مقاله پژوهشی

طراحی کیت تشخیصی کلامیدیا تراکوماتیس در زنان علامت‌دار به روش Real time PCR

حمیده روحانی نژاد [۱*]، نگار رحمتی کیان [۲]، فهیمه نعمتی منصور [۳]، دریا امیری [۱]

۱- دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران
۲- گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی، تهران، ایران
۳- گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی، تهران، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۸/۰۵/۲۷ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۸/۰۷/۰۹

چکیده

زمینه و هدف: کلامیدیا تراکوماتیس یکی از شایع‌ترین علل عفونت‌های منتقلِ از راه جنسی در سراسر جهان است. غربالگری زنان برای عفونت‌های کلامیدیایی در کشورهای درحال‌توسعه به دلیل مؤثر نبودن روش‌های تشخیصی در دسترس، بسیار موردتوجه قرارگرفته است. هدف از انجام این تحقیق دستیابی به روشی است که تشخیص عفونت کلامیدیا تراکوماتیس را در زنان دارای علامت سهولت ببخشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تعداد ۵۰ نمونه بالینی (واژینال) از زنان علامت‌دار جمع‌آوری شد. پس از استخراج DNA، توالی ژن OMP1 به‌عنوان ژن منتخب از بانک ژن استخراج گردید. سپس، با استفاده از نرم‌افزار Mega6 پرایمرهای اختصاصی طراحی گشت. با نمونه‌های DNA استخراج‌شده PCR گذاشته شد و صحت پرایمرهای طراحی‌شده تائید شد. به‌منظور ساخت کنترل مثبت محصول PCR در وکتور، کلون شد. جهت تعیین حساسیت Real time PCR، رقیق‌سازی DNA از کنترل مثبت صورت گرفت و با رقت‌های مختلف Real time PCR گذاشته شد و همچنین جهت تعیین اختصاصیت Real-time PCR، DNA باکتری‌های ناحیه واژن استخراج و Real-time PCR انجام شد.

نتایج: در این تحقیق توانستیم به‌وسیله تکنیک مولکولی پیشرفته Real-time PCR کیتی طراحی کنیم که دارای ۱۰ پیکوگرم حساسیت و ۱۰۰ درصد اختصاصیت در تشخیص عفونت کلامیدیایی در زنان علامت‌دار است.

نتیجه‌گیری: با پرایمرهای طراحی‌شده و روش ریل تایم می‌توان تشخیص ۱۰۰ درصد نسبت به عفونت‌های کلامیدیا داشت.

کلمات کلیدی: Real time PCR، کلامیدیا تراکوماتیس، OMP1

مقدمه

کلامیدیا تراکوماتیس ازجمله شایع‌ترین عوامل بیماری‌های منتقلِ از راه جنسی در دنیا است (۱). طبق آمار سازمان بهداشت جهانی، سالیانه بالغبر ۹۲ میلیون مورد عفونت کلامیدیایی ادراری-تناسلی جدید در دنیا رخ می‌دهد که البته شیوع این عفونت در میان زنان بیشتر است. سیر صعودی عفونت کلامیدیایی در سرویکس رحم سبب بروز بیماری‌های التهابی لگن می‌شود و همچنین در طول دوره بارداری، پارگی غشای کوریوآمنیوتیتی، زایمان زودرس و عفونت‌های دوره بارداری و انتقال عفونت به نوزاد از طریق کانال زایمان می‌گردد و حتی افزایش خطر سرطان دهانه رحم را به دنبال دارد (۲). یکی از مشکلاتی که درزمینه‌ی تشخیص و درمان عفونت‌های کلامیدیایی وجود دارد، این است که ۷۰ تا ۸۰ درصد زنان و ۵۰ درصد از مردان مبتلا به عفونت فاقد علامت می‌باشند (۳، ۴).

سویه‌های کلامیدیا تراکوماتیس به سرووارهای متعددی مبنی بر تفاوت‌های توالی نوکلئوتیدی OMPa، ژن مسئول کدگذاری پروتئین غشای خارجی (MOMP) تقسیم‌بندی می‌شوند. کلامیدیاها قادر به سنتز ترکیبات پرانرژی سلول ازجمله: ATP،

*نویسنده مسئول: **حمیده روحانی نژاد**، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران
Email: rohaninejhad@gmail.com
https://orcid.org/0000-0002-8353-6542

GTP و UTP نیستند و به‌عنوان یک بیماری‌زای اجباری درون‌سلولی شناخته می‌شوند. لذا در محیط‌های کشت مصنوعی قادر به رشد نمی‌باشند (۵، ۶). با توجه به مشکلاتی که در استفاده از روش‌های مختلف تشخیص کلامیدیا تراکوماتیس وجود دارد استفاده از روش‌های تشخیصی مولکولی که دارای حساسیت و اختصاصیت بالا و مدت‌زمان کوتاه انجام آزمایش است جهت تشخیص این بیماری‌زا یک روش مناسب به شمار می‌رود. با در نظر گرفتن این نکته که اغلب مبتلایان به عفونت‌های کلامیدیایی بدون علامت می‌باشند که موجب انتقال وسیع باکتری شود لذا تشخیص صحیح و درمان به‌منظور جلوگیری از پیامدهای جدی ناشی از عفونت‌های کلامیدیایی و هزینه‌های هنگفت درمان بسیار حائز اهمیت است (۷، ۸).

با توجه به تشخیص دیرهنگام عفونت کلامیدیا تراکوماتیس، در این مطالعه این هدف دنبال گردید که پرایمر و پروبی مناسب به‌منظور تشخیص عفونت کلامیدیایی طراحی گردد تا بتواند با مناسب‌ترین روش به تشخیص این عفونت در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی کشورمان سهولت بخشید. لذا باید از روشی استفاده گردد که در کمترین زمان ممکن اختصاصی‌ترین و حساس‌ترین پاسخ را ارائه دهد، بدین منظور روش ریل تایم گزینه‌ی صحیحی است که با سنجش آن بر روی نمونه‌های بالینی می‌توان از کارآمد بودن روش اطمینان حاصل کرد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه

تعداد ۵۰ نمونه بالینی (سواپ واژینال) از زنان علامت‌دار مراجعه‌کننده به بیمارستان جامع زنان جمع‌آوری و سویه استاندارد (ATCC_VR_901BD) از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی ایران تهیه گردید و نمونه مثبت نیز از آزمایشگاه‌های بالینی بیمارستان محب تهیه شد. رضایت‌نامه آگاهانه از کلیه افراد شرکت‌کننده در طرح گرفته شد و طرح موردنظر در دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی تهران انجام گردید. تمامی نمونه‌ها توسط آزمون‌های بیوشیمیایی مورد تائید قرار گرفتند.

طراحی پرایمرهای اختصاصی با کمک نرم‌افزار Mega6

با استفاده از نرم‌افزار Mega6 پرایمرهای اختصاصی طراحی و تائید صحت پرایمرهای طراحی‌شده با استفاده از BLAST انجام شد. طراحی پروب توسط https://www.eurofinsgenomics.eu/en/ecom/tools/qpcr-assay-design/ انجام پذیرفت. جهت ساخت به شرکت سازنده Bioneer کره سفارش داده شد. در جدول ۱ مشخصات پرایمر و پروب ژن MOMP آورده شده است.

جدول ۱- مشخصات پرایمر و پروب مورداستفاده در واکنش Real Time-PCR

ژن هدف	اندازه قطعات	توالی	نام
MOMP	194 bp	TGGAGTTAAATGGTCTCGAGC	Forward
MOMP	194 bp	GATTTCATCTTGTTCAATTGCA	Reverse
MOMP		GTTTTGATGCAGACACGATTCGTATTG	Probe

استخراج DNA از باکتری کلامیدیا تراکوماتیس

ازآنجایی‌که این باکتری سخت رشد است، لذا به‌منظور استخراج DNA باید میزان زیادی از آن کشت داده شود تا بتوان DNA با غلظت مناسبی به دست آورد. این استخراج بوسیله‌ی کیت Bioflux و پروتکل شرکت سازنده آن انجام گردید.

انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

از سویه استاندارد کلامیدیا تراکوماتیس تحت عنوان کنترل مثبت استفاده شد. جهت انجام واکنش PCR برای نمونه مثبت، ۱۲/۵ میکرولیتر Master Mix، ۹/۵ میکرولیتر آب دو بار تقطیر، پرایمر پیشرو و پسرو ۲ میکرولیتر و DNA نمونه بیمار ۲ به داخل میکروتیوب ۰/۵ اضافه گردید. از دستگاه ترموسایکلر BIONEER XP cycler ساخت کشور کره استفاده گردید. برنامه

دمایی جهت انجام واکنش دمای واسرشت اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه صورت گرفت در ادامه ۳۵ سیکل به‌صورت دناتوراسیون ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمرها ۵۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ ثانیه و طویل سازی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه انجام شد. درنهایت سنتز نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه صورت گرفت. در پایان محصولات واکنش بر روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شدند. به‌منظور تائید محصول PCR، نمونه به‌منظور توالی یابی به کشور کره ارسال گردید.

کلونینگ محصول PCR در وکتور به‌منظور تهیه کنترل مثبت

محصول ژن PCR در داخل وکتور pJET1.2/blunt Cloning Vector وارد شد. هضم آنزیمی و واکنش الحاق طبق دستورالعمل کیت Clone JET صورت گرفت. ابتدا هضم آنزیمی بر روی وکتور صورت پذیرفت و سپس ژن OMP 1 وارد وکتورpJET1.2 توسط آنزیم T4 DNA Ligase گردید. سویه DH5α باکتری اشرشیاکلی مستعد شد و وکتور نوترکیب به داخل آن ترانسفورم شد. بعد از رشد باکتری اشرشیاکلی بر روی محیط کشت نوترینت آگار حاوی آمپی‌سیلین ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، تک کلونی به‌صورت تصادفی برداشته و داخل لوله‌آزمایش جداگانه حاوی محیط کشت نوترینت براث و آمپی‌سیلین در داخل انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شبانه‌روز کشت داده شد. محیط کشت‌ها داخل میکروتیوپ ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته و به مدت ۳ دقیقه، ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید و سپس رسوب آن جدا شد. درنهایت استخراج پلاسمید صورت گرفت و به‌منظور تائید انجام کلونینگ، وکتور برای توالی یابی ارسال گردید.

تعیین حساسیت با روش Real Time PCR

جهت تعیین حساسیت روش Real Time PCR، رقیق‌سازی DNA صورت گرفت. برای هر سویه به همراه پرایمر طراحی‌شده و رقت‌های مختلف DNA، Real Time PCR انجام شد تا مشخص گردد در چه غلظتی از DNA هدف تکثیر صورت می‌گیرد. به‌این‌ترتیب که به ۵ میکروتیوب استریل ۱ میکرولیتر DNA کلامیدیا تراکوماتیس اضافه شد. به میکروتیوب اول تا پنجم به ترتیب به هرکدام ۴، ۹، ۱۹ و ۴۹ میکرولیتر همراه با ۹۹ میکرولیتر آب مقطر استریل اضافه گردید. سپس از کلیه میکروتیوب‌ها ۱µl برای انجام آزمون PCR برداشته و در میکروتیوب‌های جدید ریخته و سایر مواد واکنش PCR اضافه گردید و آزمون صورت پذیرفت.

تعیین اختصاصیت با روش Real Time PCR

برای تعیین اختصاصیت، DNA باکتری‌های ناحیه واژن که قبلاً نمونه‌های بالینی آن از آزمایشگاه تهیه گردید استخراج شد. مواد مصرفی در داخل واکنش با حجم کلی ۲۰ میکرولیتر به‌صورت ۷ میکرولیتر آب دو بار تقطیر، ۱۰ میکرولیتر Master mix، ۲ میکرولیتر پرایمر پیشرو و پسرو و ۱ میکرولیتر DNA یا Plasmid بود. در سایر میکروتیوب‌ها یک میکرولیتر DNA بیماری‌زاهای مختلف شامل: نایسریا گونوره آ، مایکوباکتریوم هومینیس، لاکتوباسیلوس و اوره آپلاسما اورآلیتیکوم اضافه و سایر مقادیر مواد PCR همانند کلامیدیا تراکوماتیس اضافه گردید.

انجام واکنش Real Time PCR بر روی نمونه‌های بالینی

جهت جستجوی ژنوم کلامیدیا تراکوماتیس در نمونه‌های واژینال از روش Real – Time PCR استفاده شد. برای انجام این واکنش یک میکروتیوب به کنترل منفی اختصاص یافت که شامل تمامی مواد موردنیاز برای انجام واکنش به‌غیراز DNA الگو بود. مواد مصرفی در جدول ۲ آورده شده است. برنامه‌ی دمایی طبق

جدول ۲- حجم موردنیاز برای انجام واکنش Real time PCR

حجم	مواد
۶ میکرولیتر	DNA50ng/µl
۱ میکرولیتر	Primer Mix10 pmoles/µl
۱ میکرولیتر	Probe 10 pmoles/µl
۲ میکرولیتر	DDW
۱۰ میکرولیتر	Probes Master Mix (2X)
۲۰ میکرولیتر	Total

جدول ۳ صورت گرفت. داده‌ها و نتایج هر آزمایش به‌صورت نمودار سیگموئیدی شکل ارائه می‌گردد که محور y نشان‌دهنده

میزان سیگنال فلورسانت و محور X نشان‌دهنده شماره چرخه واکنش است.

نتایج

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به‌منظور ساخت کنترل مثبت

واکنش PCR با استفاده از DNA استخراج‌شده مربوط به ژن OMP1 کلامیدیا تراکوماتیس انجام شد. با استفاده از پرایمرهای اختصاصی طبق دستورالعمل حرارتی مناسب، واکنش PCR گذاشته شد نتایج بر روی ژل الکتروفورز با سایز مارکر ۱۰۰ جفت باز شرکت فرمانتاز مشاهده گردید (شکل ۱ الف). قطعه ژنی موردنظر از ژل بریده و توسط کیت استخراج خالص‌سازی و توالی یابی شد. کلونینگ محصول PCR در وکتور Pjet1.2 جهت وکتور نوترکیب انجام شد و سپس استخراج پلاسمید انجام گردید (شکل ۱ ب).

آزمون تعیین حساسیت روش Real time PCR

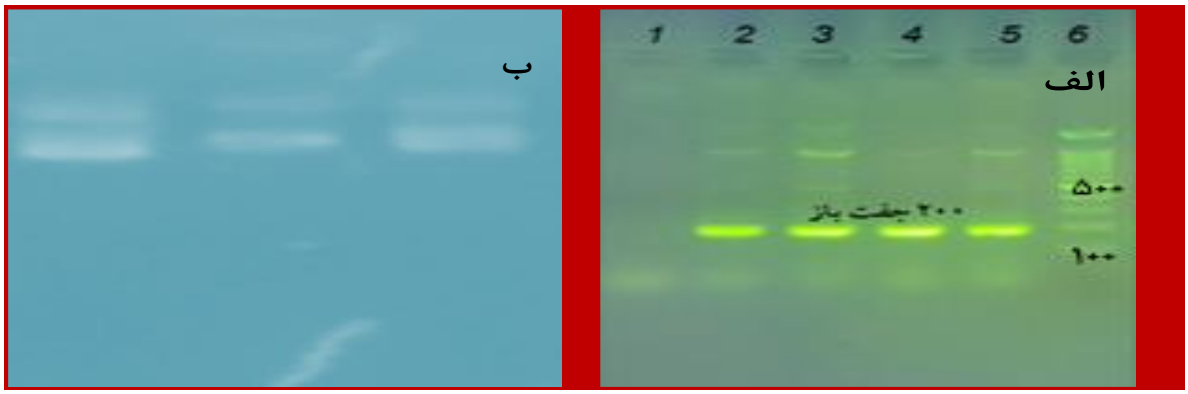
در تست تعیین حساسیت روش Real Time PCR رقت‌های مختلف از DNA کلامیدیا تراکوماتیس تهیه شد که نتایج در شکل ۲ الف قابل‌مشاهده است. CT اولیه که مربوط به رقت ۱ میکروگرم است ۱۸ است و آخرین CT قابل‌مشاهده که مربوط به رقت ۱۰ پیکوگرم است حدود ۳۲ است. نتیجه Real Time PCR تا آخرین رقت تهیه‌شده یعنی ۱۰ پیکوگرم مثبت می‌شود که نشان‌دهنده‌ی حساسیت بالای این آزمون است.

آزمون تعیین اختصاصیت روش Real Time PCR

برای تعیین اختصاصیت Real Time PCR با DNA دیگر

جدول ۳- برنامه دمایی تنظیم‌شده دستگاه Real time PCR

مراحل	دما C	زمان	تعداد سیکل
۱-واسرشت اولیه	۹۵	۲ دقیقه	۱
۲-واسرشت	۹۵	۱۵ ثانیه	۴۵
۳-اتصال پرایمرها و سنتز	۵۷	۳۰ ثانیه	



شکل ۱- الف. ژل الکتروفورز حاصل از PCR ژن OMP1. ستون شماره ۱- کنترل منفی، ستون‌های ۲- ۵ نمونه‌های مثبت. ستون ۶- مارکر ۱۰۰ جفت باز. **ب.** استخراج پلاسمید نوترکیب حاوی ژن OMP1

ساخت کنترل مثبت انجام شد و وکتور نوترکیب تهیه گردید. وکتور نوترکیب را داخل باکتری اشرشیاکلی مستعد به‌صورت ترانسفورماسیون وارد شد. کشت تک کلونی به‌منظور شناسایی

بیماری‌زاهای دستگاه تناسلی ازجمله: نایسریا گونوره‌آ، مایکوپلاسما هومینیس و اوره‌آ پلاسما اوره‌الیتیکوم گذاشته شد که با توجه به بررسی و انجام واکنش روی ژنوم باکتری‌های

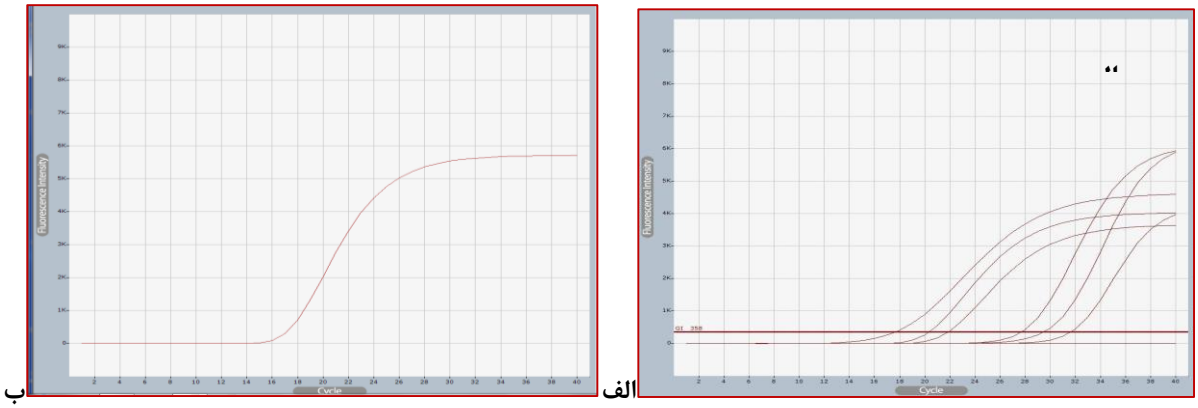
ذکرشده، تنها آزمون مربوط به کلامیدیا تراکوماتیس مثبت بوده است که نشان‌دهنده اختصاصیت ۱۰۰ درصد روش Real Time PCR است که در شکل ۲ ب قابل‌مشاهده است.

آزمون Real Time PCR نمونه‌های بالینی

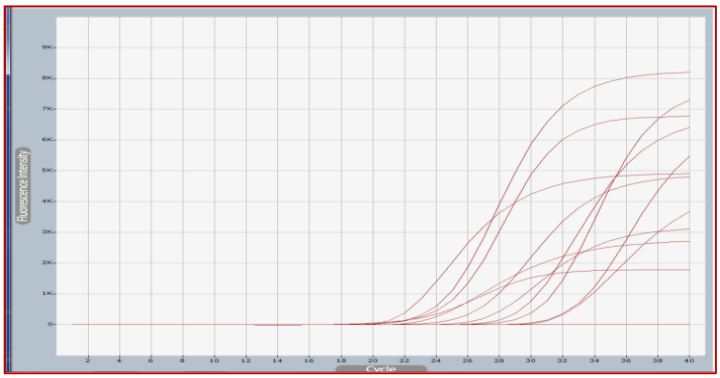
به‌منظور تائید صحت پرایمرهای طراحی‌شده با استفاده از ژنوم نمونه‌های بالینی نیز Real Time PCR انجام گردید. برحسب تعداد باکتری موجود در نمونه‌های بالینی، مقدار CT از ۲۲ تا ۳۴ متغیر است (شکل ۳).

در حال تحول و دگرگونی است و هرروز یافته‌های جدید، سهولت بیشتری را در امر تشخیص فراهم می‌نماید که در کنترل هر چه بیشتر عفونت تأثیر بسزایی می‌تواند داشته باشد (۵، ۹).

به‌هرحال تأمین حساسیت و ویژگی بالا، سهولت انجام آزمایش و کاهش هزینه تمام‌شده از عوامل اصلی در جهت‌دهی و هدایت این تحول بوده است. روش‌های جدید تکثیر اسیدهای نوکلئیک، نظیر Real Time PCR به‌واسطه حساسیت و ویژگی‌های بالای آن، می‌توانند به‌آسانی برای غربالگری گونه‌های کلامیدیا



شکل ۲- الف. تعیین حساسیت آزمون Real Time PCR جهت شناسایی کلامیدیا تراکوماتیس. این گراف حساسیت این روش را در غلظت‌های متفاوتی از کم تا زیاد در باکتری نشان می‌دهد که تائید کننده مناسب بودن این روش است. **ب.** تعیین اختصاصیت (ویژگی) آزمون Real Time PCR جهت شناسایی کلامیدیا تراکوماتیس. یک گراف به‌تنهایی نشان‌دهنده تکثیر ژن omp1 کلامیدیا تر اکوماتیس است و نشان‌دهنده اختصاصیت پرایمرها و پروب است که در باکتری‌های دیگر تکثیری صورت نگرفته است.



شکل ۳- گراف‌های مربوط به نمونه‌های بالینی. این گراف تشخیص ۱۰۰ درصدی نمونه‌های بالینی را نشان می‌دهد.

بحث

کلامیدیا تراکوماتیس یک بیماری‌زای باکتریایی داخل سلولی اجباری است که در سلول‌های اپی‌تلیال استوانه‌ای و ترانزیشنال رشد می‌کند و می‌تواند برای مدت طولانی در بافت تناسلی باقی‌مانده و آسیب مخفی ولی پیش‌رونده‌ای را در لوله‌های تناسلی ایجاد کند. روش‌های تشخیص عفونت‌های کلامیدیایی همچنان

تراکوماتیس مورداستفاده قرار گیرند. این روش‌ها قادرند تعداد بسیار کم ارگانیسم‌ها را شناسایی نمایند. برخلاف تست‌های سرولوژیک و کشت، این روش‌ها برای آزمایش تعداد زیادی نمونه ازنظر هزینه مناسب‌تر است. روش Real Time PCR به دلیل حساسیت و ویژگی بالا که در شناسایی دارد امروزه موردتوجه

بسیاری از محققین قرارگرفته است. در سال ۲۰۰۲ آقای رانی و همکاران در بیمارستان Royal Bolton در انگلیس، نقش کیت‌های تشخیص سریع را در تشخیص عفونت‌های کلامیدیا تراکوماتیس موردبررسی قرار دادند. آن‌ها از روش PCR به‌عنوان استاندارد طلایی استفاده کردند. در این مطالعه میزان حساسیت و ویژگی این آزمون به ترتیب ۶۵ درصد و ۱۰۰ درصد گزارش گردید (۱۰) که با توجه به تحقیق حاضر روش Real Time دارای حساسیت بیشتری است.

در مطالعه‌ای در روسیه، روش PCR موردبررسی قرار گرفتند و از این میان، PCR دارای ۱۰۰ -۷۹ درصد حساسیت و ۱۰۰-۹۷ درصد اختصاصیت بود (۱۱). در تحقیق حاضر میزان اختصاصیت و حساسیت ۱۰۰ درصد حاصل شد. مانیا و همکاران در سال ۲۰۰۱ از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای جداسازی کلامیدیا تراکوماتیس از نمونه‌های سواپ واژینال استفاده کردند که از بین نمونه‌های موجود در بیمارستان KEM در هند، ۳۰ نمونه برای PCR انتخاب شد که روش PCR برای آن‌ها گذاشته شد که از بین ۳۰ نمونه ۲۳ نمونه دارای کلامیدیا تراکوماتیس بودند ولی هنگامی‌که برای نمونه‌ها، روش الایزا گذاشتند ۲۰ نمونه را مثبت نشان داد. در این مطالعه برتری PCR نسبت به ELISA نشان داده شد (۱۲). بااین‌حال در نمونه مطالعاتی ما حساسیت و اختصاصیت روش ریل تایم بیشتر است. گلشنی و همکاران در سال ۲۰۰۷، از بین ۲۰۰ نمونه واژینال، در ۱۳۴ نمونه هیچ آلودگی باکتریایی وجود نداشت و ۱۸ نمونه آلوده به کلامیدیا تراکوماتیس، ۲۲ نفر مایکوپلاسما هومینیس، ۱۶ نفر اوره آپلاسما اوره‌الیتکیم و ۱۴ نفر کلامیدیا تراکوماتیس همراه با اوره‌آپلاسما اوره‌الیتیکم بودند. این بررسی‌ها با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز صورت پذیرفت (۱۳). بااین‌حال اختصاصیت این روش ۷۰ درصد گزارش‌شده است که باز مزیت روش موردبررسی مورد تائید است. در سال ۲۰۱۲ دکتر ظهیری نیا و همکاران از روش Nested PCR برای تشخیص کلامیدیا تراکوماتیس استفاده کردند که حساسیت قابل قبولی داشت اما اختصاصیت آن موردبررسی قرار نگرفته بود (۱۴). در سال ۲۰۱۴ سازمان کنترل و پیشگیری بیماری‌ها نیز استفاده از روش‌های بر پایه تشخیص نوکلئیک اسید را به‌منظور تشخیص کلامیدیا تراکوماتیس به دلیل اختصاصیت و حساسیت بالا مورد تائید قرار داده است (۸). در سال ۲۰۱۶ مایر و همکاران مقاله مروری به‌منظور مقایسه روش‌های تشخیص باکتری کلامیدیا تراکوماتیس ارائه دادند که در آنجا روش‌های مولکولی مورد تائید قرار گرفتند و ریل تایم روشی مناسب گزارش شد (۱۶).

نتیجه‌گیری

تحقیقات حاکی از آن است شیوع عفونت کلامیدیایی در جهان رو به افزایش است و با توجه به هزینه درمان عوارض عفونت‌های کلامیدیایی که سالانه در آمریکا بیش از ۲ میلیون دلار تخمین زده‌شده است و ازآنجاکه هزینه تشخیص در مقایسه با هزینه درمان عوارض عفونت بسیار ناچیز و جزئی است، لذا غربالگری و درمان به‌موقع باعث کاهش شیوع عفونت دستگاه تولیدمثل شده و از هزینه درمان این بیماری خواهد کاست. ازآنجاکه کلامیدیا یک بیماری‌زای داخل سلولی است شناسایی آن با استفاده از روش‌های معمول تشخیص باکتری‌ها مشکل است. دستیابی به روشی باقابلیت شناسایی و حساس اسیدهای نوکلئیک برای تشخیص آلودگی به باکتری در مراحل اولیه یکی از مهم‌ترین سؤالات ذهن پژوهشگران در دهه اخیر بوده است. روش‌های مختلف تکثیر اسیدهای نوکلئیک در شرایط آزمایشگاه، بسیار متعدد بوده و هرکدام دارای مزایا و معایب خاص خود می‌باشند (۸). از فواید روش Real Time PCR این است که اسید نوکلئیک تکثیر یافته و مراحل تشخیصی در یک محیط بسته انجام می‌شود، ریسک آلودگی به محیط و واکنش‌های بعدی را به‌طور قابل‌ملاحظه نسبت به روش‌های کلاسیک و مولکولی PCR کاهش می‌دهد. سرعت در انجام آزمایش، حذف مرحله ردیابی محصول پس از PCR، مشاهده لحظه‌به‌لحظه واکنش و قطع آن در هر زمان، حساسیت و اختصاصیت بالا و انجام واکنش کمی و به دست آوردن میزان دقیق ژنوم و الگوی اولیه درروش Real-Time PCR باعث تحول عظیم در تشخیص مولکولی میکروارگانیسم‌ها، بررسی بیان ژن‌ها، ارزیابی درمان، تشخیص موتاسیون‌ها، افتراق آللی و بسیاری از کاربردهای دیگر شده است. مطالعات بین‌المللی نشان داده است که شیوع عفونت کلامیدیایی در حال افزایش است و نیاز به بررسی‌های دقیق دارد. برنامه‌های غربالگری برای عفونت کلامیدیا تراکوماتیس منجر به کاهش شیوع عفونت کلامیدیایی شده است.

هدف از انجام این مطالعه طراحی کیت جهت تشخیص دقیق‌تر عفونت کلامیدیا در زنان دارای علامت بود و ازآنجاکه نتایج مطالعات متعدد توسط محققین مختلف حاکی از آن است که روش Real Time PCR در تشخیص کلامیدیا تراکوماتیس از

حساسیت بیشتری نسبت به روش PCR، Nested PCR، کشت و سایر روش‌ها برخوردار است در این تحقیق از روش Real Time PCR جهت طراحی کیت تشخیصی استفاده شد. با توجه به نتایج این تحقیق توانستیم کیتی با حساسیت و اختصاصیت بالا طراحی کرده که بتوان به‌وسیله آن به تشخیص عفونت‌های کلامیدیایی در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی سهولت بخشید.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی بابت تأمین بودجه تحقیق حاضر با کد ۲۲۵۳۰۵۰۷۹۴۲۰۱۲ تشکر و قدرانی می‌گردد.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی را اعلام ننموده‌اند.

References

1. Bébéar C, De Barbeyrac B. Genital Chlamydia trachomatis infections. Clinical Microbiology and Infection. 2009; 15(1):4-10.
2. Paavonen J, Eggert-Kruse W. Chlamydia trachomatis: impact on human reproduction. Human reproduction update. 1999;5(5):433-47.
3. Stamm WE. Chlamydia trachomatis infections: progress and problems. The Journal of infectious diseases. 1999;179(2): 380-3.
4.Price MJ, Ades AE, Soldan K, Welton NJ, Macleod J, Simms I, Et al. The natural history of Chlamydia trachomatis infection in women: a multi-parameter evidence synthesis.
5. Weinstock H, Berman S, Cates JrW. Sexually transmitted diseases among American youth: incidence and prevalence estimates, 2000. Perspectives on sexual and reproductive health. 2004;36(1):6-10.
6. Lanjouw E, Ouburg S, De Vries HJ, Stary A, Radcliffe K, Unemo M. 2015 European guideline on the management of Chlamydia trachomatis infections. International journal of STD & AIDS. 2016;27(5):333-48.
7. Johnson RE, Newhall WJ, Papp JR, Knapp JS, Black CM, Gift TL, Et al. Screening tests to detect Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae infections—2002. MMWR Recomm Rep. 2002;51(15):1-38.
8. Centers for Disease Control and Prevention. Recommendations for the laboratory-based detection of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae-2014. MMWR. Recommendations and reports: Morbidity and mortality weekly report. Recommendations and reports. 2014;63(RR-02):1.
9. Rassjo EB, Kambugu F, Tumwesigye MN, Tenywa T, Darj E. Prevalence of sexually transmitted infections among adolescents in Kampala, Uganda, and theoretical models for improving syndromic management. Journal of Adolescent Health. 2006;38(3):213-21.
10. Rani R, Corbitt G, Killough R, Curless E. Is there any role for rapid tests for Chlamydia trachomatis? International journal of STD & AIDS. 2002;13(1):22-4.
11. Shalepo K, Savicheva A, Shipitsyna E, Unemo M, Domeika M. Diagnosis of Chlamydia trachomatis in Russia-in-house PCR assays may be effective but overall optimization and quality assurance are urgently needed. Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica. 2006;114(7-8):500-7.
12. Mania-Pramanik J, Donde UM, Maitra A. Use of polymerase chain reaction (PCR) for detection of Chlamydia trachomatis infection in cervical swab samples. Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology. 2001;67(5):246.
13. Golshani M, Eslami G, Ghobadloo SM, Fallah F, Goudarzi H, Rahbar AS, Et al. Detection of Chlamydia trachomatis, Mycoplasma hominis and Ureaplasma urealyticum by multiplex PCR in semen sample of infertile men. Iranian Journal of Public Health. 2007(2):50-57.
14. Eslami G, Goudarzi H, Taheripanah R, Taheri S, Fallah F, Moazzami B, Et al. Chlamydia trachomatis detection by Nested-PCR method on females referred to Medical Centers of Tehran, Iran. Archives of Clinical Infectious Diseases. 2012;7(4):124-7.
15. Meyer T. Diagnostic procedures to detect Chlamydia trachomatis infections. Microorganisms. 2016;4(3):25

Original Article

Design of Chlamydia Trachomatis Diagnostic Kit in Symptomatic Women Using Real Time PCR

Rouhani Nejad H[1*], Rahmati Kian N[2], Nemati Mansor N[3], Amiri D[1]

1. Malek-Ashtar University of Technology, Tehran, Iran
2. Department of Microbioology, Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
3. Department of biotechnology, Faculty of Science and Technologies, Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Received: 18 Jul 2019 Accepted: 01 Oct 2019

Abstract

Background & Objective: Chlamydia trachomatis is one of the most common sexually transmitted diseases worldwide. Screening women for Chlamydia trachomatis in developing countries is highly desirable due to the ineffectiveness of the available diagnostic methods. The aim of this study is to design a detection kit for Chlamydia trachomatis in symptomatic women.

Materials & Methods: A total of 50 clinical specimens of symptomatic women were collected. The OMP1 gene sequence was extracted from the gene bank and the primer and probe were designed appropriately by Mega6 software. The extracted DNA was amplified by PCR. In order to provide positive control, PCR product was cloned into Pjet1.2 vector. To determine the sensitivity, DNA dilution was performed. To determine the specificity, DNA of vaginal bacteria was extracted and Real Time PCR was done.

Results: In this study, we designed a kits with 100% specificity and 10pg/ql sensitivity in detecting chlamydial infection in symptomatic women.

Conclusion: With the use of designed primers and real time, we can detect 100% of chlamydia infections.

Keywords: Real Time PCR, Chlamydia trachomatis, OMP1 gene

***Corresponding Author: Rouhani Nejad Hamideh,** Malek-Ashtar University of Technology, Tehran, Iran
Email: rohaninejhad@gmail.com
https://orcid.org/0000-0002-8353-6542