16s rDNA

nikaeen@hlth.mui.ac.ir

(PCR)

PCR

Nested PCR

(LEG448-LEG858) ; (LEG225- LEG858) (LEG448-JRP)

LEG448-JRP

LEG448-LEG858 ; LEG225- LEG858

DNA

Nested PCR

PCR

چکیده

زمینه و هدف: روش‌های مولکولی تشخیص عفونت‌های انگلی روده‌ای به‌ویژه در مواردی که تعداد انگل در نمونه کم است، حساسیت بالاتری نسبت به روش‌های سنتی دارند. هدف از این مطالعه مقایسه حساسیت پرایمرهای مختلف اختصاصی ناحیه 5s rRNA و 16s rRNA در تشخیص عفونت‌های انگلی روده‌ای با روش PCR بود.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی-مقطعی، نمونه‌های مدفوع از بیماران مراجعه‌کننده به آزمایشگاه انگل‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی تهران جمع‌آوری شد. پس از تهیه مخلوط انگلی، DNA استخراج شد و با پرایمرهای اختصاصی ناحیه 5s rRNA و 16s rRNA تکثیر PCR انجام شد. حساسیت پرایمرها با تعیین حد تشخیص (LOD) و رقت‌های سریالی مقایسه شد.

یافته‌ها: پرایمرهای ناحیه 5s rRNA حساسیت بالاتری نسبت به پرایمرهای ناحیه 16s rRNA نشان دادند. حد تشخیص پرایمرهای 5s rRNA برابر با ۱۰ تخم انگل در هر گرم مدفوع و حد تشخیص پرایمرهای 16s rRNA برابر با ۱۰۰ تخم انگل در هر گرم مدفوع بود.

نتیجه‌گیری: پرایمرهای ناحیه 5s rRNA حساسیت بالاتری در تشخیص عفونت‌های انگلی روده‌ای دارند و می‌توانند در تشخیص عفونت‌های با تعداد انگل کم مفید باشند.

کلمات کلیدی: PCR، 5s rRNA، 16s rRNA، حساسیت، انگل‌های روده‌ای

مقدمه

عفونت‌های انگلی روده‌ای یکی از مشکلات مهم بهداشتی در کشورهای در حال توسعه هستند. روش‌های سنتی تشخیص این عفونت‌ها مانند روش فلوتاسیون و روش کاتو-کاتز حساسیت پایینی دارند و در مواردی که تعداد انگل در نمونه کم است، ممکن است نتیجه منفی کاذب داده شود. روش‌های مولکولی مانند PCR حساسیت بالاتری نسبت به روش‌های سنتی دارند و می‌توانند در تشخیص عفونت‌های با تعداد انگل کم مفید باشند.

در روش PCR، انتخاب پرایمر مناسب نقش مهمی در حساسیت و اختصاصی بودن روش دارد. پرایمرهای ناحیه 5s rRNA و 16s rRNA به دلیل تعداد کپی بالا در ژنوم انگل‌ها، حساسیت بالاتری نسبت به پرایمرهای ناحیه‌های تک‌کپی دارند. هدف از این مطالعه مقایسه حساسیت پرایمرهای مختلف اختصاصی ناحیه 5s rRNA و 16s rRNA در تشخیص عفونت‌های انگلی روده‌ای با روش PCR بود.

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی-مقطعی، نمونه‌های مدفوع از بیماران مراجعه‌کننده به آزمایشگاه انگل‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی تهران جمع‌آوری شد. پس از تهیه مخلوط انگلی، DNA استخراج شد و با پرایمرهای اختصاصی ناحیه 5s rRNA و 16s rRNA تکثیر PCR انجام شد. حساسیت پرایمرها با تعیین حد تشخیص (LOD) و رقت‌های سریالی مقایسه شد.

یافته‌ها

پرایمرهای ناحیه 5s rRNA حساسیت بالاتری نسبت به پرایمرهای ناحیه 16s rRNA نشان دادند. حد تشخیص پرایمرهای 5s rRNA برابر با ۱۰ تخم انگل در هر گرم مدفوع و حد تشخیص پرایمرهای 16s rRNA برابر با ۱۰۰ تخم انگل در هر گرم مدفوع بود.

نتیجه‌گیری

پرایمرهای ناحیه 5s rRNA حساسیت بالاتری در تشخیص عفونت‌های انگلی روده‌ای دارند و می‌توانند در تشخیص عفونت‌های با تعداد انگل کم مفید باشند.

[illegible]

[illegible] n=z²s²/d² [illegible] mL [illegible] (PBS) [illegible] freez-thaw [illegible] DNA [illegible].

[illegible] DNA [illegible] Wizard® Genomic DNA Purification Kit, Madison, USA (Promega, promega [illegible] DNA [illegible] PCR [illegible].

PCR [illegible]

[illegible] DNA [illegible] 16s rRNA [illegible] Eubac27F [illegible] R1 [illegible] DNA [illegible] Nested PCR [illegible].

[illegible] DNA [illegible] μL [illegible] PCR [illegible] μM [illegible] dNTP 1X [illegible] μM [illegible] Taq DNA [illegible] polymerase μL [illegible] DNA [illegible].

[illegible]

سایز محصولات PCR (bp)	ژن شناسایی	توالی پرایمرها	پرایمرها
حدود ۱۴۲۰ bp	16S rRNA	5´-AGA-GTT-TGA-TCC-TGG-CTC-A-<G>-3´	Eubac27 F 1429 R1
۶۵۴ bp	16S rRNA	5´-AAG-ATT-AGC-CTG-CGT-CCG-A-<T> -3´	LEG 225 LEG 858
۴۳۰bp	16S rRNA	5´- AGG-GGT-TGA-TAG-GTT-AAG-AG-<C> -3´	LEG 448 LEG 858
۳۸۶bp	16S rRNA	5´- AGG-GGT-TGA-TAG-GTT-AAG-AG-<C> -3´	LEG 448 LEG JRP

ÊÑŤ ǻǵǻƐgĸ DŽÚ ǂ ƷÒÑǭ Ǵ PCR ǴǭƐ :ĥ ğƿyΣ

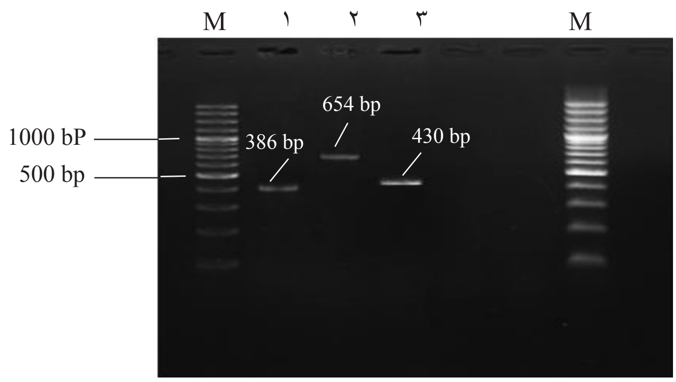
زمان	درجه حرارت	تقسیمات فرعی هر مرحله	تعداد مرحله وسیکل ها
۵min	۹۵°C	Pre- Denaturation	مرحله اول (۱ سیکل)
۴۵s	۹۴°C	Denaturation	
۱min	۵۵°C	Annealing	مرحله دوم (۳۰ سیکل)
۱/ ۳۰min	۷۲°C	Extention	
۵min	۷۲°C	Final Extention	مرحله سوم (۱ سیکل)
۳min	۴ °C	Cooling	مرحله چهارم (۱ سیکل)

DNA) Ơǭ ğƐg ƷÑǕ Ǵ ğƿ Gǽ ĸǵǴÑƷ for center HPA ,FEPTU) (ƳyĸƷ ƿÑƷ Ɛ ǳyǁ ǴǁƠ NCTC 12821, United pneumophila.L ,infections ÆǭğƐgƷÑǕ ǴƐŬY ğƿ Gǽ ƿ (Kingdom, London .yǁ ǴƟƐū ƐǒƷY (Ɛǎǭ ƙǆ)

ŘǑǾ ƷY PCR ǀgƿ ǻƐ ǳyǁ ǻƐƷǳYǭǆ ğÑǬŢǭ ŘǑǾ ĥ ğƿyΣ ƷY ǳyǭǆ ÆǭY ǴǭƐ ĸ ĸǵƙÑǭƿƐǴǭ .ƠƟƐū ƷƐǎ ƐǬŬǽƷÑǭƐǁ

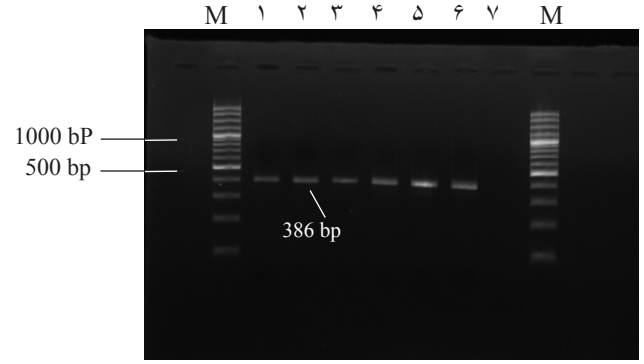
ǫĸǙ ƐƷÑƿƐŬǽŘǕÛPCR ƟèÑdžŢǭ ÆƷƐƿ DŽÚ ǂ ƠΣ

Loading Buffer ƿěĤ/Ĩ ƐƷĸūǆ ğƫ ƷĸƚǰǻƐ .ƠƟƐūÆǭ Ɛǂ ǳyǁ ƧƷǑǑ ğƫ ǻƷǭǆŪƷ ƠΣ ƿ ǴƟƐū ƷƐǎ ǳYĸǷƷ ƳƷÑǭ DNA ƠƐƒ ǳyğǂ ǭ ǻƐ ƿ yǽǭƿƐ ǫÑyǆ Ɛǂ ƐƷÑƿƐǬŬǽ ǳYĸǷƷ (UV Tech, France) ƐƷǦǁǆ ǳŬƷY Ɛǂ ğƫ ǻƿƷ ÛÆǆ ǻĸǵǴÑƷ ƷY ÊÑŤ ÆƷǁ ƿ ÆƷƐ Ɛǂ Řǁǻ .yǁ ƿ ÑƷ Ɛǂ ǳyǁ ǴǁƠ DNA Ɛǂ ǳYĸǷƷ ĸ Nested PCR ŘǕ ǻĸǵyĸ ǳyğĸ ǂ ǭ ƿ ÆƷƐ Ɛǂ yǔ Ǵƚ ƠƟƐū ǫĸǙ ƳƷyĸƷ ƳƷÑǭ ƷY ĀǿŢǿ ƿ ÆƷƐ ÛƐǬƐ ŬǭǏ ƐǵĸǳyǁŘǿǕǂǿ .ƠƟƐū ǫĸǙ ÆǆǻĸǵǴÑƷ



LEG 225-LEG 858 ǻĸǵƐǬƐ (ĥ LEG 448- JRP ǻĸǵƐǬƐ (Ĥ (100bp) ÆǭŪǭ ƐūĸƷǁ (M
LEG448-LEG858 ǻĸǵƐǬƐ (Ħ

ǜ ǫǕǭ ǻĸǵƐǬƐ Ɛǂ ǳYĸǷƷ ĸ ÊǿƟÑǭǒ ÊÑŤ ƳƷyĸƷ ǴÑūPCR ƟèÑdžŢǭ ƐƷÑƿƐǬŬǽ :Ĥ ŘŪǁ



Ĥǵʰ cfuƠŏǫŮ (ħ Ĥǵ cfuƠŏǫŮ (Ħ Ĩcfu ƠŏǫŮ (ĥ ƙŃŏ ʒϒ Ĥcfu ƠŏǫŮ(Ĥ (100bp) ÆĺŃŮĺŃǫ Ɛūĸƽĸȣǁ (M
ÆÉÅȣǫ ǧƐǪȣt(Ī Ơǁĸǫ ǧƐǪȣt(ĩ Ĥǵ#cfu ƠŏǫŮ(Ĩ

LEG 448-JRP ƐŽǂƐřɛł ȡϒĸÅǫƽł ĸ PCR p ƿʒ Ơǒƽĸƽ f ǰǒǒūơ ƠΗΣ ɛʒŃəƿƐǪŮĿǂ ƨǂĸǪǁ :ĥ ŘŮǁ

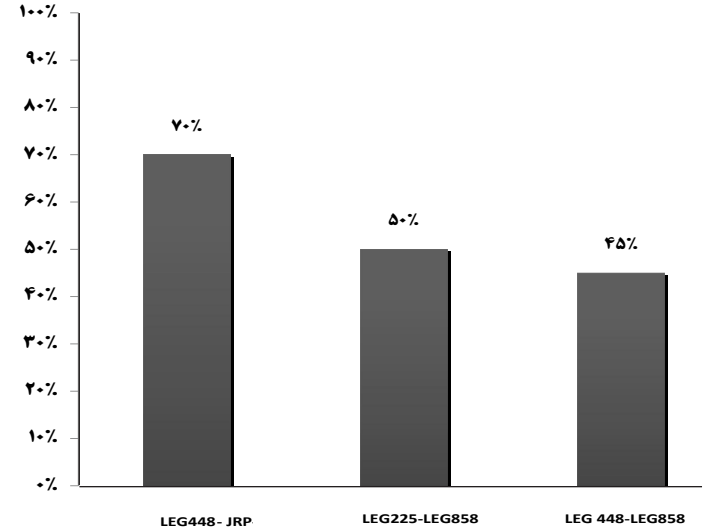
PCR p ƿʒ Ơǒƽĸƽ f ǰǒǒūơ

ɛł ȡϒĸÅǫƽł ĸ PCR ŘŽŰ Ơǒƽĸƽ f ǰǒǒš Ǫǵ ĀǒǾƮơ ǰǂł ʒϒ ĸ Ālĸăǫ ʒĸt ǰǂł ǻłƐ.Ơəƨū ʒłƐā ÆƽʒƐʎ ϒʒŃǫ ϒʒłyϒǁǫƽł p Ńƽ DŽƱǂǫ ƠŏǫŮ ĸ ÉǂĸǂƨǪǫtĸ ʒŃǒƽǁĸŚƽŃƽ yǁʒĸə Ŧǫ ϒʒłyϒǁǫƽł ɛł Ĥ -Ĥǵ# cfu ƠŏǫŮ ɛł ÆĺĸǂƨƐƽ ǻɛĸƽĀǒāʒ ŘŽŰ ĸ p yǁ ǴǾƕơ PCR ǀ ƕtłƿ p DNA ƨłƐƱǫƽł ŘŽŰ 5 Śƽ .yǂϒƐū ǴǾƕơ ÊǁŃǂŤĸ .yǁ ǫĸʅǁ Ɛŏǁ ϒʒŃǫ ÆǂĸǂƨǪǫtĸ ǻĸǵƠāʒ ǻƿʒ Ɛʎ

ǻʒĸǫd ʒŃǫɛd

ȡϒĸÅǫƽł ɛǒĸĸǁd ƨǂĸǪǁ ƠΗΣ SPSS ǻʒĸǫd ǴǫĸǁƐʎ ɛł ĀǒǾƮơ ǰǂł ʒϒ ŮĺŃǁĿ Ǵƽǂĸǻǫ ƠΗΣ McNemar ǻʒĸǫd ʒŃǫɛd ɛł .yǂϒƐū ƨǂĸǪǁ (P<ǵ/ǵĨ) Ɛǂϒĸǻǫ ǻłƐʎ .yǁ ȡϒĸÅǫƽł ĸǵƐʒǂƐř ù ǫǁUǫ .yǁ ǴǪəƐū Ɛŏǁ ʒϒ ʒłϒÆǁūǫ

درصد فراوانی نمونه های مثبت با استفاده از پرایمرهای مختلف جهت بررسی لژیونلا



ÊǁŃĠŤĸ ŮƽʒƐʎ ƠΗΣ ù ǫǁUǫ ŭĸǵƐŽĠłƐřɛł ȡϒĸÅǫƽł ĸ Ơǁĸǫ ǻĸǵ ǴǁŃŽǁ ÆǁƿłƐə yDžʒϒ :Ħ ŘĞǁ

ĸǵǴǪəĸǻ

ϒʒŃǫ ÊǁŃǂŤĸ ϒŃΣƿ ÆƽʒƐʎ ƠΗΣ ǴǁŃŽǁ ĩǵ Ǵūǩĸāǫ ǰǂł ʒϒ ÆƽʒƐʎ ɛł Řǁǻ yǁ Ɛŧƶ Ǵŧ ʒŃĂ ŽĸŽǵ .Ơəƨū ʒłƐā ǀ ǂĸǫƐd yǁĸʎ ƶǂĸƽ p ŮŃǁ ȡyǵĸǂǫ ƠΗΣ ŮǴūǩĸāǫ ϒʒŃǫ ÆʎǻǻǴǁŃŽǁ ǻǂƐʎ ϒʒłyϒǁǫƽł p Ńƽ ɛł Û ù ǫǁUǫ ǻǻǵƐŽĠłƐř ĸ ǴǪəĸǻ ŘǾŮǂǫ ǻǻǵyǵĸǂǫ p ÆƽʒƐʎ ɛł yűʎ Ǵŧ yǂϒƐū ȡϒĸÅǫƽł ʒŃŏǁǫ ǰǂł ǫĸʅǁ ÆʎǻǴǁŃŽǁ ϒʒŃǫ ʒϒ ÆƽʒƐʎ p ĀǾƮơ ŮǴǪəĸǻ ŘǾŮǂǫ PCR ΘèŃdžŤǫ ȡyϒǁ ȡyǵĸǂǫ ǻǻǵyǵĸǂǫ ƐūŽĸǾĸ Ĥ ŘŮǁ .Ơəƨū ÊǁŃǂŤĸ ϒʒłyϒǁǫƽł p Ńƽ ƠΗΣ ƩŽǂƐřɛł ŮŃǁ Ǵƽ Ɛǵ ɛł ȡϒĸÅǫƽł ĸ ʒłƐā ÆƽʒƐʎ ϒʒŃǫ ƨǾǁ PCR ŘŽŰ Ơǒƽĸƽ f ĀǾƮơ ǰǂł ʒϒ.Ơƽł Ơǒƽĸƽ f ǰǒǒūơ ƠΗΣ ŮƨʒŃəƿƐǪŮĿǂ ƨǂĸǪǁ ĥ ŘŮǁ ʒϒ Ǵŧ Ơəƨū Ǵŧ LEG448 -JRP ǻĸǵƐŽĠłƐř ɛł ȡϒĸÅǫƽł ĸ PCR p ƿʒ

ÛYfY ǯK ǂ ǁ ÆăØ˺Ţǫ åĸgǴǁÑǯǁ ǯY ǯȝ ÆǀĸǽYȝ OØǀƽĸƽ ƒ ǰǽǨǫ ǂǀ
.Oƽǂ ǀǽy‖ Ǵǽǯȝǂ

åĸgǨǯǽǨǩ ɛǂ ǀǽYĸÅǫƽǂĸǁ OˮǁĸRǫ åĸgǴǁÑǯǁ ÆǁǁpǂǨə yDžȝY ÛǂǁH ǨĞ‖ ǯY
p (LEG225-LEG858) ،(LEG448–JRP) ù ǫǫǁUǫ
.Oƽǂ ǀǽy‖ Ǵǽǯȝǂ ÊǁÑǽŤĸ ÆƽǯȝǨ OˮȞΣ(LEG448-LEG858)
OˮȞΣ ĸgǴǁÑǯǁ PCR ΘèÑdžŢǫ ɛȝÑəpǨǫǁÙĸǂ ħ ǨĞ‖ ǯY
ɛÑəpǨǫǁÙĸǂ ɜǽǨǁǁ Ï ǨÙ‖ ǯY p ĸgåǨǫǂĸǁ ÆǫÑǯŰ DŽǿU ǂơ
åĸgǨǯǽǨǩ ɛǂ ǀǽYĸÅǫƽǂĸǁ ĸǁ ÊǁÑǽŤĸ åǨǫgĸǁ OˮǁĸRǫ åĸgǴǁÑǯǁ
.Oƽǂ ǀǽy‖ Ǵǽǯȝǂ JRP p LEG448

PŢǁ

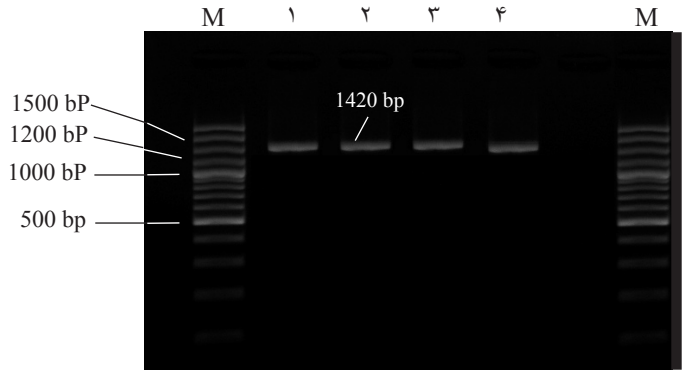
ÊǿəÑǫÑǁř ÊǁÑǽŤĸ ɛǂ Æ‖ĸǁ åĸgåǯȝĸǯǿǁ p ΘÊÙǂǫ ǴǁǴΣÑơĸǁ
ǯǂÑǁŰ ǴǁÊǁÑǽŤĸ Ǵǁĸgǯĸǫƽǯȝĸǯǿǁ ǩa ÆūYÑǁd Ǵǂ ǰǽǂ ǴǁǨǒǁ p
Ǵǫəȝǯȝĸǯ‖ ǴǁÆǁĸǫƽǯȝĸǯǿǁ 5 ǽɛÑǫǁÑǽŤĸ DŽUǂǫ ŰǂÑǁǂ ɛǂ ÆŰǽ
åĸgp pȝ ǰǽǨĸǁdǁ ÛOƽǂ Æǁĸǫƽǯȝĸǯǿǁ åĸgOˮǁÑÅŰ ǀǽǫǫɛ ǯY p
.(ĥġ)OƽsǽǯȝpǨlj ĸǫǂÑŰ ǰǽǂ ŭǽǨƽ p ÃǿãY Æǽĸƽĸǁ
.OƽsÊǁÑǽŤĸ åǨǫǂĸǁ Æǽĸƽĸǁ ǯY ƽĸǁǫ åĸgp pȝ ɛǂ ÆŰǽ PCR
Æǽèĸǁ Oǿƽĸƽf ɛǂ ǨŰǽY åĸgp pȝ Ǵǁ Oˮǁs‖ pȝ ǰǽǂ
Ǫg Û(ĥĤ) Oƽǂ ÆǁĸǿǫƽY ĸǁĸã ŭǽǨƽ ǯa ɜǽǨǫǁ p ǀǽYÑǁ ǯǂYȝÑơǨǁ
ǯY ÊǁÑǽŤĸ åǨǫǂĸǁ Æǽĸƽĸǁ åǂǨǁ p pȝ ǰǽǂ ɛǂ ǀǽYĸÅǫƽǂ ǰǿƽš
º(ĥĥ)Oƽǂ ǴǽǨDžǴǁǯpǨǽǫǨǫǿŭǿƽp 2 ĸǿǽǫ ǯY ÆăØ˺Ţǫ åĸgǴǁÑǯǁ
ǫĸǁǂ njǂǨ‖ ǯYǨt ǴǁǿĦǁ ĸǁ ǀǽy‖ ÆüƽǴǁĸǁăǫ ǰǽǂ ǯY ǰǽǨǁĸǁ

ɜǽĸǫǁ OˮãY Ûǂ ƽĸǁǫ åĸgǨǯǽǨǩ kĸUǫǁH ǴǫǯΣ ɛǂ PCR ǀ ǂtǂp
ǯY ǨǯǽǨǩ ǰǽǨơ ǂ ƽĸǁǫ p ǀǽYfY ǯǂǨāˮ ÆƽǯȝǨǁ YȝÑǫ ǂȝ ĸgˮ ǀ ǽĸǫɛd
.YÑ‖ ǀǽYfY DŽǿUǂơ ÊǁÑǽŤĸ åǨǫǂĸǁ Æǽĸƽĸǁ ! ÑdžƟ

ĸǁ Æǁd åĸgǴǁÑǯǁ ǯY ÊǁÑǽŤĸ Æǽĸƽĸǁ OˮȞΣ Ǵǘǁĸãǫ ǰǽǂ ǯY
ǀǽYĸÅǫƽǂ YȝÑǫ ù ǫǫǁUǫ ǨǯǽǨǩ ŰÑǁ Ǵƽ ÛPCR p pȝ ɛǂ ǀǽYĸÅǫƽǂ
ɛǂ ǀǽYĸÅǫƽǂ ΘȝÑDž ǯY Ǵǂ YfY ǯĸǂǁ ǴǫDžĸƒ ɜǽĸǫǁ.Oəǂū ǯǂǨā
ΘȝÑDž ǯY p ĸgǴǁÑǯǁ ěȞĨ ¡LEG448-LEG858 åĸgǨǯǽǨǩ
ÆǁP ÛĸgǴǁÑǯǁ ěĨǵ¡LEG225-LEG858 åĸgǨǯǽǨǩ ɛǂ ǀǽYĸÅǫƽǂ
yDžȝY ÛLEG448– JRPåĸgǨǯǽǨǩ ɛǂ ǀǽYĸÅǫƽǂ ΘȝÑDž ǯY
p ȝǂȝū ÊǁÑǽŤĸ Ǵǁ ǀǽYÑǁd ÛYÑǁ ěĪǵYpyƒ Ǵǂ ĸgǴǁÑǯǁ ɛǂ åǂǫǁǂǿǁ
.yǂy‖

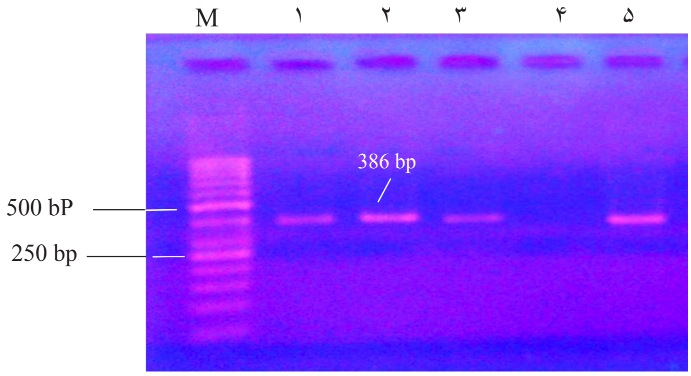
åȝĸǫd ǯÑǫɛd 2 ĸƽǂ ɛǁ ĸgǨǯǽǨǩ ù ǫǫǁUǫ ŰÑǁǂ Ǵƽǽĸǂǫ YȝÑǫ ǯY
åĸgǨǯǽǨǩ ɛǂ ǀǽYĸÅǫƽǂ ΘȝÑDž ǯY åȝYÆǁūǫ ÙÊǫƟǂ ÛMcNemar
åĸgǨǯǽǨǩ ǰǿǂȚǯǵg p LEG448– JRPp LEG225-LEG858
y‖ ǀǽyĞĸƽǫ LEG448– JRPp LEG448- LEG858
ɛǂ ǀǽYĸÅǫƽǂ ΘȝÑDž ǯY åȝYÆǁūǫ ÙÊǫƟǂ ÆǁP Û(P<ġ/ġġĤ)
LEG448-LEG858p LEG225-LEG858 åĸgǨǯǽǨǩ
.(P=ġ/ĥĨ) yǽYǨŰ‖ǀǽyĞĸƽǫ

DŽUǂǫ ǴǫəǨū qĸlǁǂ åĸgǀ ǽĸǫɛd ɜǽǨǫǁ Ǵǁ ǴΣÑơĸǁ ǰǽǂǨǁĸǁ
åĸgǨǯǽǨǩ ǨŰǽY Ǵǁ Oˮǁs‖ LEG448– JRP ǨǯǽǨǩ Ǵǂ yǽYǨū
(LEG448-LEG858p LEG225-LEG858) ǀǽYĸÅǫƽǂ YȝÑǫ
Ǵǁ Æǁd åĸgǴǁÑǯǁ ǯY ÊǁÑǽŤĸ åǨǫǂĸǁ Æǽĸƽĸǁ ǯY ǨpÑǫ åǨǯǽǨǩ
.YpȝÆǫ ȝĸǯ‖



ÆÅǁǫ ğǨǁǂt(Ï ÛOˮǫ ğǨǁǂt (ħ¡PCRΘèÑdžŢǫ (ĦpĥpĤ ¡ (100bp) ÆĺÑŰĺÑǫ ǯūĸƽĸǁ (M

⁎Ĥ/Ï ɛȝĸūd ğţ åpȝ ɛǂ ĸgåǨǫǂĸǁ ÆǫÑǯŰ DŽǿUǂơ OˮȞΣ ĸgǴǁÑǯǁ PCR ΘèÑdžŢǫ ɛȝÑə pǨǫǁÙĸǂ :h ǨŰ‖



[illegible] (M [illegible] (50bp)؛ [illegible] PCR [illegible]

[illegible] PCR [illegible] LEG448 **JRP** [illegible]

[illegible] LEG448-JRP [illegible] Nested PCR [illegible] LEG448-JRP [illegible] LEG225 - LEG858 [illegible]

[illegible] PCR [illegible]

[illegible] PCR [illegible]

[illegible] (sharp ness) [illegible]

[illegible] DNA [illegible] PCR [illegible]

[illegible]

[illegible] DNA [illegible] PCR [illegible]

1. Brooks GF, Butel JS, Morse SA. Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology. 23rd ed. Asia: McGraw-Hill; 2004.
2. Friedman H, Klein TW, Bendinelli M. Infectious Diseases andSubstance Abuse (Infectious Agents and Pathogenesis). 1st ed. New York: Springer; 2005.
3. O'Neill E, Humphreys H. Surveillance of hospital water and primary prevention of nosocomial legionellosis: what is the evidence?. Journal of Hospital Infection. 2005;59(4):273-9.
4. Ishimatsu S, Miyamoto H, Hori H, Tanaka I, Yoshida S. Sampling and detection of Legionella pneumophila aerosols generated from an industrial cooling tower. The Annals of Occupational Hygiene. 2001;45(6):421-7
5. Tello R, Hill T, Hartnell G, Costello P, Stokes K. Legionella infected thoractic aortic graft. Journal of Computerized Medical Imaging and Graphics. 1993;17(1):61-7.
6. Ahmadinejad M, Shakibaie MR, Shams K, Khalili M. Detection of Legionella pneumophila in cooling water systems of hospitals and nursing homes of Kerman city, Iran by Semi- Nested PCR. International Journal of Biological and Life Sciences. 2011;7(2):70-3.
7. Devos L, Clymans K, Boon N, Verstraete W. Evaluation of nested PCR assays for the detection of Legionella pneumophila in a wide range of aquatic samples. Journal of Applied Microbiology. 2005;99(4): 916-25.
8. Ng DL, Koh BB, Tay L, Heng BH. Comparison of polymerase chain reaction and conventional culture for the detection of Legionellae in cooling tower waters in Singapore. Letters in Applied Microbiology. 1997;24(3):214-6.
9. Joly P, Falconnet PA, Andre J, Weill N, Reyrolle M, Vandenesch F, et al. Quantitative real-time Legionella PCR for environmental water samples: Data interpretation. Applied and Environmental Microbiology. 2006;72(4):2801–8.
10. Pepper IL, Gerba CP. Environmental Microbiology: A Laboratory Manual. 2nd ed. Amesterdam: Elsevier Academic Press; 2005.
11. Yasmon A, Yusmaniar, Karuniawati A, Bela B. Simultaneous detection of Legionella species and

Legionella pneumophila by duplex PCR (dPCR) assay in cooling tower water samples from Jakarta, Indonesia. Medical Journal Indonesia. 2010;19(4):223-7.
12. Wellinghausen N, Frost C, Marre R. Detection of Legionellae in hospital water samples by Quantitative real-time LightCycler PCR. Applied and Environmental Microbiology. 2001;67(9):3985–93.
13. Declerck P, Verelst L, Duvivier L, Van Damme A, Ollevier F. PCR as a test for the presence or absence of Legionella in (cooling) water. Water Science and Technology. 2003;47(3):103-7.
14. Dusserre E, Ginevra C, Hallier-Soulier S, Vandenesch F, Festoc G, Etienne J, et al. A PCR-based method for monitoring Legionella pneumophila in water samples detects viable but noncultivable Legionellae That can recover their cultivability. Applied and Environmental Microbiology. 2008;74(15):4817-24.
15. Ko KS, Hong SK, Lee KH, Lee HK, Park MY, Miyamoto H, et al. Detection and identification of Legionella pneumophila by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the RNA polymerase gene. Journal of Microbiological Methods. 2003;54(3):325-37.
16. Delgado-Viscogliosi P, Solignac L, Delattre J-M. Viability PCR, a culture-independent method for rapid and selective quantification of viable Legionella pneumophila cells in environmental water samples. Applied and Environmental Microbiology. 2009;75(11):3502-12.
17. Edagawa A, Kimura A, Doi H, Tanaka H, Tomioka K, Sakabe K, et al. Detection of culturable and nonculturable Legionella species from hot water systems of public buildings in Japan. Journal of Applied Microbiology. 2008;105(6):2104-14.
18. Villari P, Motti E, Farullo C, Torre I. Comparison of conventional culture and PCR methods for the detection of Legionella pneumophila in water. Letters in Applied Microbiology. 1998;27(2):106–10.
19. Wullings BA, Kooij VD. Occurrence and genetic diversity of uncultured Legionella spp. in drinking water treated at temperatures below 15°C. Applied and Environmental Microbiology. 2006;72(1):157–66.
20. Lin YE, Stout JE, Yu VL. Prevention of hospital-acquired legionellosis. Current Opinion in Infectious Diseases. 2011;24(4):350-6.
21. Yáñez MA, Barberá VM, Catalán V. Validation of a new seminested PCR-based detection method pneumophila. Journal of Microbiological Methods. 2007;70(1):214-7
22. Fittipaldi M, Codony F, Morato J. Comparison of conventional culture and real-time quantitative PCR using SYBR Green for detection of Legionella pneumophila in water samples. Water Sanitation. 2010;36(4):417-24.
23. Perola O, Kauppinen J, Kusnetsov J, Kärkkäinen UM, Lück PC, Katila ML. Persistent Legionella pneumophila colonization of a hospital water supply: Efficacy of control methods and Amolecular epidemiological analysis. Acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica. 2005;113(1):45-53.

Sensitivity Comparison of Different 16s rDNA- Specific Primers for Detection of Legionella Species in Aquatic Samples

Farzaneh Baghal Asghari[1], *Mahnaz Nikaeen[2]

[1]Department of Environmental Health Engineering, Faculty of Nursing and Health, Urmie University of Medical Sciences, West Azarbaijan, Iran

[2]Department of Environmental Health Engineering, School of Health, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Received; 05 April 2012 Accepted; 27 July 2012

ABSTRACT

Background and Objectives: Legionella are gram-negative bacteria widely dispersed in natural and man-made water sources. Some Legionella species are pathogenic and could cause respiratory infections. Cultivation technique is the conventional method for the detection of Legionella spp. in aquatic samples. However, the method has low sensitivity and require prolonged incubation period. Therefore, Polymerase chain reaction (PCR) as a rapid method with extreme sensitivity is used. The present study was designed to evaluate the feasibility and sensitivity of PCR method for detection of Legionellas pp. in aquatic samples using three sets of primers.

Materials and Methods: In this study, 60 water samples were investigated for the presence of Legionella species using Nested- PCR technique. The sensitivity of this technique was evaluated for the detection of Legionella species in aquatic samples using three primer sets, including (LEG225-LEG858), (LEG448-LEG858), and (LEG448-JRP).

Results: The nested PCR assay revealed that detection percentage of Legionella in samples was 70 when LEG448-JRP primers were used, whereas this percentage reduced to 50 and 45 when we applied prime sets of LEG225-LEG858 and LEG448 - LEG858, respectively.

Conclusion: The results of the study showed that contamination of aquatic samples to the Legionella spp. could be easily and rapidly detected by nested PCR. However, selecting appropriate method for DNA extraction and choosing the primers are important factors in efficiency and sensitivity of detection method.

Keywords: PCR, Water, Detection, Legionella

***Corresponding Author**: *nikaeen@hlth.mui.ac.ir*
***Tel:** +98 311 7922660, **Fax:** +98 311 6682509*