلامیدیاپنومونیه*، *مایکوپلاسما* و *مایکوباکتریوم‌توبرکلوزیس* به ترتیب از طریق ژن‌های *ply*، *nuc*، *pare*، *copB*، *gyrB*، *capB*، *porin*، *gyrA*، *mip*، *pst-1*، *s-23s ۱۶*، *sen-reg* مورد شناسائی قرار گرفتند.در اکثر مطالعات بررسی شده بیشتر تمرکز بر باکتری‌های عامل عفونت‌های تنفسی آتیپیک بود. در حالیکه در مطالعه‌ای که ما انجام دادیم فوکوس بر روی باکتری‌های عامل پنومونی‌های تیپیک و شدید و بسیار شایع بوده است.در مورد *مایکوباکتریوم* نیز مطالعات اندکی در مورد انجام MultiplexPCR برای شناسائی آن در کنار باکتری‌های دیگر بصورت همزمان موجود است. سکانس‌هایی که در مطالعه ما برای شناسایی هدف قرار گرفت نیز گاهاً منحصربه‌فرد بود. مثلا پرایمرهای مورد استفاده برای شناسایی ژن *gyrA* *کلبسیلا* در نرم افزار طراحی و چک شد.

نتیجه‌گیری

راحت، سادگی و صرف زمان کم در انجام MultiplexPCR در تشخیص همزمان عوامل عفونی تنفسی ذکر شده یک مزیت عمده محسوب می‌شود. از این رو می‌توان از این روش در تشخیص این عوامل در نمونه‌های بالینی هم بهره برد. در واقع مطالعه ما مقدمه‌ای بر انجام این روش در نمونه‌های کلینیکی محسوب می‌گردد.

تقدیر و تشکر

این پروژه با بودجه انستیتو پاستور ایران صورت گرفته است. بدین وسیله از کلیه همکارانی که در بخش میکروب‌شناسی انستیتو پاستور ایران ما را یاری نمودند نهایت تشکر و قدردانی را داریم.

References

1. Woodhead M. Community-acquired pneumonia in Europe: causative pathogens and resistance patterns.*European Respiratory Journal* 2002;**36**: 20-27.
2. Daley JWaAJ. Microbiological aspects of bacterial lowerrespiratory tract illness in children:typical pathogens. *Paediatric Respiratory Reviews* 2007; **8**:204-211.
3. Yu-Shen Chen P-YL, Yung-Feng Huang, Chiao-Shan Chen, Ling-Hui Chiu, Nuan-Ya Huang, Kai-Sheng Hsieh, YaoShen Chen. Comparison of diagnostic tools with multiplexpolymerase chain reaction for pediatric lowerrespiratory tract infection: A single center study. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 2012;**xx**:1-6.
4. Daum SECaRS. Bacterial Pneumonia, Lung Abscessand Empyema. *Respiratory Infections* 2007;**12**:501-553.
5. Vladimir Kaplan M, Derek C. Angus MD. Community-acquired pneumonia in the elderly. *Critical Care Clinics* 2003;**19**: 729-748.
6. Bartlett JG. Diagnostic Tests for Agents of Community-Acquired Pneumonia. *Clinical Infectious Diseases* 2011;**52**:296-304.
7. Keith P, Klugman SAM, Werner C. Albrich. Novel Approaches to the Identificationof Streptococcus pneumoniae as the Causeof Community-Acquired Pneumonia. *Clinical Infectious Diseases* 2008;**47**:202-206.
8. Jeffrey C, Hageman TMU, John S, Francis Daniel B. Jernigan J,Gary Wheeler, et.al. Severe Community-acquiredPneumonia 8. Due to Staphylococcusaureus, 2003–04 Influenza Season. *Emerging Infectious Diseases* 2006;**12**:894-899.
9. Carmen Gonza´lez MR, Jose´ Romero-Vivas MGl, Picazo aJJ. Bacteremic Pneumonia Due to Staphylococcusaureus: A Comparisonof Disease Caused by Methicillin-Resistant and Methicillin-SusceptibleOrganisms. *Clinical Infectious Diseases* 1999;**29**:1171-1177.
10. Jenney AW, Farn JL, Wijburg OL,McGlinchey A. Seroepidemiology of Klebsiella pneumoniae in anAustralian TertiaryHospital and Its Implications for Vaccine Development. *Journal of Clinical Microbiology* 2006;**44**:102-107.
11. Nolte FS. Molecular Diagnostics for Detection of Bacterial andViral Pathogens in Community-Acquired Pneumonia. *Clinical Infectious Diseases* 2008; **47**:123-126.
12. Rob Bohte RvF, Pieter J van den Broek. Aetiology of community-acquired pneumonia: aprospective study among adults requiringadmission to hospital. *Thorax* 1995; **50**: 543-547.
13. Markoulatos NS, Moncany M. Multiplex Polymerase Chain Reaction: A Practical Approach. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 2002;**16**:47-51.