

بررسی حضور Haemophilus Influenzae در بیماران مبتلا به انسداد ریوی مزمن (COPD) به روش مولکولی

هدیه محقق مرتضوی^۱، نغمه بهرامی^۲، طاهره ناجی^۳، عبدالرضا محمدنیا^۴

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: بیماری مزمن انسدادی ریه (Chronic obstructive pulmonary disease یا COPD) نوعی بیماری انسدادی ریوی است که با انسداد مسیر هوایی به صورت مزمن مشخص می‌شود. هدف از انجام این مطالعه، تشخیص مولکولی Haemophilus influenzae در بیماران مبتلا به بیماری انسداد ریوی مزمن بود.

روش‌ها: تعداد ۱۰۰ نمونه از ترشحات تنفسی بیماران مبتلا به COPD جمع‌آوری شد. شناسایی مولکولی Haemophilus influenzae با استفاده از پرایمرهای اختصاصی در مقابل کیت استاندارد به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (Polymerase chain reaction یا PCR) انجام شد.

یافته‌ها: ۱۰ نفر از ۱۰۰ نفر با روش کیت و ۸ نفر از ۱۰۰ نفر در PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی از نظر باکتری Haemophilus influenzae مثبت بودند.

نتیجه‌گیری: آزمایش‌های مولکولی مانند PCR، به دلیل داشتن حساسیت، دقت بالا و صرفه‌جویی در زمان، روش مناسبی جهت مقاصد تشخیصی باکتری Haemophilus influenzae در بیماران مبتلا به انسداد ریوی مزمن می‌باشد.

واژگان کلیدی: Haemophilus influenzae، بیماری انسداد ریوی مزمن، مدل‌های مولکولی، پرایمرهای DNA

ارجاع: محقق مرتضوی هدیه، بهرامی نغمه، ناجی طاهره، محمدنیا عبدالرضا. بررسی حضور Haemophilus Influenzae در بیماران مبتلا به انسداد ریوی مزمن (COPD) به روش مولکولی. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۸؛ ۳۷ (۵۲۷): ۵۲۱-۵۱۷

مقدمه

بیماری مزمن انسدادی ریه (Chronic obstructive pulmonary disease یا COPD)، همچنین با نام بیماری مزمن انسدادی مسیر هوایی (Chronic obstructive lung disease یا COLD) نیز خوانده می‌شود. این بیماری، به مرور زمان پیشرفت می‌کند (۱). اصلی‌ترین نشانه‌های این بیماری، شامل مواردی نظیر تنگی نفس، سرفه و ایجاد خلط سینه می‌باشد (۲-۳). امروزه، تشخیص اشتباه میان COLD و بیماری آسم رایج است. تفاوت بین COPD و آسم، در این است که انسداد ریوی مزمن برگشت ناپذیر است، اما می‌توان آن را کنترل کرد که شدت پیدا نکند، اما آسم، در مواردی درمان می‌شود و به طور کلی، این دو بیماری، در درمان و پیش‌بینی وضعیت بیمار نیز متفاوت

هستند (۴). گاهی افراد مبتلا به COPD ممکن است دچار عفونت‌های باکتریایی نیز بشوند (۵-۶)، مانند عفونت‌هایی که با Haemophilus influenzae، Streptococcus pneumoniae و Mycoplasma pneumoniae در بیماران مبتلا به COPD شناسایی شده‌اند (۷). Haemophilus influenzae در مجاری تنفسی فوقانی بیشتر بچه‌های سالم و بالغین وجود دارد و گاهی عفونت مجاری تنفسی ایجاد می‌کند (۸).

هدف از انجام این مطالعه، شناسایی مولکولی Haemophilus influenzae با استفاده از پرایمرهای اختصاصی در مقابل کیت استاندارد به روش PCR در افراد مبتلا به COPD بود.

- ۱- گروه سلولی و مولکولی، دانشکده‌ی علوم و فن‌آوری‌های نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
 - ۲- استادیار، مرکز تحقیقات جراحی‌های فک و صورت و گروه مهندسی بافت و سلولی کاربردی، دانشکده‌ی فن‌آوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
 - ۳- دانشیار، گروه علوم پایه، دانشکده‌ی داروسازی و علوم دارویی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
 - ۴- استادیار، مرکز تحقیقات بیماری‌های مزمن تنفسی، پژوهشکده‌ی سل و بیماری‌های ریوی، مرکز آموزشی، پژوهشی و درمانی سل و بیماری‌های ریوی بیمارستان دکتر مسیح دانشوری و گروه بیوتکنولوژی و پزشکی مولکولی، دانشکده‌ی فن‌آوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
- Email: mohamadnia.ar@gmail.com نویسنده‌ی مسؤو: عبدالرضا محمدنیا

روش‌ها

این مطالعه، از نوع مقطعی - توصیفی بود. در بیمارستان مسیح دانشوری دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران و پس از اخذ مجوز از کمیته‌ی اخلاق (IR.SBMU.NRIILD.REC.1396.407)، تعداد ۱۰۰ نمونه از خلط گلوی بیماران مبتلا به COPD exacerbation که مشکوک به عفونت با باکتری بودند، با نظر پزشک متخصص ریه جمع‌آوری شد. معیارهای ورود به مطالعه، شامل داشتن علائم تنفسی نظیر سرفه‌ی خشک پایدار، تب، خس‌خس، تنگی نفس، خلط و غیره بودند. معیارهای خروج از مطالعه، شامل علائمی نظیر آسم، آلرژی و بیماری سل بودند.

مراحل آماده‌سازی نمونه‌ها جهت انجام آزمایش‌ها به این ترتیب بود که ابتدا نمونه‌های خلط بیماران جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شد. سپس، با استفاده از بافر فسفات سالین چند بار نمونه‌ها شسته و سانتریفیوژ شدند و مایع رویی دور ریخته شد و در نهایت، نمونه‌ها وارد فرایند استخراج DNA شدند. در این مطالعه، برای استخراج DNA، از کیت GENET Bio استفاده شد و کیفیت و خلوص DNAها با استفاده از روش اسپکتروفتومتری در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر بررسی گردید.

نمونه‌ها به دو روش بررسی شدند. ابتدا بررسی مولکولی به روش Poymerase chain reaction (PCR) و با استفاده از کیت مؤسسه‌ی ایرانیان ژن فن‌آور (Haemophilus influenzae PCR detection kit- Cat.No.IGF111) و طبق شیوه‌نامه‌ی موجود در کیت انجام گردید. شرایط زمانی و دمایی عبارت از ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه، ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه بود. برای ۳۵ چرخه و در نهایت، در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه تیوپ‌ها گذاشته شد.

در مرحله‌ی بعدی، واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای ژن اختصاصی پلی‌ساکارید کیسولوی Lithium chloride-1 (Lic-1) انجام شد. ویژگی‌های پرایمرها در جدول ۱ آمده است (۹) (جدول ۱).

جدول ۱. مشخصات پرایمر استفاده شده

پارامتر	Lic-1
پرایمر F	AAT-GAA-TAC-AAA-AAT-GCT-ATG-CAA
طول پرایمر	۲۴
پرایمر R	AAA-TGA-AAT-ACT-TCC-TCA-GGC-TTG
طول پرایمر	۲۴
اندازه‌ی محصول	۱۵۰

واکنش PCR به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر از Master mix شرکت Amplicon، ۰/۳ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای F و R، ۵ میکرولیتر از DNA و ۸/۲ میکرولیتر آب مقطر و با استفاده از دستگاه ترموسایکلر BOECO انجام گردید. سپس، دو روش با هم مقایسه شدند.

شرایط دمایی و زمانی به ترتیب شامل دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، دناتوراسیون در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه، اتصال پرایمرها در دمای ۵۳ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و تکثیر در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه (برای ۴۰ چرخه) و تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه بود. در نهایت، محصولات PCR در ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز و نتایج بررسی شدند.

یافته‌ها

در این مطالعه، ۱۰۰ بیمار مبتلا به COPD مورد ارزیابی قرار گرفتند. از این تعداد، ۵۴ نفر مرد و ۴۶ نفر زن بودند. تفاوت معنی‌داری از نظر جنسیت وجود نداشت ($P > 0/05$). میانگین سنی بیماران، $60/2 \pm 10/2$ سال بود (جدول ۱).

جدول ۲. ویژگی‌های دموگرافیک بیماران شرکت کننده در مطالعه

ویژگی‌ها	تعداد
جنس	مرد ۵۴
	زن ۴۶
بیمار	بستری ۸۲
	سرپایی ۱۸
میانگین سنی	$60/2 \pm 10/2$

۱۰ نفر از ۱۰۰ نفر با روش کیت و ۸ نفر از ۱۰۰ نفر در PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی از نظر باکتری Haemophilus influenzae مثبت بودند. در شکل‌های ۱ و ۲، نمونه‌ای از الکتروفورز ژل آگارز و باندهای تشکیل شده‌ی محصولات PCR برای Haemophilus influenzae با استفاده از کیت استاندارد و پرایمرهای طراحی شده آمده است.

در نهایت، پس از به دست آمدن نتایج، حساسیت و ویژگی، ارزش اخباری مثبت و منفی برای Haemophilus influenzae با روش PCR در مقابل کیت‌های موجود، به ترتیب ۱۰۰، ۱۰۰، ۸۰/۰ و ۹۷/۸ درصد بودند.

COPD وجود داشته باشند (۱۲، ۵). تأثیرات باکتری‌های هوایی در بیماران COPD به خوبی تعریف نشده‌اند (۱۳). این عفونت‌ها، می‌توانند در تشدید علائم بیماری COPD نقش زیادی داشته باشند و از طرفی، تشخیص سریع و دقیق این باکتری‌ها، می‌تواند موجب بهبودی وضعیت بیمار و کاهش هزینه‌ها گردد (۱۴).

کلونیزاسیون *Haemophilus influenzae* در دستگاه تنفسی، می‌تواند باعث باکتری و در نهایت، ایجاد عفونت‌های سیستمیک نظیر مننژیت، آرتریت سپتیک و پنومونی به ویژه در کودکان گردد (۱۵).

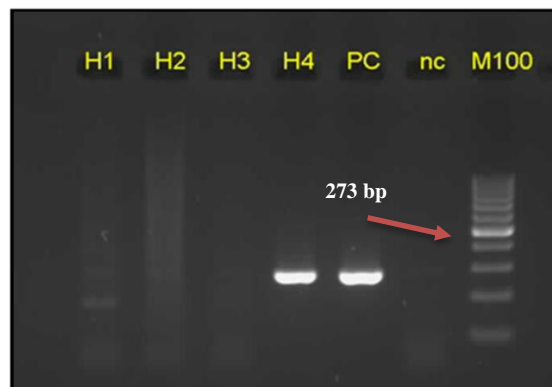
Honda و همکاران، بر روی نمونه‌های خلط، BAL) Bronchoalveolar lavage) و سوآپ‌های گلو و با استفاده از تکنیک PCR مطالعه کردند و بالاترین جواب مثبت را با نمونه‌های سوآپ گلو به دست آوردند. در مطالعه‌ی حاضر نیز از نمونه‌های خلط استفاده شد و حساسیت و ویژگی خوبی در مورد باکتری *Haemophilus influenzae* به دست آمد (۱۶).

در مطالعه‌ی Ni و همکاران، از روش PCR برای شناسایی *Haemophilus influenzae* استفاده شد و حساسیت این آزمون ۹۱ درصد به دست آمد. در مطالعه‌ی حاضر نیز *Haemophilus influenzae* با حساسیت ۸۰ درصد شناسایی شد (۱۷).

به طور کلی، می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که روش‌های به کار برده شده در این مطالعه، در مقایسه با مطالعات مشابه از حساسیت و دقت خوبی برخوردار هستند و می‌توان با استفاده از این روش در کنار روش‌های موجود، نتایج خوبی را از نظر وجود عفونت‌ها در بیماران COPD گزارش نمود. البته، طراحی و اجرای مطالعات تکمیلی توصیه می‌گردد.

تشکر و قدردانی

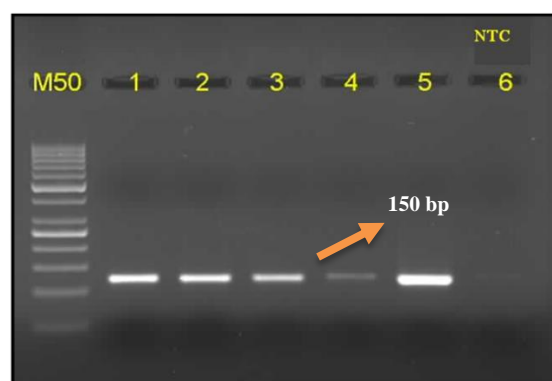
بدین وسیله، از زحمات استادان دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران قدردانی و تشکر به عمل می‌آید.



شکل ۱. الکتروفورز ژل آگارز با استفاده از کیت استاندارد

بحث

COPD، یک بیماری ریوی مزمن است که مشخصه‌ی آن به صورت آمفیزم، برونشیت مزمن و بیماری راه‌های هوایی کوچک دیده شود (۱۰). وجود یک رابطه بین سیگار کشیدن و بیماری COPD در تحقیقات مختلفی نشان داده شده است (۱۱، ۳).



شکل ۲. الکتروفورز ژل آگارز با استفاده از پرایمرهای طراحی شده

گاهی بیماران COPD ممکن است به عفونت‌های باکتریایی نیز مبتلا شوند و تعدادی از باکتری‌های پاتوژن و غیر پاتوژن در بیماران

References

1. Buist AS, McBurnie MA, Vollmer WM, Gillespie S, Burney P, Mannino DM, et al. International variation in the prevalence of COPD (the BOLD Study): A population-based prevalence study. *Lancet* 2007; 370(9589): 741-50.
2. Devereux G. ABC of chronic obstructive pulmonary disease. Definition, epidemiology, and risk factors. *BMJ* 2006; 332(7550): 1142-4.
3. Celli BR, MacNee W. Standards for the diagnosis and treatment of patients with COPD: A summary of the ATS/ERS position paper. *Eur Respir J* 2004; 23(6): 932-46.
4. Kanner RE, Anthonisen NR, Connett JE. Lower respiratory illnesses promote FEV(1) decline in current smokers but not ex-smokers with mild chronic obstructive pulmonary disease: Results from the lung health study. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164(3): 358-64.
5. Ghoshal AG, Dhar R, Kundu S. Treatment of acute exacerbation of COPD. *J Assoc Physicians India* 2012; 60 Suppl: 38-43.
6. Martinez FJ. Pathogen-directed therapy in acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2007; 4(8): 647-58.

7. Hausner M, Schamberger A, Naumann W, Jacobs E, Dumke R. Development of protective anti-*Mycoplasma pneumoniae* antibodies after immunization of guinea pigs with the combination of a P1-P30 chimeric recombinant protein and chitosan. *Microb Pathog* 2013; 64: 23-32.
8. Maaroufi Y, De Bruyne JM, Heymans C, Crokaert F. Real-time PCR for determining capsular serotypes of *Haemophilus influenzae*. *J Clin Microbiol* 2007; 45(7): 2305-8.
9. Saadati M, Nazarian S, Barati B, Mehdizadeh H, Shirzad H S, Sadeghizadeh M, et al. simultaneous molecular detection of *Neisseria meningitidis* and *Haemophilus influenzae*. *Modares J Med Sci Pathol* 2008; 11(1-2): 73-80. [In Persian].
10. Shimizu K, Yoshii Y, Morozumi M, Chiba N, Ubukata K, Uruga H, et al. Pathogens in COPD exacerbations identified by comprehensive real-time PCR plus older methods. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2015; 10: 2009-16.
11. Stang P, Lydick E, Silberman C, Kempel A, Keating ET. The prevalence of COPD: Using smoking rates to estimate disease frequency in the general population. *Chest* 2000; 117(5 Suppl 2): 354S-9S.
12. Marin A, Garcia-Aymerich J, Sauleda J, Belda J, Millares L, Garcia-Nunez M, et al. Effect of bronchial colonisation on airway and systemic inflammation in stable COPD. *COPD* 2012; 9(2): 121-30.
13. Desai H, Eschberger K, Wrona C, Grove L, Agrawal A, Grant B, et al. Bacterial colonization increases daily symptoms in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Ann Am Thorac Soc* 2014; 11(3): 303-9.
14. Perotin JM, Dury S, Renois F, Deslee G, Wolak A, Duval V, et al. Detection of multiple viral and bacterial infections in acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease: A pilot prospective study. *J Med Virol* 2013; 85(5): 866-73.
15. Harrison OB, Brueggemann AB, Caugant DA, van der Ende A, Frosch M, Gray S, et al. Molecular typing methods for outbreak detection and surveillance of invasive disease caused by *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae*, a review. *Microbiology* 2011; 157(Pt 8): 2181-95.
16. Honda J, Yano T, Kusaba M, Yonemitsu J, Kitajima H, Masuoka M, et al. Clinical use of capillary PCR to diagnose *Mycoplasma pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 2000; 38(4): 1382-4.
17. Ni H, Knight AI, Cartwright K, Palmer WH, McFadden J. Polymerase chain reaction for diagnosis of meningococcal meningitis. *Lancet* 1992; 340(8833): 1432-4.

Investigating the Presence of Haemophilus Influenzae in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) Using Molecular Method

Hedyeh Mohaghegh-Mortazavi¹, Naghmeh Bahrami², Tahereh Naji³, Abdolreza Mohamadnia⁴

Original Article

Abstract

Background: Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a type of obstructive pulmonary disease characterized by chronic airway blockage. The aim of this study was to investigate the presence of Haemophilus influenzae in patients with COPD using molecular method.

Methods: A total of 100 samples of respiratory secretion were collected from patients with COPD. The molecular identification of Haemophilus influenzae was performed using specific primers against standard kits by polymerase chain reaction (PCR) method.

Findings: Haemophilus influenzae bacteria were positive in 10 out of 100 patients, and 8 of 100 were positive in PCR using specific primers.

Conclusion: Nucleic acid-like PCR tests, due to their sensitivity, high accuracy, and time saving, are the appropriate method for diagnosis of Haemophilus influenzae in patients with chronic pulmonary obstruction.

Keywords: Haemophilus influenzae, Chronic obstructive pulmonary disease, Molecular models, DNA primers

Citation: Mohaghegh-Mortazavi H, Bahrami N, Naji T, Mohamadnia A. **Investigating the Presence of Haemophilus Influenzae in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) Using Molecular Method.** J Isfahan Med Sch 2019; 37(527): 517-21.

1- Department of Cellular and Molecular Biology, School of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- Assistant Professor, Craniomaxillofacial Research Center AND Department of Tissue Engineering and Applied Cell Sciences, School of Advanced Technologies in Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3- Associate Professor, Department of Basic Sciences, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

4- Assistant Professor, Chronic Respiratory Diseases Research Center, National Research Institute of Tuberculosis and Lung Diseases (NRITLD) AND Department of Biotechnology, School of Advanced Technologies in Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Corresponding Author: Abdolreza Mohamadnia, Email: mohamadnia.ar@gmail.com