University of Tehran Press

Journal of Veterinary Research

Homepage: jvr.ut.ac.ir

Online ISSN: 2251-6190

Original Article

J Vet Res, Volume 78, Number 2, 2023, 119-129

Evaluating the Effect of Culture Supernatant of *Pseudomonas aeruginosa* on Removing the Inhibitory Effect of Heparin in Real-Time PCR Test

Aysan Ashrafi[1]✉, Hamid Staji[2]✉, Keyvan Keramati[3]✉

[1] *Graduated from the Faculty of New Sciences and Technologies, Semnan University, Semnan, Iran*
[2] *Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran*
[3] *Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran*

Received: *25 February 2023*, ***Accepted:*** *3 May 2023*

10.22059/jvr.2023.354627.3326 20.1001.1.20082525.1402.78.2.5.9

Abstract

BACKGROUND: Heparin is a sulfated glycosaminoglycan. Blood is a common source for DNA detection in all kinds of samples, and anticoagulants such as heparin and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) are used to prevent coagulation. Because heparin has a strong inhibitory effect on polymerase chain reaction (PCR), it is not used in samples that will be tracked by DNA. There are physical, chemical, and enzymatic methods to eliminate the inhibitory effect of heparin on PCR test.

OBJECTIVES: First, to compare the intensity of the inhibitory effect of two anticoagulants, heparin, and EDTA, on the Real-Time PCR (qPCR), and then to investigate the impact of the heparinase enzyme present in the medium culture extract of *Pseudomonas aeruginosa*, on removing the inhibitory effect of heparin during the real-time PCR.

METHODS: In the present study, two blood samples containing heparin and EDTA were subjected to a real-time PCR test to check the intensity of the inhibitory effect. Then, the medium culture extract of *Pseudomonas aeruginosa* was added to the heparinized blood sample infected with *Escherichia coli* bacteria in two groups with different conditions. In the first group, the DNA in the heparinized blood sample was extracted by the phenol-chloroform isoamyl alcohol method. Then, these samples were incubated with the extract of *Pseudomonas aeruginosa* bacteria culture medium at different hours, but in the second group, the samples were incubated at different hours before DNA extraction. Also, the DNA concentration in both groups was measured by a Nanodrop device, and finally, all samples were subjected to a real-time PCR test.

RESULTS: The results of the research samples showed that although the heparinized blood sample contains more DNA concentration than the EDTA blood sample, it completely prevents genome replication. Also, incubating heparinized blood with *Pseudomonas aeruginosa* culture medium extract before DNA extraction for more than 24 hours removes the inhibitory effect of heparin during the real-time PCR, even at a lower cycle threshold than the EDTA-containing sample.

CONCLUSIONS: The *Pseudomonas aeruginosa* culture medium extract may enable researchers to use heparinized blood samples for genome amplification and diagnosis without using expensive and limited commercial heparinase enzyme.

Keywords: EDTA, Glycosaminoglycan sulfate, Heparinase, *Pseudomonas aeruginosa*, qPCR

Copyright © Journal of Veterinary Research: Open Access; Copying, distribution and publication are free for full use with attribution. ©The Author(s).
Publisher: University of Tehran

Corresponding author: Hamid Staji, Tel/Fax: +9823-33654215 / +9823-33654215

How to cite this article:

Ashrafi A, Staji H, Keramati K. Evaluating the Effect of Culture Supernatant of *Pseudomonas aeruginosa* on Removing the Inhibitory Effect of Heparin in Real-Time PCR Test. J Vet Res, 2023; 78(2): 119-129.
doi: 10.22059/jvr.2023.354627.3326

Figure Legends and Table Captions

Figure 1. Comparing DNA Concentration Extracted From Blood Samples Containing Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA) and Heparin in Serial Dilutions of 10^{-4} (S1) to 10^{-1} (S5).

Figure 2. *Escherichia coli* Genome Replication Curve Based on the Cycle Threshold (CT) of Three Groups of Physiological Serum, Blood Containing Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA), and Heparin.

Figure 3. *Escherichia coli* Genome Replication Curve Based on the Cycle Threshold (CT) in Two Heparin A (HA) and Heparin B (HB)Groups in Different Durations (2, 4, 6, 8, and 24 h) and the Positive Control Sample (PC).

Figure 4. *Escherichia coli* Genome Replication Curve Based on Cycle Threshold (CT), HB Group in different Durations (48 and 72 h), and the Positive Control Sample (PC).

Figure 5. Standard Curve, Standard Samples Along With HB Treatment Group in Different Durations (24, 48 and 72 h) in Real-Time PCR Test.

Figure 6. Graphic Diagram of the Statistical Comparison of the Results of the Three Groups of Heparin B in Different Durations (24, 48, and 72 h) With the Sample Blood Containing Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA).

مجله تحقیقات دامپزشکی
Homepage: jvr.ut.ac.ir
شاپا الکترونیکی: ۲۲۵۱-۶۱۹۰
انتشارات دانشگاه تهران
مقاله پژوهشی

دوره ۷۸، شماره ۲، ۱۴۰۲، ۱۲۹-۱۱۹

ارزیابی اثر مایع رویی کشت *سودوموناس آئروژینوزا* بر رفع اثر مهارکنندگی هپارین در آزمون Real-TimePCR

آیسان اشرفی[۱]، حمید استاجی[۲]، کیوان کرامتی[۳]

[۱] *دانش‌آموخته دانشکده پردیس علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران*
[۲] *گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران*
[۳] *گروه آموزشی علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران*

تاریخ دریافت: ۶ اسفند ۱۴۰۱، **تاریخ پذیرش:** ۱۳ اردیبهشت ۱۴۰۲
10.22059/jvr.2023.354627.3326 20.1001.1.20082525.1402.78.2.5.9

چکیده

زمینه مطالعه: هپارین یک گلیکوزآمینوگلیکان سولفاته است. خون یک منبع متداول برای ردیابی DNA موجود در انواع نمونه‌ها می‌باشد که برای جلوگیری از انعقاد آن از ضد انعقادهایی چون هپارین و EDTA استفاده می‌شود. هپارین به علت داشتن اثر مهارکنندگی شدید برروی PCR در نمونه‌هایی که قرار است مورد ردیابی DNA قرار بگیرند، بکار نمی‌رود. جهت حذف اثر مهاری هپارین بر آزمون PCR، روش‌های فیزیکی، شیمیایی و آنزیمی وجود دارد.

هدف: مطالعه حاضر ابتدا با هدف مقایسه شدت اثر مهارکنندگی دو ضد انعقاد هپارین و EDTA بر Real-TimePCR(qPCR)، سپس بررسی اثر آنزیم هپارینیاز موجود در عصاره محیط‌کشت باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* بر رفع اثر مهارکنندگی هپارین طی Real-TimePCR صورت گرفت.

روش‌کار: در مطالعه حاضر ابتدا دو نمونه خون هپارینه و EDTAدار جهت بررسی شدت اثر مهارکنندگی مورد آزمون Real-TimePCR قرار گرفتند. سپس در ادامه به نمونه خون هپارینه آلوده به باکتری *اشیرشیاکلی* در دو گروه با شرایط مختلف، عصاره محیط کشت باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* اضافه شد. در گروه اول ابتدا DNA موجود در نمونه خون هپارینه، توسط روش فنول-کلروفرم ایزوآمیل الکل استخراج شد. سپس گرمخانه‌گذاری این نمونه‌ها با عصاره محیط‌کشت باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* در ساعات مختلف صورت گرفت، اما درگروه دوم، نمونه‌ها قبل از استخراج DNA، در ساعات مختلف گرمخانه‌گذاری شدند. همچنین غلظت DNA موجود در هر دو گروه توسط دستگاه نانودرآپ اندازه‌گیری شد و در نهایت تمام نمونه‌ها مورد آزمون Real-TimePCR قرارگرفتند.

نتایج: تجزیه و تحلیل نتایج حاصل از نمونه‌های مورد پژوهش نشان داد که نمونه خون هپارینه با وجود این‌که غلظت DNA بیشتری را نسبت به نمونه خون EDTAدار شامل می‌شود، اما به‌طور کامل مانع تکثیر ژنوم می‌شود. همچنین تیمار خون هپارینه به همراه عصاره محیط‌کشت باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* قبل از استخراج DNA به مدت زمان بیشتر از ۲۴ ساعت، موجب رفع اثر مهاری هپارین طی آزمون Real-TimePCR، حتی در چرخه آستانه (Cycle:CT thershold) پایین‌تر از نمونه EDTAدار می‌شود.

نتیجه‌گیری نهایی: استفاده از عصاره محیط‌کشت باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* ممکن است محققین را قادر سازد، بتوانند بدون نیاز به استفاده از آنزیم هپارینیاز تجاری گران‌بها و محدود، از نمونه خون هپارینه در راستای تقویت و تشخیص ژنوم استفاده کنند.

کلمات کلیدی: *سودوموناس آئروژینوزا*، گلیکوزآمینوگلیکان سولفات، هپارینیاز، EDTA، qPCR

کپی‌رایت © مجله تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است، © نویسندگان.
ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

***نویسنده مسئول**: حمید استاجی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران*

مقدمه

واکنش زنجیره پلیمراز (PCR) به‌طور گسترده، به‌عنوان روشی استاندارد برای تشخیص و شناسایی میکروارگانیسم‌ها و نشانگرهای ژنتیک، در انواع مختلفی از نمونه‌ها استفاده می‌شود (۱). PCR یک واکنش بسیار سریع، حساس و آنزیمی می‌باشد (۱-۴). واکنش زنجیره پلیمراز کمی

(quantitative PCR) یا Real-TimePCR، یکی از انواع فرایند PCR است که به علت مزایایی چون سرعت، حساسیت بالا و تکرارپذیری، به عنوان جایگزینی مناسب برای PCR معمولی در نظر گرفته می‌شود و در بسیاری از آزمایشگاه‌ها به ویژه آزمایشگاه‌های تشخیص مولکولی از آن به صورت گسترده استفاده می‌شود (۵، ۶).

به طور کلی واکنش زنجیره پلیمراز به علت حساسیت و دقت بالا، مستعد مواد بازدارنده‌ای می‌باشد که ممکن است در نمونه آنالیز شده وجود داشته باشد و یا در طول پردازش نمونه یا استخراج اسیدنوکلئیک به نمونه وارد شود و بر حساسیت سنجش آن تأثیر بگذارد و یا حتی منجر به نتایج منفی کاذب شود. مهارکننده‌های PCR شامل گروه متنوعی از مواد با خواص و مکانیسم‌های عمل متفاوت هستند. وجود چنین به اصطلاح مهارکننده‌هایی که شامل تمام موادی می‌شوند که بر آزمون PCR تأثیر منفی دارند، به جهت کاربرد گسترده آزمون PCR در زمینه‌های مختلف، یک معضل بزرگ تلقی می‌شود (۲، ۳).

مهارکننده‌های آزمون PCR گروه ناهمگنی از مواد شیمیایی، عمدتاً ترکیبات آلی چون نمک‌های صفراوی، پلی‌ساکاریدها، پروتئین‌ها و غیره می‌باشند. همچنین نمونه‌های بالینی مانند نمونه‌های خون، نیز حاوی مهارکننده‌هایی چون هپارین، هموگلوبین، هورمون‌ها، ایمونوگلوبین G، لاکتوفرین و میوگلوبین می‌باشند (۳، ۷، ۸). هپارین یک گلیکوزآمینوگلیکان با وزن مولکولی بالا است و به دلیل عملکردهای زیستی متعددی مانند ضد انعقاد، ضد ترومبوز و ضد تومور که شامل می‌شود، در زمینه‌های مختلف به ویژه بالینی بسیار استفاده می‌شود (۹، ۱۰). وزن مولکولی بالا این پروتئین، می‌تواند سبب کاهش عملکرد مؤثر آن به عنوان ضد انعقاد گردد و یا حتی عواقب نامطلوب شدیدی چون ترومبوسیتوپنی و اختلال در فرایند مولکولی PCR به علت اتصال و یا اختلال در ژنوم و یا آنزیم‌های مؤثر در فرایند تکثیر DNA را سبب شود (۱۱). در همین راستا به جهت اهمیت و کاربرد آزمون‌های مولکولی، در زمینه‌های مختلفی چون تشخیص عفونت، تغییرات ژنتیکی و غیره به تهیه هپارین با وزن مولکولی پایین اقدام شد (۹).

محققین در طی تحقیقات گسترده از روش‌های مختلف دپلیمریزاسیون فیزیکی، شیمیایی و هیدرولیز آنزیمی به جهت رفع عواقب ناشی از هپارین با وزن مولکولی بالا اقدام کردند (۱۲). براساس نتایج به دست آمده از هر سه روش، دریافتند که روش‌های فیزیکی چون دما و فراصوت به دلیل بازده کم محصول و اتلاف ماده خام و روش‌های شیمیایی چون اسید نیترو و پراکسید هیدروژن به علت تولید ضایعات شیمیایی، آلودگی و زمان تخریب بالا روشی مؤثر همراه با عملکرد بالا، جهت تهیه هپارین با وزن مولکولی پایین در مقیاس صنعتی نمی‌باشند (۱۳، ۱۴)، اما روش‌های هیدرولیز آنزیمی با بهره‌گیری از آنزیم‌های مختلفی چون هپارینز، به دلیل شامل شدن مزایای زیادی چون شرایط واکنش متعادل، گزینش‌پذیری بالا و اثرات نامطلوب محیطی کم، روشی مناسب و مؤثر به جهت تولید هپارین با وزن مولکولی پایین و رفع اثر مهاری هپارین تلقی می‌شوند (۱۲، ۱۵-۱۷). آنزیم‌های تجزیه کننده هپارین به صورت تجاری در بازار موجود می‌باشند، اما این آنزیم‌ها به جهت شامل شدن معایبی چون گران قیمت بودن، زمان‌بری بالا و دسترسی محدود، روشی مناسب جهت دپلیمریزاسیون هپارین در نظر گرفته نمی‌شوند (۱۸). درهمین راستا مطالعات مختلفی در جهت سنتز آنزیم‌های تجزیه کننده هپارین به صورت بیولوژیکی، به علت به صرفه و پربازده بودن این روش‌ها در جهت سنتز آنزیم هپارینز در مقیاس صنعتی صورت گرفت (۱۹).

یکی از باکتری‌هایی که امروزه به وفور در طبیعت یافت می‌شود و در محیط کشت خود به عنوان فرآورده انتهایی آنزیم هپارینز تولید می‌نماید، باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* (*Pseudomonas aeruginosa*) می‌باشد (۱۶، ۲۰). در مطالعه حاضر، ابتدا شدت اثر مهارکنندگی دو ضد انعقاد هپارین و EDTA بر آزمون Real-TimePCR بررسی شد، سپس از عصاره محیط‌کشت باکتری *سودوموناس آئروژینوزا*، جهت دپلیمریزه نمودن و رفع اثر مهارکننده هپارین موجود درخون بر آزمون Real-TimePCR استفاده شد. همچنین تأثیر پارامترهای مدت زمان و درجه حرارت، هنگام تیمار عصاره محیط‌کشت باکتری *سودوموناس‌آئروژینوزا* با نمونه خون هپارینه، نیز در راستا رفع اثر ممانعت کنندگی هپارین بر آزمون Real-TimePCR مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش کار

درطی مطالعه حاضر برای بررسی تأثیر آنزیم هپارینز موجود در عصاره محیط‌کشت باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* بر رفع اثر مهارکنندگی هپارین طی آزمون Real-TimePCR، از دو سویه باکتری *Escherichia Coli* ATCC 35218 و *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853، به ترتیب، جهت تشخیص و تقویت DNA استخراج شده توسط محلول فنول-کلروفرم ایزوآمیل الکل (۲۱)، به وسیله آزمون Real-

TimePCR و تهیه مایع رویی فاقد باکتری از محیط‌کشت باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* استفاده شد. جهت تهیه مایع رویی از محیط‌کشت باکتری *سودوموناس آئروژینوزا*، ابتدا باکتری در محیط‌کشت Brain Heart Infusion Broth (ibresco، ایران) کشت داده شد. سپس محیط‌کشت حاوی باکتری به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. پس از رشد سویه مورد نظر در محیط‌کشت مذکور اقدام به جداسازی مایع رویی توسط سانتریفیوژ با دور ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه شده و مایع رویی به دست آمده از آن جداسازی شد. سپس مایع رویی به دست آمده از محیط‌کشت مذکور از فیلتر باکتریایی سلولز استات (Cellulose acetate) ۰/۲۲ میکرومتر عبور داده شد و از آن مطابق با هدف مطالعه بهره‌گیری شد (۲۲).

بررسی و مقایسه اثر مهار کنندگی دو ضد انعقاد هپارین و EDTA بر آزمون Real-TimePCR: در این بخش از مطالعه برای بررسی اثر مهارکنندگی دو ضد انعقاد هپارین و EDTA بر آزمون Real-TimePCR، مقدار ۵ سی‌سی نمونه خون از ورید سفالیک سگ سالم تهیه شد و به لوله‌های حاوی ضد انعقاد هپارین و EDTA (MediPlus، هند) انتقال داده شد. در ادامه از سه نمونه سرم فیزیولوژی، خون هپارینه و EDTAدار جهت بررسی و مقایسه اثر مهارکنندگی هر دو ضد انعقاد ذکر شده، بر آزمون تقویت مولکولی Real-TimePCR استفاده شد. به این صورت که ابتدا به سه نمونه سرم فیزیولوژی، خون EDTAدار و هپارینه، از حجم ۲ سی‌سی محیط‌کشت Pepton Water (ibresco، ایران) حاوی باکتری *اشیرشیاکلی* (*Escherichia Coli*)، مقدار ۳۰۰ میکرولیتر باکتری *اشیرشیاکلی*، جهت تهیه غلظت باکتریایی CFU (Colony Forming Unit) $۱/۵\times۱۰^{۸}$، افزوده شد. سپس از هر سه نمونه سرم فیزیولوژی (فاقد ضد انعقاد)، خون حاوی ضد انعقاد هپارین و EDTA آلوده به باکتری *اشیرشیاکلی*، رقت‌های سریالی (۱۰ برابری)، از غلظت باکتریایی اولیه تهیه شده CFU $۱/۵\times۱۰^{۸}$ تا غلظت باکتریایی CFU $۱/۵\times۱۰^{۱}$، تهیه گردید. در ادامه DNA موجود در هر دو نمونه سرم فیزیولوژی و خون EDTAدار رقت سازی شده، از غلظت باکتریایی CFU $۱/۵\times۱۰^{۸}$ تا غلظت باکتریایی CFU $۱/۵\times۱۰^{۱}$ و نمونه خون هپارینه از غلظت باکتریایی CFU $۱/۵\times۱۰^{۸}$ تا غلظت باکتریایی CFU $۱/۵\times۱۰^{۱}$توسط روش فنول-کلروفرم ایزو آمیل الکل استخراج شد و غلظت DNA به دست آمده از هر نمونه، پس از استخراج توسط دستگاه نانودرآپ (Smart Nano، کانادا) در جذب ۲۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. سپس آزمون Real-TimePCR جهت مقایسه اثر مهارکننده دو ضد انعقاد هپارین و EDTA در حضور نمونه شاهد سرم فیزیولوژی (فاقد ضد انعقاد)، بر آزمون تقویت مولکولی Real-TimePCR صورت گرفت (۶، ۲۳).

بررسی تأثیر عصاره محیط‌کشت باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* بر هیدرولیز و رفع اثر مهارکنندگی هپارین: جهت بررسی تأثیر آنزیم هپاریناز موجود در عصاره محیط‌کشت باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* بر رفع اثر مهارکنندگی هپارین طی آزمون Real-TimePCR ، ابتدا مطابق بخش بررسی و مقایسه اثر مهار کنندگی دو ضد انعقاد هپارین و EDTA بر آزمون Real-TimePCR، نمونه خون هپارینه تهیه شد. سپس به نمونه خون هپارینه جهت تهیه نمونه خون عفونی شده به باکتری با غلظت باکتریایی CFU $۱/۵\times۱۰^{۸}$، مقدار ۳۰۰ میکرولیتر باکتری *اشیرشیاکلی* افزوده شد و رقت سازی آن‌ها تا غلظت باکتریایی CFU $۱/۵\times۱۰^{۱}$، جهت تهیه نمونه خون هپارینه عفونی شده به باکتری *اشیرشیاکلی* با غلظت باکتریایی CFU $۱/۵\times۱۰^{۴}$ صورت گرفت. در ادامه جهت بررسی تأثیر عصاره محیط‌کشت باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* بر رفع اثر مهاری هپارین، نیز عصاره باکتریایی *سودوموناس آئروژینوزا* طی دو گروه با شرایط مختلف به نمونه خون هپارینه عفونی شده به باکتری *اشیرشیاکلی* با غلظت باکتریایی CFU $۱/۵\times۱۰^{۴}$ اضافه شد. در گروه اول (HA)، ابتدا به ۵ عدد میکروتیوب استریل مقدار ۵۰۰ میکرولیتر نمونه خون هپارینه عفونی شده با باکتری *اشیرشیاکلی* اضافه شد و DNA موجود در تمام میکروتیوب‌ها، توسط روش فنول-کلروفرم ایزوآمیل الکل استخراج شد. پس از استخراج DNA، به تمام میکروتیوب‌ها مقدار ۵۰۰ میکرولیتر مایع رویی حاصل از محیط‌کشت باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* اضافه شد و هر ۵ عدد میکروتیوب به صورت اختصاصی مطابق ساعات ۲، ۴، ۶، ۸ و۲۴، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. سپس هر میکروتیوب پس از گذشت ساعات در نظر گرفته شده، از گرمخانه خارج و به فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد انتقال داده شد (۶، ۱۸)، اما در طی گروه دوم مطابق مقادیر ذکر شده در گروه اول، نمونه خون هپارینه عفونی شده با باکتری *اشیرشیاکلی* با غلظت باکتریایی CFU $۱/۵\times۱۰^{۴}$ تهیه شد. سپس به هر ۵ عدد میکروتیوب استریل مقدار ۵۰۰ میکرولیتر خون حاوی هپارین آلوده به باکتری *اشیرشیاکلی* و ۵۰۰ میکرولیتر مایع رویی محیط‌کشت باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* اضافه شد و تمام میکروتیوب‌ها مطابق ساعات در نظرگرفته شده (۲، ۴، ۶، ۸ و۲۴)، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. پس از گذشت مدت زمان در نظر گرفته شده جهت گرمخانه‌گذاری، نمونه‌ها از گرمخانه خارج و مورد استخراج DNA توسط روش فنول-کلروفرم ایزوآمیل الکل قرار گرفتند. در ادامه مطالعه غلظت DNA به دست آمده از نمونه‌های هر دو گروه (HA) و (HB)، توسط دستگاه نانودرآپ در جذب ۲۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. سپس تمام نمونه‌های حاصل از این

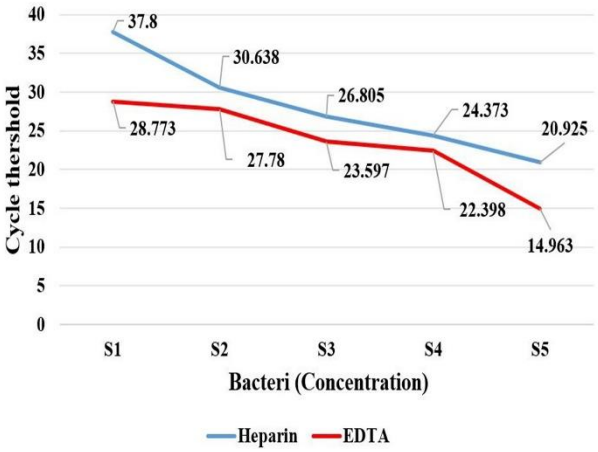
مرحله از مطالعه با در نظر گرفتن ۱ گروه کنترل (DNA استخراج شده باکتری *اشیرشیاکلی* از خون توسط روش جوشاندن) (۲۴)، ۲ گروه کنترل مثبت (DNA استخراج شده باکتری *اشیرشیاکلی* از سرم فیزیولوژی توسط روش فنول-کلروفرم) و ۱ گروه کنترل منفی (DNA استخراج شده باکتری *اشیرشیاکلی* از خون حاوی ضد انعقاد هپارین توسط روش فنول-کلروفرم)، مطابق روش و مقادیر ذکر شده در بخش تعیین کمیت DNA و آزمون Real-TimePCR، مورد آزمون Real-TimePCR قرار گرفتند (۶، ۲۱).

در راستای نتایج حاصل از آزمون Real-TimePCR گروه HB (تصویر ۱)، مطالعه با در نظر گرفتن مدت زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، نمونه‌های تهیه شده مطابق با روش گروه HB (افزودن مایع رویی حاصل از محیط‌کشت باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* به نمونه خون حاوی هپارین آلوده به باکتری *اشیرشیاکلی* قبل از استخراج DNA) گسترش یافت. هر دو نمونه HB (۴۸ و ۷۲ ساعت)، پس از استخراج DNA و آنالیز غلظت DNA توسط دستگاه نانودرآپ در جذب ۲۶۰ نانومتر، با در نظر گرفتن ۱ گروه تکرار و ۲ گروه کنترل مثبت و منفی، مورد آزمون Real-TimePCR قرار گرفتند.

تعیین کمیت DNA و آزمون Real-TimePCR: غلظت DNA موجود در نمونه‌ها پس از استخراج، به وسیله دستگاه نانودرآپ در نسبت جذب ۲۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. سپس آزمون Real-TimePCR جهت تشخیص و تقویت ژنوم انجام شد. به طورکلی آزمون Real-TimePCR جهت تقویت ژنوم در حجم کل ۲۰ میکرولیتر مخلوط تقویتی، شامل ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس (Sina SYBR Blue, HS-qPCR Mix, 2x SINACLON)، ۱ میکرولیتر آغازگر رو به جلو با توالی '5'-TCGTCAGCTCGTGTYGTGA-3'، ۱ میکرولیتر آغازگر معکوس به توالی '5'-CGTAAGGGCCATGATG-3'، ۴ میکرولیتر DNA ژنومی به عنوان الگو و ۴ میکرولیتر آب انجام شد. شرایط حرارتی در ترموسایکلر Rotor Gene Q (QIAGEN Hilden، آلمان) به شرح انجام شد: دناتوره شدن اولیه طی ۱ چرخه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت زمان ۵ دقیقه، به دنبال آن طی ۴۰ چرخه، دناتوره شدن نهایی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت زمان ۱۵ ثانیه، اتصال در دمای ۶۱/۵ درجه سانتی‌گراد به مدت زمان ۲۵ ثانیه و گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت زمان ۴۰ ثانیه ادامه داده شد. سپس گسترش نهایی طی ۱ چرخه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت زمان ۸ ثانیه تمدید شد (۶، ۲۱).

نتایج

محدوده غلظت DNA استخراج شده از نمونه‌های استاندارد (سرم فیزیولوژی، خون EDTAدار و هپارینه)، به ترتیب ۸/۴۱-۱۸/۵۱، ۱۴/۹۶- ۲۸/۷۷ و ۲۰/۹۲- ۷۴/۱۷۵ میکروگرم بر میلی لیتر بود. در راستا بررسی نتایج حاصل از نمونه‌های استاندارد دیده شد که غلظت DNA باکتری موجود در نمونه‌ها، طی رقت سازی کاهش یافت. همچنین مقایسه غلظت DNA به دست آمده از رقت‌های 10^{-4} تا 10^{-1} تهیه شده، بیانگر این بود که غلظت DNA استخراج شده از خون هپارینه بیشتر از خون EDTAدار بود (تصویر ۱).

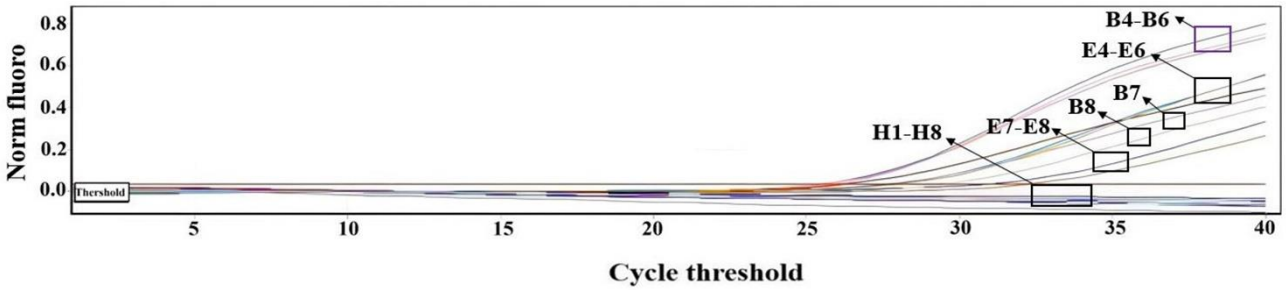


تصویر ۱. مقایسه غلظت DNA استخراج شده از نمونه‌های خون حاوی EDTA و هپارین در رقت‌های (Serial Dilution) 10^{-4} (S1) تا 10^{-1} (S5).

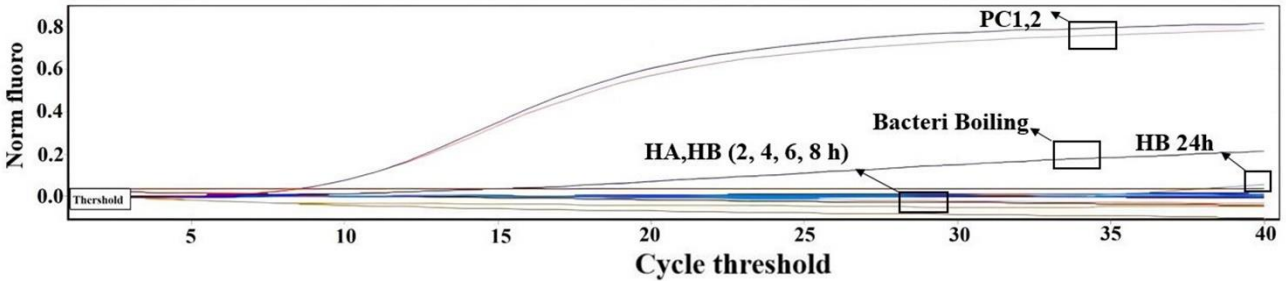
همچنین غلظت DNA به دست آمده از دو گروه HA وHB در ساعات ۲، ۴، ۶، ۸ و۲۴، به ترتیب ۱۸/۵۲-۲۶/۹۷ و ۴۱/۷۴-۶۴/۲۷ میگروگرم بر میلی‌لیتر و از گروه HB با ساعات ۴۸ و۷۲، به ترتیب ۶۶/۶۱ و ۷۹/۱۹ میکروگرم بر میلی لیتر بود.

در مطالعه حاضر، نتایج حاصل از آزمون Real-TimePCR به صورت نمودار چرخه آستانه (Cycle thershold:CT) که بیانگر چرخه‌ای از واکنش بود که در آن نشر فلورسنت، به علت تکثیر ژنوم صورت گرفت و نمودار استاندارد (Standard curve) که بیانگر غلظت DNA باکتری تکثیر شده، در چرخه‌های آستانه مختلف بود، مورد بررسی قرار گرفت. در نتیجه تجزیه و تحلیل نمودار CT حاصل از مرحله اول آزمایش (سرم فیزیولوژی، خون EDTAدار و خون هپارینه)، مشاهده شد که DNA موجود در نمونه سرم فیزیولوژی و خون حاوی EDTA طی فرایند Real-TimePCR تکثیر یافت، اما در نمونه خون هپارینه که غلظت DNA بیشتری را نسبت به نمونه خون EDTAدار شامل می‌شد (تصویر ۱)، هیچ گونه تکثیر DNAای صورت نگرفت (تصویر ۲).

در نتیجه تجزیه و تحلیل نتایج حاصل از آزمون Real-TimePCR نمونه‌های مرحله دوم آزمایش (HA وHB)، مشاهده شد که در صورت تیمار و گرمخانه‌گذاری، متابولیت حاصل از محیط‌کشت باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* به همراه DNA استخراج شده از خون هپارینه به مدت زمان‌های ۲، ۴، ۶، ۸ و۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، هیچ‌گونه حذف و برکناری در جهت رفع اثر مهارکننده هپارین طی آزمون تقویت مولکولی Real-TimePCR صورت نگرفت، اما در صورت تیمار و گرمخانه‌گذاری نمونه خون هپارینه به همراه متابولیت حاصل از باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* قبل از استخراج DNA، به مدت زمان ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، حذف و برکناری اثر مهاری هپارین بر تقویت DNA طی آزمون Real-TimePCR مشاهده شد (تصویر ۳).



تصویر ۲. منحنی تکثیر ژنوم باکتری *اشیرشیاکلی* براساس چرخه آستانه سه گروه سرم فیزیولوژی (B)، خون حاوی EDTA(E) و هپارین (H). محور افقی بیانگر تعداد چرخه‌ها و محور عمودی بیانگر تغییر فلورسانس دریافتی است.

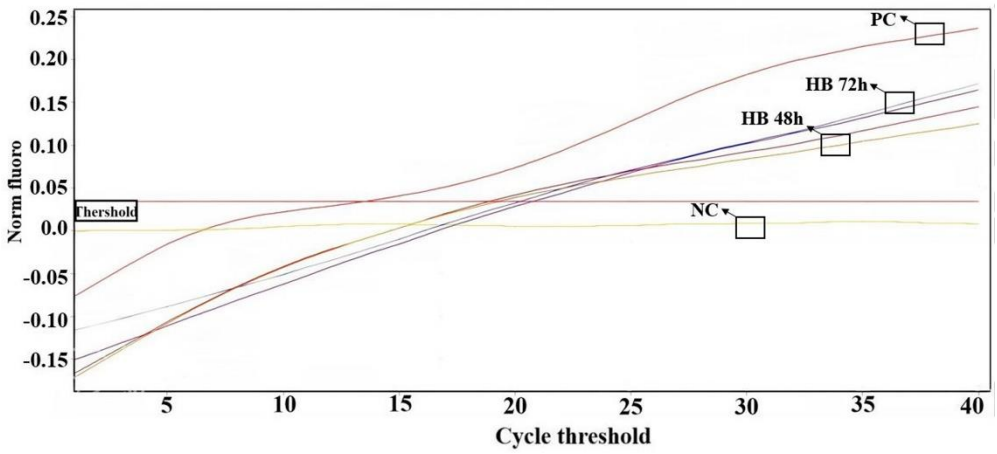


تصویر ۳. منحنی تکثیر ژنوم باکتری *اشیرشیاکلی* براساس CT در دو گروه Heparin A (HA) و Heparin B (HB) با مدت زمان‌های ۲، ۴، ۶، ۸ و۲۴ ساعت و نمونه کنترل مثبت (PC). محور افقی بیانگر تعداد چرخه‌ها و محور عمودی بیانگر تغییر فلورسانس دریافتی است.

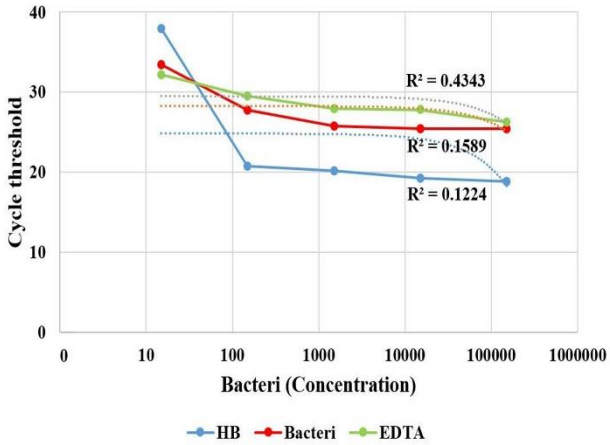
در نتیجه تجزیه و تحلیل نمونه‌های مرحله دوم آزمایش، دو گروه HB (۴۸ و۷۲ ساعت) مشاهده شد که تیمار نمونه‌های خون حاوی هپارین به همراه عصاره محیط‌کشت باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* به مدت زمان‌های ۴۸ و۷۲ ساعت، تأثیر بسزایی را در جهت حذف اثر مهاری هپارین و در نهایت تکثیر ژنوم طی آزمون Real-TimePCR سبب شد (تصویر ۴).

همچنین در نهایت، در جهت ارزیابی و مقایسه تعداد باکتری تکثیر شده در هر نمونه، در CT اختصاصی طی آزمون Real-TimePCR، نمودار منحنی استاندارد برای دو گروه، استاندارد (سرم فیزیولوژی و EDTA) و درمان HB با مدت زمان‌های ۲۴، ۴۸ و۷۲ با مقیاس تعداد باکتری تکثیر شده در نمونه استاندار سرم فیزیولوژی آلوده به باکتری *اشیرشیاکلی* (مرحله اول آزمایش)، ترسیم شد. در نتیجه آن مشاهده شد که عصاره باکتریایی *سودوموناس آئروژینوزا* سبب رفع اثر مهارکنندگی هپارین و در پی آن تکثیر ژنوم باکتری *اشیرشیاکلی* در چرخه‌های آستانه پایین‌تر از دو نمونه استاندارد دیگر شد (تصویر ۵).

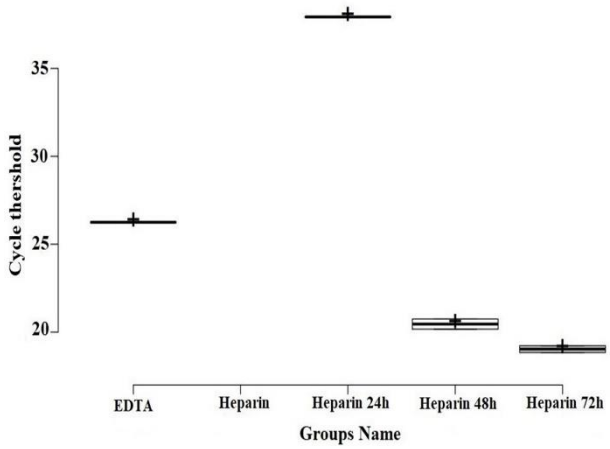
آنالیز نتایج Real-TimePCR توسط نرم افزار SPSS: در مطالعه حاضر نتایج CT حاصل از آزمون Real-TimePCR توسط نرم افزار SPSS با مقیاس *P*value (*P*<۰/۰۵) مورد آنالیز قرار گرفت. مقایسه آماری نتایج حاصل از گروه HB در ساعات مختلف (۲۴، ۴۸ و۷۲) با یکدیگر و با نمونه خون حاوی EDTA با غلظت باکتریایی CFU ۱/۵×۱۰^۴، نشان داد که تفاوت معنی‌داری (*P*=۰/۰۰۰۱۳۸) بین نتایج حاصل از دو گروه HB با مدت زمان‌های گرمخانه‌گذاری، ۲۴ و ۴۸ ساعت وجود دارد. همچنین در طی مقایسه آماری نتایج حاصل از گروه HB با مدت زمان‌های ۲۴ و ۷۲ ساعت و ۴۸ و ۷۲ ساعت، تفاوت معنی‌داری به ترتیب (*P*=۰/۰۰۰۰۵۳) و (*P*=۰/۰۲۷۶) مشاهده شد. همچنین مقایسه آماری نتایج CT حاصل از گروه HB در ساعات مختلف (۲۴، ۴۸ و۷۲) با نمونه EDTA نیز صورت گرفت و مشاهده شد که بین نمونه خون حاوی EDTA و نمونه گروه HB با مدت زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، به ترتیب ذیل تفاوت معنی‌داری (*P*=۰/۰۰۰۰۱)، (*P*=۰/۰۰۱۲۵) و (*P*=۰/۰۰۰۳۶۵) وجود داشت. در پایان تجزیه و تحلیل نتایج حاصل از هر دو روش جهت حذف اثر مهارکنندگی هپارین طی تکثیر ژنوم توسط آزمون Real-TimePCR، مشخص نمود که مدت زمان حداقل ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری نمونه‌ها قبل از استخراج DNA، به همراه متابولیت باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* سبب رفع اثر مهارکننده هپارین شد و هرچه این مدت زمان بیشتر باشد، تکثیر بیشتر در CT پایین‌تر، صورت می‌گیرد. همچنین مقایسه آماری نتایج گروه HB با ساعات ۴۸ و ۷۲ با نمونه خون EDTAدار بیانگر تأثیر قابل ملاحظه عصاره محیط‌کشت *سودوموناس آئروژینوزا* بر رفع اثر مهاری هپارین طی تکثیر ژنوم بود که این تأثیر نه تنها سبب رفع اثر مهاری هپارین طی تکثیر ژنوم شد، بلکه تکثیر DNA را در CT پایین‌تر از نمونه‌های EDTAدار سبب شد (تصویر ۶).



تصویر ۴. منحنی تکثیر ژنوم باکتری *اشیرشیاکلی* براساس CT، گروه HB با مدت زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت و نمونه کنترل مثبت (PC). محور افقی بیانگر تعداد چرخه‌ها و محور عمودی بیانگ تغییر فلوسانس دریافتی است.



تصویر ۵. نمودار منحنی استاندارد، نمونه‌های استاندارد به همراه گروه درمان HB با مدت زمان‌های ۲۴، ۴۸ و۷۲ طی آزمون Real-TimePCR. محور افقی بیانگر غلظت ژنوم باکتری و محور عمودی بیانگر مقادیر چرخه آستانه است.



تصویر ۶. نمودار گرافیکی مقایسه آماری نتایج حاصل از سه گروه Heparin B در ساعات ۲۴، ۴۸ و ۷۲ با نمونه خون حاوی EDTA. محور افقی بیانگر نام نمونه‌های مورد آزمایش و محور عمودی بیانگر مقادیر چرخه آستانه است.

بحث

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) نقطه عطفی در تاریخ علوم زیستی و پزشکی می‌باشد و در چند دهه اخیر به یکی از مهم ترین ابزارهای بررسی مولکولی تبدیل شده است. PCR یک تست بسیار سریع و حساس است (۱، ۲). محققین در طی آزمایشات و پژوهش‌های مختلف به معایب این روش مولکولی پی بردند که یکی از پر مخاطره‌ترین معایبی که این تکنیک شامل می‌شود، حساس و مستعد مواد بازدارنده بودن آن است که حضور این مواد بازدارنده در طی آزمون مولکولی بر عملکرد و دقت این آزمون اثر می‌گذارد و حتی ممکن است سبب نتایج منفی کاذب شود (۳). در طی بسیاری از آزمایش‌های روتین، استخراج پلاسما و همچنین آزمون‌های مولکولی، در راستای جلوگیری از لخته شدن نمونه‌های خون، بعد از اخذ خون از ضدانعقادهای مختلفی استفاده می‌شود. مهم‌ترین ضد انعقادهایی که در آزمایشگاه‌ها و کلینیک‌های پزشکی و دامپزشکی مورد استفاده قرار می‌گیرند، ضد انعقادهای EDTA، هپارین و سیترات می‌باشند (۲۵).

در مرحله اول از مطالعه حاضر، اثر مهارکنندگی دو ضد انعقاد هپارین و EDTA بر آزمون تقویت مولکولی Real-TimePCR بررسی شد و در نتیجه آن دریافت شد که نمونه حاوی هپارین با توجه به شامل شدن غلظت DNA بیشتر، پس از استخراج توسط روش فنول-کلروفرم ایزوآمیل الکل، نسبت به نمونه حاوی EDTA، اثر مهارکنندگی بیشتری را بر آزمون تقویت مولکولی سبب می‌شود. همچنین مشاهده شد که در طی رقت سازی افزایش غلظت هپارین سبب کاهش غلظت DNA می‌گردد.

Baca و همکاران در سال ۲۰۰۳، شدت اثر مهاری هر سه ماده ضدانعقاد هپارین، سیترات و EDTA را برروی فرایند PCR بررسی کردند و دریافتند که هپارین نسبت به دو ضد انعقاد سیترات و EDTA اثر مهارکنندگی بیشتری را بر فرایند PCR سبب می‌شود (۲۵). همچنین در مطالعه‌ای که توسط Yokota و همکاران در سال ۱۹۹۹ صورت گرفت، اثر مهارکنندگی EDTA و هپارین بر استخراج و تکثیر DNA موجود در نمونه‌ها، طی آزمایش PCR بررسی شد. در نتیجه این مطالعه، مشابه نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر دریافت شد که ضد انعقاد هپارین اثر مهارکنندگی شدیدتری را بر روی استخراج و تکثیر DNA طی آزمون PCR سبب می‌شود. همچنین مشاهده شد که با افزایش میزان غلظت هپارین، میزان DNA استخراج شده و تکثیر شده توسط فرایند PCR، کاهش می‌یابد (۲۳).

با توجه به اثبات اثر مهاری هپارین بر فرایند تقویت مولکولی (PCR) طی مطالعات مختلف و همچنین اهمیت و کاربرد گسترده این مولکول به عنوان ماده ضد انعقاد در حوزه پزشکی و بالینی، محققین زیادی به پژوهش در جهت یافتن روشی مؤثر در زمینه رفع اثر مهارکنندگی هپارین بر فرایند PCR پرداختند. در طی مطالعات مختلفی که صورت گرفت، محققین سه روش فیزیکی، شیمیایی و آنزیمی را جهت رفع اثر مهاری هپارین بر فرایند PCR ارائه کردند. روش آنزیمی به علت شامل شدن مزایای گسترده، روشی مناسب و پربازده در زمینه حذف اثر مهاری تلقی می‌شود. در مطالعه‌ای که توسط Satsangi و همکاران در سال ۱۹۹۴ صورت گرفت، مشاهده شد که آنزیم هپاریناز بر حذف و برکناری اثر مهارکننده هپارین طی آزمون PCR مؤثر است، اما استفاده از این آنزیم‌ها به صورت تجاری معایبی چون هزینه و زمان بالا به هنگام تهیه و دسترسی محدود را شامل می‌شود (۱۸)، در همین راستا مشابه مطالعه حاضر، محققین به مطالعه در زمینه سنتز بیوآنزیم‌های تجزیه‌کننده هپارین از عوامل بیولوژیکی چون بهره‌گیری از باکتری *فلاوباکتریوم هپارینوم* (*Flavbacterium heparinum*)، به جهت تجزیه و هیدرولیز هپارین در مقیاس بزرگ‌تر و پربازده‌تر پرداختند (۲۶).

در مطالعه حاضر عصاره محیط‌کشت باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* به جهت شامل شدن آنزیم هپاریناز، طی دو گروه با دو شرایط قبل و بعد از استخراج DNA توسط روش فنول-کلروفرم ایزوآمیل الکل، به نمونه خون هپارینه اضافه شد و در نتیجه آن مشاهده شد که در صورت تیمار عصاره محیط‌کشت باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* به همراه خون هپارینه قبل از استخراج DNA به مدت زمان حداقل ۲۴ ساعت، رفع اثر مهاری هپارین بر تقویت ژنوم صورت می‌گیرد. همچنین تیمار نمونه خون هپارینه به مدت زمان بیشتر از ۲۴ ساعت، تکثیر باکتریایی بیشتر در CT پایین‌تر را حتی نسبت به نمونه EDTAدار سبب می‌شود. بر همین اساس، این روش ممکن است محققین را قادر سازد، بتوانند بدون نیاز به استفاده از آنزیم هپاریناز تجاری گران‌بها و محدود و استفاده از ضدانعقاد دیگر، از نمونه خون حاوی ضدانعقاد هپارین در راستای تقویت و تشخیص ژنوم استفاده کنند.

در مطالعه که توسط Dzvova و همکاران در سال ۲۰۱۸ انجام شد، مشاهده شد که پروتئین HepP (Heparin protein) موجود در بیوفیلم باکتری *سودوموناس آئروژینوزا*، آنزیم هپاریناز را کد می‌کند و آنزیم هپاریناز کدگذاری شده توسط HepP یک فاکتور حدت بالقوه برای PA14 (*Pseudomonas aeruginosa* 14) است (۱۶). همچنین در مطالعه‌ای Kaya و همکاران درسال ۲۰۲۰، برهمکنش بیوفیلم محیط‌کشت باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* با سلول‌های تک هسته‌ای خون را، در راستا افزایش بیوفیلم باکتریایی، با افزایش تعداد باکتری بیوفیلم‌زا و سایتوکین‌های ضد التهابی ترشح شده در میزبان اثبات کردند (۲۰). بر همین اساس در مطالعه حاضر از عصاره محیط‌کشت باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* بهره‌گیری شد.

در مطالعه‌ای دیگر Alinezhad و همکاران در سال ۲۰۲۲، ابتدا اثر مهارکنندگی دو ماده ضد انعقاد هپارین و EDTA بر آزمون Real-TimePCR را مقایسه کردند. سپس تأثیر سه روش دما، H2O2، اسید آسکوربیک و تیمارهای اسید نیتروژن را در راستای غلبه بر اثر مهارکنندگی هپارین، بر تکثیر DNA توسط آزمون Real-TimePCR طی دو شرایط قبل و بعد از استخراج DNA بررسی کردند. در نتیجه آن دریافتند که مشابه مطالعه حاضر، نمونه خون هپارینه غلظت DNA بیشتری را نسبت به نمونه خون EDTAدار شامل می‌شود، اما با این حال هپارین به طور کامل مانع تکثیر DNA می‌شود. همچنین بهترین روش در میان روش‌های انجام شده جهت برکناری اثر مهاری هپارین به ترتیب تیمار حرارتی در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت قبل از استخراج، تیمار حرارتی در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت بعد از استخراج، تیمار حرارتی در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت قبل از استخراج، استفاده از اسید نیتروز با (PH=۳) و در نهایت تیمار حرارتی در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت بعد از استخراج می‌باشد. همچنین در راستای مقایسه مقادیر چرخه آستانه نمونه خون هپارینه، پس از هر تیمار با نمونه خون EDTAدار، مشخص شد که بهره‌گیری از روش تیمار حرارتی مطابق روش ذکر شده

در جهت رفع اثر مهارکنندگی هپارین، تکثیر ژنوم بیشتر در CT پایین‌تر را سبب می‌شود (۶). در مطالعه حاضر نیز مشابه نتایج به دست آمده از مطالعه مذکور، در صورت تیمار عصاره محیط‌کشت باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* به همراه خون هپارینه قبل از استخراج DNA به مدت زمان حداقل ۲۴ ساعت، رفع اثر مهاری هپارین بر تقویت ژنوم صورت گرفت.

در مطالعه‌ای دیگر Janb و همکاران در سال ۲۰۱۶، به بررسی و مقایسه روش فنول کلروفرم و کیت تجاری جهت استخراج DNA از نمونه مدفوع اسب پرداختند و دریافتند که روش فنول کلروفرم نسبت به روش استفاده از کیت تجاری، جهت استخراج DNA سبب استخراج DNA به میزان بیشتر با مدت زمان و هزینه کمتر شد (۲۷). برهمین اساس در مطالعه حاضر از روش فنول کلروفرم ایزوآمیل الکل جهت استخراج DNA نمونه‌ها استفاده شد.

نتیجه‌گیری نهایی: بررسی نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر، نشان داد که ضد انعقاد هپارین نسبت به EDTA اثر مهارکننده بیشتری را بر آزمون Real-TimePCR سبب شد و مانع تقویت ژنوم گردید. همچنین تیمار و گرمخانه‌گذاری عصاره محیط کشت باکتری *سودوموناس آئروژینوزا*، به همراه خون حاوی هپارین، قبل از استخراج DNA، به مدت زمان حداقل ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، تجزیه و رفع اثر مهارکننده هپارین بر روی آزمون تقویت مولکولی Real-TimePCR را سبب شد و مدت زمان بیشتر از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری، تکثیر باکتریایی بیشتر در CT پایین‌تر را، حتی نسبت به نمونه حاوی ضدانعقاد EDTA سبب گردید. در همین راستا این روش ممکن است محققین را قادر سازد، بتوانند بدون نیاز به استفاده از آنزیم هپاریناز تجاری گران‌بها و محدود و استفاده از ضدانعقاد دیگر، از نمونه خون حاوی ضدانعقاد هپارین در راستای تقویت و تشخیص ژنوم استفاده کنند.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله تشکر و قدردانی خود را از معاونت محترم پژوهش و فناوری دانشگاه سمنان، دانشکده دامپزشکی اعلام می‌دارند.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. Shahi S, Zununi Vahed S, Fathi N, Sharifi S. Polymerase chain reaction (PCR)-based methods: Promising molecular tools in dentistry. Int J Biol Macromol. 2018;1(117):983-992. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.05.085 PMID: 29778881

2. Powledge TM. The polymerase chain reaction. Adv Physiol Educ. 2004;28(1-4):44-50. doi: 10.1152/advan.00002.2004 PMID: 15149959

3. Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, Johne R. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. J Appl Microbiol. 2012;113(5):1014-26. doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x PMID: 22747964

4. Sadeghi H, Ashrafi Tamai Ir, Vajgani M, Gharagozlu F, Zahrai Salehi, T. Isolation and identification of Brucella national bivar tensis using culture, serological and molecular methods in Sanen goats of Alborz province- Iran. J Vet Res. 1401;77(1):2-107. doi: 115.10/jvr.22059.2021.318798.3133

5. Smith CJ, Osborn AM. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. FEMS Microbiol Ecol. 2009;67(1):6-20. doi: 10.1111/j.1574-6941.2008.00629.x PMID: 19120456

6. Alinezhad P, Staji H, Sani RN. Comparison of three methods including temperature, H2O2/ascorbic acid/sonication, and nitrous acid treatments for overcoming the inhibitory effect of heparin on DNA amplification in realtime-PCR. Int J Biol Macromol. 2022;209(Pt A):1298-1306. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.04.113 PMID: 35460751

7. Rossen L, Nørskov P, Holmstrøm K, Rasmussen OF. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. Int J Food Microbiol. 1992;17(1):37-45. doi: 10.1016/0168-1605(92)90017-w PMID: 1476866

8. Rådström P, Knutsson R, Wolffs P, Lövenklev M, Löfström C. Pre-PCR processing: strategies to generate PCR-compatible samples. Mol Biotechnol. 2004;26(2):133-46. doi: 10.1385/MB:26:2:133 PMID: 14764939

9. Oduah EI, Linhardt RJ, Sharfstein ST. Heparin: Past, Present, and Future. Pharmaceuticals (Basel). 2016;9(3):38. doi: 10.3390/ph9030038 PMID: 27384570

10. Qiu M, Huang S, Luo C, Wu Z, Liang B, Huang H, Ci Z, Zhang D, Han L, Lin J. Pharmacological and clinical application of heparin progress: An essential drug for modern medicine. Biomed Pharmacother. 2021;139:111561. doi: 10.1016/j.biopha.2021.111561 PMID: 33848775

11. Garcia DA, Baglin TP, Weitz JI, Samama MM. Parenteral anticoagulants: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. Chest. 2012;141(2 Suppl):e24S-e43S. doi: 10.1378/chest.11-2291 PMID: 22315264

12. Bhushan I, Alabbas A, Sistla JC, Saraswat R, Desai UR, Gupta RB. Heparin depolymerization by immobilized heparinase: A review. Int J Biol Macromol. 2017;99:721-730. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.03.036 PMID: 28300590

13. Conrad HE. Nitrous acid degradation of glycosaminoglycans. Curr Protoc Mol Biol. 2001;Chapter 17:Unit17.22A. doi: 10.1002/0471142727.mb1722as32 PMID: 18265157

14. Shen X, Liu Z, Li J, Wu D, Zhu M, Yan L, Mao G, Ye X, Linhardt RJ, Chen S. Development of low molecular weight heparin by H2O2/ascorbic acid with ultrasonic power and its anti-metastasis property. Int J Biol Macromol. 2019;133:101-109. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.04.019 PMID: 30954594

15. Zhang C, Tang F, Zhang J, Cao J, Li H, Liu C. Uncovering the detailed mode of cleavage of heparinase I toward structurally defined heparin oligosaccharides. Int J Biol Macromol. 2019;141:756-764. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.08.260 PMID: 31479666

16. Dzvova N, Colmer-Hamood JA, Griswold JA, Hamood AN. Isolation and characterization of HepP: a virulence-related Pseudomonas aeruginosa heparinase. BMC Microbiol. 2017;17(1):233. doi: 10.1186/s12866-017-1141-0 PMID: 29246112

17. Ma X, Zhang L, Wang W, Zou M, Ding T, Ye X, et al. Synergistic effect and mechanisms of combining ultrasound and pectinase on pectin hydrolysis. Food Bioprocess Technol. 2016;9(7):1249–57. doi: 10.1007/s11947-016-1689-y

18. Satsangi J, Jewell DP, Welsh K, Bunce M, Bell JI. Effect of heparin on polymerase chain reaction. Lancet. 1994;343(8911):1509-10. doi: 10.1016/s0140-6736(94)92622-0 PMID: 7911214

19. Linhardt RJ, Turnbull JE, Wang HM, Loganathan D, Gallagher JT. Examination of the substrate specificity of heparin and heparan sulfate lyases. Biochemistry. 1990;29(10):2611-7. doi: 10.1021/bi00462a026 PMID: 2334685

20. Kaya E, Grassi L, Benedetti A, Maisetta G, Pileggi C, Di Luca M, Batoni G, Esin S. In vitro Interaction of Pseudomonas aeruginosa Biofilms With Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. Front Cell Infect Microbiol. 2020;10:187. doi: 10.3389/fcimb.2020.00187 PMID: 32432053

21. Koshy L, Anju AL, Harikrishnan S, Kutty VR, Jissa VT, Kurikesu I, Jayachandran P, Jayakumaran Nair A, Gangaprasad A, Nair GM, Sudhakaran PR. Evaluating genomic DNA extraction methods from human whole blood using endpoint and real-time PCR assays. Mol Biol Rep. 2017;44(1):97-108. doi: 10.1007/s11033-016-4085-9 PMID: 27686559

22. Qin Z, Yang L, Qu D, Molin S, Tolker-Nielsen T. Pseudomonas aeruginosa extracellular products inhibit staphylococcal growth, and disrupt established biofilms produced by Staphylococcus epidermidis. Microbiology (Reading). 2009;155(Pt 7):2148-2156. doi: 10.1099/mic.0.028001-0 PMID: 19389780

23. Yokota M, Tatsumi N, Nathalang O, Yamada T, Tsuda I. Effects of heparin on polymerase chain reaction for blood white cells. J Clin Lab Anal. 1999;13(3):133-40. doi: 10.1002/(sici)1098-2825(1999)13:3<133::aid-jcla8>3.0.co;2-0 PMID: 10323479

24. Queipo-Ortuño MI, De Dios Colmenero J, Macias M, Bravo MJ, Morata P. Preparation of bacterial DNA template by boiling and effect of immunoglobulin G as an inhibitor in real-time PCR for serum samples from patients with brucellosis. Clin Vaccine Immunol. 2008;15(2):293-6. doi: 10.1128/CVI.00270-07 PMID: 18077622

25. Lam NY, Rainer TH, Chiu RW, Lo YM. EDTA is a better anticoagulant than heparin or citrate for delayed blood processing for plasma DNA analysis. Clin Chem. 2004;50(1):256-7. doi: 10.1373/clinchem.2003.026013 PMID: 14709670

26. Korn ED, Payza AN. The Degradation of heparin by bacterial enzymes. J Biol Chem. 1956;223(2):859-64. doi: 10.1016/S0021-9258(18)65083-5 PMID: 13385232

27. Janabi AHD, Kerkhof LJ, McGuinness LR, Biddle AS, McKeever KH. Comparison of a modified phenol/chloroform and commercial-kit methods for extracting DNA from horse fecal material. J Microbiol Methods. 2016;129:14-19. doi: 10.1016/j.mimet.2016.07.019 PMID: 27460337