Archive of SID

مقایسه روش PCR و روش باکتریولوژیک در تشخیص منتژیتهای باکتریال

حسین گودرزی .Ph.D☆، بهرام کاظمی .Ph.D★، کامبیز یارایی .Ph.D☆، معصومه نویدی .M.Sc☆
مژگان بنده‌پور .M.Sc★

☆ دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکدهٔ پزشکی، گروه میکروبیولوژی

★ دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی

♦آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی ۲۷۱۹-۱۹۳۹۵، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی دانشکدهٔ پزشکی، گروه میکروبیولوژی

چکیده

* **هدف:** منتژیت از جمله بیماریهای مرگباری است که تشخیص سریع آن از اولویتهای ضروری در امور بالینی است. روشهای معمول برای تشخیص منتژیت (استفاده از کشتهای باکتریولوژیک و کشتهای سلولی، روشهای بیوشیمیایی و شمارش سلول درمایع مغزی - نخاعی) از حساسیت بالایی برخوردار نیست. بنابراین یافتن یک روش سریع از ضرورتهای امروز است.

* **مواد و روشها:** DNA به روش جوشانیدن از مایع مغزی نخاعی استخراج گردید و با پرایمرهایی که قسمتی از توالی ژن 16s rRNA را آمپلی فای می‌کنند PCR (Polymerase Chain Reaction) انجام گرفت. از هر یک از نمونه‌ها کشت باکتریال انجام شد.

* **یافته‌ها:** از کل ۵۱ نمونه مورد بررسی، ۲۳/۵ درصد بر مبنای کشت، مشکوک به منتژیت باکتریایی بودند در صورتی که با استفاده از PCR، ۴۱/۱ درصد نمونه‌ها مثبت گزارش شدند. پس می‌توان گفت که تقریباً نیمی از موارد مثبت باکتریایی را بدون انجام PCR از دست می‌دهیم. باکمک PCR ما توانستیم در حدود ۹۵/۲۳ درصد موارد مثبت و حدود ۹۶/۶۶ درصد موارد منفی را با قطعیت گزارش نماییم.

* **نتیجه‌گیری:** با توجه به نتایج به دست آمده، توالی ژن PCR در حال حاضر دقیق‌ترین و حساس‌ترین روش جهت تشخیص میکروارگانیزمها در نمونه‌های استریل بدن است. از آنجایی که توالی ژن 16s rRNA در طول تکامل تغییر محدودی داشته و در همه پروکاریوتها توالی یکسانی دارد، هدف مناسبی برای PCR است. کوتاه بودن زمان تشخیص (۴-۳ ساعت) از مزیتهای این روش است.

گل واژگان: PCR، 16s rRNA، منتژیت باکتریال، پونکسیون لومبار

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

تشخیص سریع منتژیت باکتریایی از اهمیت زیادی برخوردار است. در حال حاضر تشخیص قطعی بر مبنای جداسازی باکتری عامل مولد منتژیت از مایع نخاع یا خون است که انجام کشت حداقل ۲۴ ساعت زمان نیاز دارد. مشکل دیگر این است که بعضی از باکتریها به مواد خاصی برای رشد نیاز داشته و در شرایط کشت معمولی رشد نمی‌کنند. چنانچه بیمار تحت درمان با آنتی‌بیوتیک قرار داشته باشد نتیجه کشت منفی خواهد بود.

شرایط نمونه‌برداری، حمل و سایر عوامل نیز در رشد باکتریها مؤثرند. از طرف دیگر کشت سلولی برای تعیین هویت ویروسهای مولد منتژیت در نمونه‌ها پرهزینه و پردرد سر بوده و به زمان زیادی نیاز دارد. لذا این مشکلات نیاز به روشهای تشخیصی حساس‌تر را محسوس می‌نماید. تحقیقات اخیر با استفاده از روش PCR نشان داده است که در بسیاری از موارد باکتری در نمونه وجود داشته اما نتایج کشت منفی بوده است (۱، ۲).تشخیص و درمان منتژیتهای باکتریال بسیار اهمیت دارد و بسته به نوع میکروارگانیزم مولد منتژیت، این بیماری بین ۵۰-۵ درصد مرگ و میر به همراه خواهد داشت. همچنین عوارضی چون عقب ماندگی ذهنی، کری، نقایص اعصاب مغزی تقریباً در نیمی از نوزادان و کودکان مبتلا به منتژیت، دیده می‌شود (۳). آزمایشات بیوشیمیایی، شمارش سلول و بررسی افتراقی سلولهای مایع نخاع نیز در تشخیص منتژیتهای باکتریال و ویرال کاربرد دارد ولی هیچکدام حساسیت و اطمینان ۱۰۰ درصد را نداشته و در تشخیص افتراقی ناتوان هستند. امروزه روشهای مولکولی در تعیین هویت میکروارگانیزمها در نمونه‌های کلینیکی به طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد (۴، ۵). با تکثیر DNA میکروارگانیزم و با استفاده از پرایمر اختصاصی آن می‌توان به تشخیص عامل مولد بیماری در نمونه دست یافت (۶).

باکتریها دارای سکانس ژنی 16s RNA هستند این توالی در موجودات دیگر وجود ندارد لذا از آن در تکنیک PCR بهره می‌گیریم. این روش برای تشخیص باکتری در نمونه مجهول مانند خون و یا مایع نخاع بسیار حساس و اختصاصی است. یکی از نکاتی که باعث اهمیت تشخیص توالی 16s RNA در نمونه‌های مشکوک به عفونت باکتریایی می‌شود، این است که این مولکول در طول تکامل نسبت به توالیهای دیگر r RNA (5s و23s) تغییر محدودی پیدا کرده و تقریباً در تمامی پروکاریوتهای مطالعه شده، ساختمان یکسانی دارد (۷، ۸).

مواد و روشها

این تحقیق در بیمارستان مفید و بر روی ۵۱ کودک زیر ۶ سال مبتلا به منتژیت از تیر ماه تا اسفند ماه ۷۹ با نمونه برداری مستمر انجام گرفته است. با توجه به علایم بالینی، کودکان مبتلا به منتژیت مشخص و توسط پزشک متخصص اطفال نمونه LP[1] از آنها گرفته شد و جهت بررسیهای باکتریولوژیک، بیوشیمی، شمارش سلولی و PCR در لوله آزمایش استریل ریخته شد و به آزمایشگاه ارسال گردید. مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه LP با سر سمپلر استریل کنار شعله به یک میکروتیوب منتقل گردید و جهت انجام PCR در منهای ۲۰ درجه نگهداری شد. بقیه مایع نخاع بر روی محیطهای باکتریولوژیک ائوزین متیلن بلو، بلادآگار و شکلات آگار کشت داده شد. رنگ‌آمیزی گرم، شمارش سلول و تعیین نوع سلولها با استفاده از لام نئوبار، بررسی پروتئین و گلوکز نیز بر روی مایع نخاع انجام شد.

DNA با روش جوشاندن استخراج گردید. برای انجام PCR از پرایمرهای RDR80 و DG74 که قسمتی از توالی ژن 16sr RNA باکتریها را آمپلی فای می‌کنند استفاده شد.

DG74: AGGAGGTATCCAACCGCA

ROR80: AACTGGAGGAAGGTGGGGAG

PCR با شرایط زیر انجام گرفت:

DNA	۰/۱-۱mg
$MgCl_2$	۱/۵mM
dNTP	۰/۲mM
Primer	۲۰picomol
Taq DNA poly	۱/۵unit
10x PCR Buffer	۵µl

با آب مقطر حجم واکنش به ۵۰ میکرولیتر رسید و با ترموسایکلر اپندرف واکنش آمپلی فیکاسیون به صورت زیر انجام شد:

مرحله دناتوراسیون در ۹۴° به مدت ۳۰ ثانیه

مرحله آنیلینگ (الحاق) در ۶۰° به مدت ۳۰ ثانیه

مرحله اکستنشن (سنتز) در ۷۲° به مدت ۳۰ ثانیه

این مراحل ۳۰ دفعه تکرار شدند و قبل از این مراحل، دناتوراسیون اولیه به مدت ۵ دقیقه و نهایتاً یک مرحله پست اکستنشن به مدت ۵ دقیقه برای کامل شدن پلیمریزاسیون انجام گرفت. بعد از اتمام PCR، مقدار ۱۵ میکرولیتر از محصول PCR را با ۳ میکرولیتر از بافر لودینگ مخلوط و روی ژل آگارز ۲ درصد حاوی اتیدیوم بروماید و بافر 1XTBE (تریس، اسیدبوریک، EDTA) الکتروفوز شد. باید DNA در زیر دستگاه ترانس ایلومیناتور UV به طول موج ۲۶۰ نانومتر مشاهده شد.

* تایید محصول PCR

به منظور تایید محصول PCR از آنزیمهای برش دهنده DNA استفاده شد. آنزیمهای TaqI و RsaI هرکدام روی ترادف ژن مذکور در باکتری E.coil دارای یک جایگاه می‌باشند (ژن با شماره شناسایی AF527827 از بانک ژن که با نرم‌افزار DNAsis تجزیه و تحلیل شد) محصول PCR توسط این دو آنزیم برش داده شد.

یافته‌ها

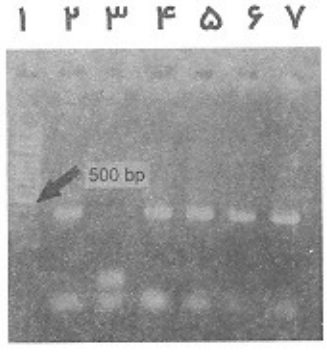
بر طبق این تحقیق ۴۴/۷ درصد بیماران مشکوک به منتژیت عفونی

1. Lumbar Puncture

www.SID.ir

Archive of SID

بودند که از آنها ۳۴/۲ درصد مشکوک به منتژیت باکتریال و ۱۰/۵ درصد مشکوک به منتژیت ویرال بودند. از ۵۱ نمونه مورد بررسی، ۲۳/۵ درصد بر اساس کشتهای باکتریایی مشکوک به منتژیت باکتریایی بودند. در صورتی که با استفاده از PCR ۴۱/۱ درصد نمونه‌ها مثبت گزارش شدند. تست PCR روی ۵۱ نمونه مایع نخاع و در سه گروه مورد آزمایش بررسی گردید (شکل ۱).



شکل ۱: ارزش تشخیص تست

Positive predictive value= 95.23%

Negative predictive Value= 96.66%

Efficacy of test= 96%

در گروه اول از ۹ مورد با کشت منفی و شمارش سلولی مثبت، ۸ مورد PCR مثبت گزارش شد (۸۸/۸ درصد). گروه دوم از ۱۲ مورد کشت مثبت هر ۱۲ مورد PCR مثبت داشتند (۱۰۰ درصد). در گروه سوم از ۸ مورد مشکوک به منتژیت ویرال یک مورد با PCR مثبت گزارش و در گروه چهارم از ۲۲ مورد منفی هیچ مورد مثبتی گزارش نشد. براساس مقایسه نتایج کشت و PCR حساسیت و ویژگی PCR در تشخیص باکتری در نمونه مایع نخاع، ۹۵/۲۴ درصد و ۹۶/۶ درصد می‌باشد.

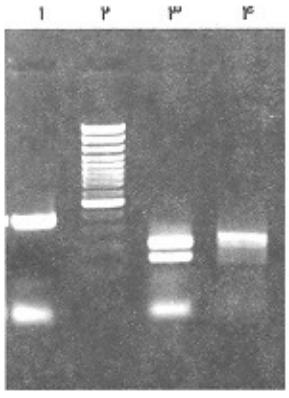
شکل ۲ نمایانگر برش آنزیمی می‌باشد و تأیید کننده وجود جایگاههای مذکور روی ژن است. ستون ۱ محصول PCR قبل از برش آنزیمی، ستون شماره ۲ مارکر برش 100bq DNA ladderستون شماره ۳ محصول PCRکه با آنزیم TaqI برش داده شده است و ستون شماره ۴ محصول PCRکه با آنزیم RsaI، برش داده شده است. این پدیده مبین این است که محصول PCR مربوط به ژن مذکور است.

جدول ۱: نتایج حاصل از کشت و شمارش سلولی و علائم منتژیت کودکان مبتلا به منتژیت

روش تشخیص / تعداد	درصد	شمارش سلولی Lp	کشت	علائم منتژیت
۹	۱۰/۷	N>L	منفی	+
۱۲	N>L۲۳/۵	منتگوکک، پاوموکک، هموفیلوس انفلوانزا	منفی	+
۸	L>N۱۰/۵	منفی	منفی	+
۲۲	۰۵۵/۲	منفی	منفی	+
۵۱	۱۰۰	N: Neutrophil, L:Lymphocyte		

جدول ۲: توزیع فراوانی کشت مثبت در کودکان مبتلا به منتژیت

فراوانی کشت	تعداد	درصد
مثبت	۱۲	۲۳/۵
منفی	۳۹	۷۶/۵
جمع	۵۱	۱۰۰



شکل ۲: ۱: محصول PCR، ۲: مارکر 100bp DNA Ladder، ۳: محصول PCR برش داده شده با TaqI، ۴: محصول برش داده شده با RsaI

جدول ۳: توزیع فراوانی PCR مثبت مایع نخاع کودکان مبتلا به منتژیت

فراوانی PCR	تعداد	درصد
مثبت	۲۱	۴۱/۱
منفی	۳۰	۵۸/۹
جمع	۵۱	۱۰۰

بحث

با توجه به اینکه توالی 16s rRNA باکتریها در طول تکامل تغییر محدودی داشته و در همه پروکاریوتها توالی یکسانی دارد، هدف مناسبی برای PCR می‌باشد. در این تحقیق بر اساس شمارش سلولی و تستهای بیوشیمیایی، ۸ مورد منتژیت ویرال تشخیص داده شد که از این تعداد یک مورد با روش PCR منتژیت باکتریال تشخیص داده شد. می‌توان گفت که باکتریهایی مانند بورلیا، تریپونماپالیدوم و منتگوانسفالیت آمیبی دارای چنین الگوی بالینی هستند و در آنها میزان شمارش لنفوسیت در Lp بالا می‌رود. مشابه این تحقیق در سالهای گذشته نیز توسط محققین مختلف انجام شده است. در سال ۱۹۹۴، Greisen و همکاران ژن 16s rRNA را به عنوان سکانس عمومی در گونه‌های باکتریال معرفی کردند. آنها توانستند با این روش در حدود ۱۰۲ گونه باکتری را با استفاده از سکانس ژنی 16s rRNA شناسایی نمایند (۹). در سال ۱۹۹۵، New comb و همکاران با استفاده از PCR به تعیین هویت DNA منتگوکک در ۸۰ نمونه خون بیماران مبتلا به عفونت منتگوکک پرداختند. میزان حساسیت حتی با وجود آنتی بیوتیک درمانی قبل از نمونه‌گیری ۱۰۰ درصد بود (۱۰). در سال ۱۹۹۷، Y.Tang و همکاران به بررسی روشهای مختلف مولکولی در تشخیص بیماریهای عفونی پرداختند و PCR به عنوان استاندارد طلایی معرفی شد (۹). در سال ۱۹۹۸ Dagan و همکاران مطالعه‌ای آینده نگر را

www.SID.ir

Archive of SID

جهت تعیین DNA پنوموکک در سرم اطفال انجام دادند. کشت خون فقط در ۳۰-۲۰ درصد بزرگسالان و کمتر از ۱۰ درصد اطفال مبتلا به عفونت پنوموککی مثبت شد. در این تحقیق PCR سرم جهت تشخیص پنوموکک حساس حتی در حاملین نازوفارنکسی معرفی گردید (۱). در سال ۱۹۹۹ Darid و همکاران با توجه به نقایص موجود در روشهای تشخیص بیماریهای عفونی (مثلاً کشت) PCR به عنوان یک روش دقیق در تشخیص و تعیین هویت میکروارگانیزمها (خصوصاً با استفاده از مکانس ژنی 16s rRNA)، برای جستجوی باکتری در نمونه‌های استریل بدن مانند خون و مایع نخاع معرفی شد. میزان حساسیت روش ۹۷ درصد تخمین زده شد. در این تحقیق میزان حساسیت ۹۶ درصد به دست آمد (۱۲).

با توجه به اشکالات کشت می‌توان گفت که PCR روش استاندارد طلایی در تشخیص منژیت باکتریایی محسوب می‌شود (۱۳).

References

1. Dagan R: Prospective to Determine Clinical Rlevance of Detection of Pneumococal DNA in Sera of childern by PCR. J Clin Miorobiol 1998; 24: 669-673
2. Fersirchs D: improved Amplification of Microbial DNA from Blood Cultures by Removal of the PCR inhibitor sodium polynethole sulfonates. J Clin Microbiol 1998; 25: 2810-2815
۳. دکتر امتیازی گیتی: مبانی زیست‌شناسی مولکولی و مهندسی ژنتیک، ۱۳۷۵
4. Snyder L, Champress W: Molecular Genetics of Bacteria. 1999, pp 51-52
5. Innis MA: PCR protocol, A Guide to methods and Applications Academic press, 1998
6. Stein, Jay H: Internal Medicine, 3ed. Little, Broun and company (inc), 1998, pp 1281-1291
7. Harrison S: Principal of internal medicine, 14ed. Vol 2 Mc Grow- Hill company, 1998, pp2419-2426
8. Wiffiam J, Hauster Jr: Max Sussman, Microbiologyand Microbial infections, 9ed. 1998
9. Greisen K: PCR primers & probes for the 165 rRNA Gene of most species of pathogenic Bacteria inculding Bacteria found in CSF. J. Clin Microbiol 1994; 28-34
10. New comb Jane: PCR of peripheral Blood for Diagnosis of meningococcal Disease. J Clin Microbiol 1995; 18: 1637-1640
11. Tang Yi - we: Molecular Diagnosis of Infectious Diseases. Clin Chem 1997: 43: 2021-2038
12. Fredrichs Darid N: Application of Polymerase chain Reaction to the Diagnosis of infectious Disease. Clin Infect Dis 1999; 29: 475-486
13. Steve R: Aseptic meningitis & Encephalitis. The Role of PCR in the Diganostic Laboratory. J Clin Microbiol 1997; 21: 591-698

www.SID.ir