Diagnosis of Bacterial Endophthalmitis by Nested- PCR in Comparison with Routine Microbiological Culture

Maleki AR, MD; Naserpoor Farivar T, PhD; Tavallali A, MD

Purpose: To ascertain whether the use of nested-PCR (nested polymerase chain reaction) technique leads to more rapid and accurate diagnosis of bacterial endophthalmitis.

Methods: The aqueous humor and vitreous samples of 24 eyes of 24 patients with bacterial endophthalmitis were evaluated by microscopy, diagnostic aerobic culture, and Nested- PCR to detect the infectious agent.

Results: Aerobic cultures of the aqueous humor and the vitreous were positive in 1 eye (4%) and 6 eyes (25%), respectively. Using Nested-PCR, an infectious agent was detected in the aqueous humor of 14 eyes (58%) and in the vitreous of 17 eyes (70%). Nested-PCR for eubacterial genome showed 100% correlation with bacteriologically positive specimens. Eubacterial genome was detected in 11 of 18 bacteriologically negative cultures of the vitreous.

Conclusions: Nested-PCR on aqueous humor and vitreous samples is a powerful and reliable tool for the diagnosis of bacterial endophthalmitis particularly in smear and culture negative specimens.

Key words: bacterial endophthalmitis, nested polymerase chain reaction (nested-PCR)

- Bina J Ophthalmol 2005; 10 (2): 207-213.

تشخیص آندوفتالمیت‌های باکتریایی به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در مقایسه با کشت هوازی میکروب‌شناسی

دکتر علیرضا مالکی[1]، دکتر تقی ناصرپور فریور[2] و دکتر علی توللی[3]

چکیده

هدف: ارزیابی سرعت و دقت واکنش زنجیره‌ای پلیمراز از نوع Nested-PCR در تشخیص آندوفتالمیت باکتریایی در مقایسه با کشت هوازی میکروب‌شناختی.

روش پژوهش: این مطالعه از نوع آینده‌نگر تحلیلی و مقایسه‌ای بر روی ۲۴ چشم از ۲۴ بیمار مبتلا به آندوفتالمیت بستری در بیمارستان فوق تخصصی چشم‌پزشکی الزهرا انجام شد. زلالیه و زجاجیه بیماران مورد بررسی میکروسکوپی، کشت معمول میکروب‌شناسی هوازی و Nested-PCR قرار گرفتند و سپس نتایج حاصل با یکدیگر مقایسه شدند.

یافته‌ها: کشت هوازی زجاجیه در ۶ مورد (۲۵ درصد) و کشت زلالیه در یک مورد (۴ درصد) مثبت شد. براساس Nested-PCR، عامل عفونی در زلالیه ۱۴ چشم (۵۸ درصد) و در زجاجیه ۱۷ چشم (۷۰ درصد) مشخص گردید. همه موارد کشت‌مثبت، در PCR نیز مثبت بودند ولی در ۶۱ درصد نمونه‌های زجاجیه‌ای کشت‌منفی، عفونت باکتریایی به وسیله PCR شناسایی شد.

نتیجه‌گیری: Nested-PCR زلالیه و زجاجیه برای تشخیص آندوفتالمیت باکتریایی، روش موفقیت‌آمیزی است؛ به ویژه در نمونه‌های کشت منفی. انجام تحقیقات بیش‌تر با مدل‌های دیگر PCR بر روی سایر انواع آندوفتالمیت توصیه می‌گردد.

• مجله چشم‌پزشکی بینا ۱۳۸۳؛ سال ۱۰، شماره ۲: ۲۱۳-۲۰۷.

Archive of SID

www.SID.ir

• **پاسخ‌گو:** دکتر علی توللی
۱- استادیار- چشم‌پزشک- فلوشیپ زجاجیه و شبکیه- دانشگاه علوم پزشکی زاهدان
۲- استادیار- PhD میکروب‌شناسی- دانشگاه علوم پزشکی زاهدان
۳- فلوشیپ شبکیه و زجاجیه- چشم‌پزشک- دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
• تامین بودجه: قطب مرکز تحقیقات چشم‌پزشکی کشور- بیمارستان چشم‌پزشکی الزهرا (س)
زاهدان- بیمارستان چشم‌پزشکی الزهرا (س)
تاریخ دریافت مقاله: ۶ اردیبهشت ۱۳۸۲
تاریخ تایید مقاله: ۲۹ آبان ۱۳۸۲

bp: base pair
NTP: nucleotide-tri-Phosphate
SDS: sodium dodecylsulfate
TE: Tris-HCL&EDTA

مقدمه

آندوفتالمیت باکتریایی جدی‌ترین شکل عفونت چشمی است که بینایی را به خطر می‌اندازد و ممکن است به دنبال جراحی، ضربه یا کراتیت باکتریایی ایجاد گردد و یا منشا درون‌زاد داشته باشد[۱-۳].

نتیجه کشت یا بررسی میکروسکوپی در نزدیک به ۴۰ درصد از چشم‌هایی که تشخیص بالینی آندوفتالمیت عفونی داشته‌اند، مثبت بوده است[۴]. شرایطی که به دنبال آندوفتالمیت به وجود می‌آیند و شدت علایم بالینی، عمدتاً بسته به زمان ظهور علایم، مقدار باکتری تلقیح‌شده و گونه‌های آلوده‌کننده متغیر است[۵و۶]. اگر مقدار عفونت کم باشد، تشخیص این بیماری عفونی از بیماری صرفاً التهابی چشم (آندوفتالمیت استریل) مشکل می‌شود[۷].

ارزش کشت نمونه‌های مایع زجاجیه و زلالیه در تشخیص آندوفتالمیت عفونی، به خوبی ثابت شده است[۸و۹] اما در اغلب موارد، مواجه شدن با کشت‌های منفی منجر به یک سردرگمی بالینی در تشخیص آندوفتالمیت استریل از باکتریایی می‌گردد و چون انتخاب روش درمانی استرویدی یا آنتی‌بیوتیکی نیاز به تشخیص استریل یا عفونی بودن التهاب دارد؛ تشخیص عامل سبب‌شناسی در چنین مواردی بسیار مهم است[۱۰].

از دلایل متعدد منفی شدن کشت می‌توان به کم بودن حجم نمونه، باقی ماندن باکتری‌ها بر روی سطوح جامد (مثل لنزهای داخل چشمی) که منجر به کم شدن تعداد باکتری‌ها در نمونه مایع می‌شود، استفاده از آنتی‌بیوتیک قبل از نمونه‌گیری و مشکل‌پسند بودن بعضی از عوامل عفونت داخل چشمی اشاره کرد[۱۱-۱۵]. بنابراین استفاده از روش‌های مولکولی به منظور پیش‌برد میزان تشخیص و کاهش زمان تشخیص، مورد توجه قرار گرفته است.

پیش‌رفت حاصل در تکثیر DNA توسط PCR، تاثیر زیادی بر روی سرعت و صحت آزمایش شناسایی یک گونه یا سویه باکتری داشته است. اکنون به جای تکیه بر قسمت‌های وقت‌گیر شناسایی فنوتیپی، امکان تکثیر نواحی خاصی از ژنوم باکتری توسط PCR و مقایسه آن‌ها در سطوح توالی بازهای این ژن‌ها به وجود آمده است[۱۶و۱۷]. این روش، مزیت عدم وابستگی به زنده بودن جرم را نیز به همراه دارد و منجر به طبقه‌بندی مجدد بعضی از جرم‌ها شده است[۱۸].

PCR علاوه بر تکرارپذیری، حساس نیز می‌باشد و تنها به تعداد کمی ارگانیسم برای انجام فرآیند تحلیلی نیاز دارد. این حساسیت، اساس تعدادی از آزمایش‌های تشخیصی شده است که از جمله این موارد می‌توان به آشکارسازی عوامل بیماری‌زا[۱۸-۲۰] و تعیین سازوکار مقاومت به داروهای خاص[۱۹،۲۱] اشاره کرد. حساسیت گزارش‌شده در روش PCR متفاوت است اما آشکارسازی یک جرم یا DNA معادل یک ارگانیسم نیز توسط PCR گزارش شده است[۷]. در حال حاضر، PCR حساس‌ترین روش تشخیصی در میکروب‌شناسی است[۲۲]، دارای بیش‌ترین و بهترین گسترش است و فراوان‌ترین روش مورد استفاده، آمپلیفیکاسیون اسید نوکلئیک می‌باشد. حساسیت و ویژگی قابل توجه PCR سبب می‌شود که عدم رعایت موازین دقیق کار با روش‌های بیولوژی مولکولی، نتایج مثبت کاذب به همراه داشته باشد. اساس روش PCR، برپایه چرخه‌های تکرارشده‌ای از توالی‌های اسید نوکلئیک انتخاب‌شده و افزایش‌یافته استوار است[۲۳و۲۴]. روش Nested-PCR، عمدتاً برای افزایش حساسیت طراحی شده است (مشخص کردن مقادیر کوچک هدف)؛ به

Archive of SID
www.SID.ir

ویژه در زمانی که درجه بالایی از حساسیت مورد نظر است (برای مثال در مورد عفونت چشم). در این روش، از دو گروه پرایمر برای آمپلیفیکاسیون استفاده می‌گردد؛ این دو گروه به ترتیبی طراحی می‌شوند که پرایمر دور دوم PCR، مکمل جزیی از محصولات تکثیری دور اول PCR باشد. در مواردی که از پرایمرهای پان‌باکتریال برای PCR استفاده می‌شود، امکان تشخیص نوع باکتری به دلیل تشابه ژنتیکی مورد استفاده در طراحی پرایمرها وجود ندارد؛ لذا در صورتی که هدف تشخیص نوع باکتری باشد، نیاز به استفاده از روش‌های چندگانه (مولتی‌پلکس) می‌باشد[۲۵،۲۶]. پرایمر، اولیگونوکلوتیدی است که به صورت شیمیایی ساخته شده است.

در مطالعه هم‌گروهی Lohmann و همکاران[۲۲]، نتایج مثبت PCR با نتایج مثبت میکروسکوپی، کشت تشخیصی، یا هر دو مطابقت داشت. هیچ کشت مثبتی، نتیجه منفی PCR ندارد. یافته‌های PCR به ویژه در موارد آندوفتالمیت دیررس، کمک‌کننده‌اند. در مطالعه Therese و همکاران[۱۰]، حساسیت مشخص کردن عامل باکتریایی با PCR به ۶۳/۸ درصد افزایش یافته است.

این تحقیق با هدف تشخیص آندوفتالمیت‌های باکتریایی به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز از نوع Nested-PCR و مقایسه آن با نتایج کشت معمول میکروب‌شناسی و ارزیابی کارآیی آن در موارد نمونه‌های کشت‌منفی انجام شده است.

روش پژوهش

این پژوهش به روش آینده‌نگر تحلیلی و مقایسه‌ای بر روی ۲۴ چشم از ۲۴ بیمار مبتلا به آندوفتالمیت که طی یک سال از مهر ماه سال ۱۳۸۰ لغایت پایان شهریورماه سال ۱۳۸۱ در بیمارستان فوق‌تخصصی چشم‌پزشکی الزهرا (س) زاهدان بستری شدند، انجام گردید.

تشخیص آندوفتالمیت باکتریایی براساس تاریخچه، معاینه و یافته‌های بالینی بود که شامل موارد زیر می‌باشند: کاهش دید، درد اطراف چشم، هایپرمی منتشر ملتحمه بولبی، کیموز، التهاب شدید و واکنش‌های فیبرینوپورولانت در اتاق قدامی، خلفی و زجاجیه.

ارتشاح زجاجیه تمام بیماران با اکوگرافی نمایان شد. نمونه‌گیری از زلالیه و زجاجیه چشم بیماران در اتاق عمل، تحت شرایط استریل و با حضور متخصص بی‌هوشی به صورت آماده به اقدام، انجام شد. نمونه‌گیری زلالیه تحت بی‌حسی موضعی با سوزن ۲۷ گاژ (قطر ۰/۳۳ میلی‌متر) انجام گردید و مقدار ۲۰۰-۱۰۰ میکرولیتر زلالیه از ناحیه لیمبوس کشیده شد.

نمونه‌گیری زجاجیه به صورت پارس پلانا انجام شد؛ بدین صورت که با سوزن ۲۳ گاژ در چشم‌های سودوفاک یا آفاک از ۳ میلی‌متری و در چشم‌های فاکیک از ۴ میلی‌متری خلف لیمبوس در ناحیه اینفروتمپورال، از طریق پارس پلانا وارد زجاجیه می‌شدیم و ۴۰۰-۳۰۰ میکرولیتر از مایع زجاجیه را می‌کشیدیم.

نمونه‌های گرفته‌شده از زلالیه و زجاجیه، بلافاصله در لوله‌های استریل جداگانه ریخته می‌شدند و در لوله‌ها به طور محکم بسته می‌شد و با برچسب مخصوص، نام بیمار و نوع نمونه مشخص می‌گردید و بلافاصله به آزمایشگاه بیمارستان انتقال می‌یافت.

روش کار آزمایشگاه

الف) روش کشت: محلول ارسال‌شده، سانتریفوژ می‌شد و کمی از ته‌نشین، برای اسمیر و کشت و بقیه به قسمت استخراج DNA منتقل می‌گردید. اسمیر و لام به روش گرم رنگ‌آمیزی می‌شد. برای کشت، از محیط‌های متداول هوازی مانند آگار خونی و شکلاتی استفاده شد و پس از رشد باکتری، به وسیله آزمایش‌های بیوشیمیایی مناسب، باکتری شناسایی می‌گردید.

ب) استخراج DNA: به ۵۰ میکرولیتر از نمونه‌های زجاجیه و زلالیه ارسال‌شده، ۱۵۰ میکرولیتر از بافر TE (بافر TE شامل ۱ mM EDTA، ۸= pH و ۱۰ mM TRIS-HCL می‌باشد) حاوی پروتیینیاز K (۲۰ mg/ml) و ۰/۵ درصد SDS افزودیم و به مدت یک ساعت در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد قرار دادیم. سپس هم‌حجم آن از مخلوط فنل، کلروفورم و ایزوآمیل به آن اضافه کردیم و به مدت ۵ دقیقه در ۱۵۶۰۰ g سانتریفوژ نمودیم. فاز آبی را به لوله جدید منتقل کردیم و به آن استات سدیم و اتانول مطلق افزودیم. بدین ترتیب، DNA موجود در نمونه را رسوب دادیم و رسوب حاصل را به مدت ۳۰ دقیقه در دمای

Archive of SID

www.SID.ir

۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار دادیم. سپس این محصول را با اتانول ۷۰ درصد شستشو و خشک نمودیم. رسوب خشک‌شده را دوباره در ۲۰ میکرولیتر از تریس حل کردیم و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار دادیم.

ج) انجام PCR: کل محلول PCR، ۵۰ میکرولیتر است که شامل مجموعه‌ای از یک واحد Supertaq polymerase (شرکت SuperTaq، انگلستان)، ۵ میکرولیتر از بافر حاوی کلریدپتاسیم ۵۰۰ میلی‌مول، تریس ۱۰۰ میلی‌مول، کلرید منیزیم ۱۵ میلی‌مول و ۰/۳۶ میلی‌مول از هر یک از پرایمر های زیر (ساخت DNA Technology A/S، دانمارک) همراه با ۲۰۰ میکرومول از هر یک از dNTP-ها و ۵ میکرولیتر از DNA الگو می‌باشد. پرایمرها عبارتند از:

در دور اول PCR (rU_4 و U_1):

U_1: ۵′ TTGGAGATTTGATCCTGGCTC ۳′

rU_4: ۵′ GGACTACCAGGGTATCTAA ۳′

در دور دوم PCR (rU_3 و U_2):

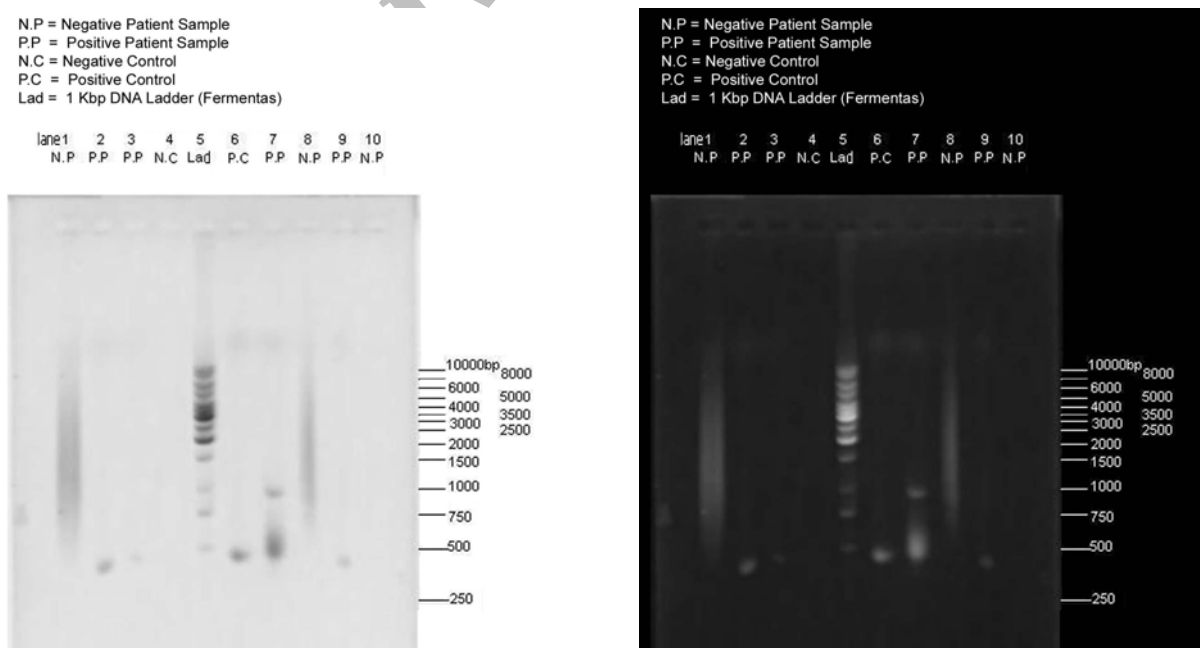
U_2: ۵′ GGCGTGCTTAACACATGCAAGTCG ۳′

rU_3: ۵′ GCGGCTGGCACGTAGTTAG ۳′

این پرایمرها، پرایمرهای یوباکتریال یونیورسال[۲۰و۵،۱۰] می‌باشند که ویژگی گسترده‌ای برای تمام باکتری‌های گرم‌مثبت و گرم‌منفی دارند[۲۰و۶،۱۰].

محصول PCR، الکتروفورز ژلی می‌شود و در آن به دنبال قطعات تکثیری ۴۷۰ bp می‌گردیم. از ژل‌های حاصل عکس گرفته شد (شکل ۱) و نتایج تشخیصی این مرحله با نتایج حاصل از کشت باکتری مقایسه گردید و میزان حساسیت PCR در مقایسه با کشت مشخص شد.

جهت جلوگیری از احتمال آلودگی و مشخص شدن آلودگی احتمالی در هر بار تکثیر، از دو کنترل منفی (یکی کنترل مواد و دیگری کنترل استخراج نمونه در دور اول) استفاده نمودیم. کنترل استخراج نمونه شامل استفاده از آب مقطر و بیولوژی مولکولی با همان روند استخراج نمونه بوده است و کنترل‌های دور دوم شامل کنترل مواد (تنها مواد مورد استفاده برای واکنش PCR) و یک نمونه کنترل استخراج نمونه (که یک میکرولیتر از محصولات تکثیری کنترل استخراج نمونه دور اول بود) مورد استفاده قرار گرفت. تنها زمانی که هم کنترل استخراج نمونه و هم کنترل مواد منفی بودند، نمونه وارد بررسی گردید و در غیر این صورت، نمونه از مطالعه حذف شد.



شکل ۱- نتایج Nested-PCR

ستون‌های ۱، ۸ و ۱۰: نمونه‌های منفی بیماران؛ ستون‌های ۲، ۳، ۷ و ۹؛ نمونه‌های مثبت بیماران؛ ستون ۴: نمونه کنترل منفی؛ ستون ۵: lad و ستون ۶: نمونه کنترل مثبت.

www.SID.ir

یافته‌ها

تعداد ۲۴ چشم مبتلا بـه آنـدوفتالمیت از ۲۴ بیمـار تحـت بررسی قرار گرفت. همه بیماران مورد بررسی از نظـر بـالینی بـه آندوفتالمیت باکتریایی اگـزوژن مبـتلا بودنـد و نـوع دیگـری از آندوفتالمیت قارچی، انگلی، هلمینتی یا ویروسی وجود نداشت.

پرایمرهـای یونیورسـال U_1 و rU_4 (در دور اول) و U_2 و rU_3 (در دور دوم) بـه طـور موفقیـت‌آمیـزی DNA حاصـل از تمـام سویه‌های باکتریایی مورد آزمایش را افزایش دادند تا به محصول ۷۶۶ bp پس از دور اول و ۴۷۰ bp پس از دور دوم رسید.

کشت میکروب‌شناسی در یک مورد نمونه زلالیه (۴ درصـد) و در ۶ مورد نمونه زجاجیه (۲۵ درصد) مثبت شـد. PCR در ۱۴ مورد از نمونه زلالیه (۵۸ درصد) و ۱۷ مـورد از نمونـه زجاجیـه (۷۰ درصد) مثبت گردید (نمودار ۱)؛ یعنـی در ۱۳ مـورد از ۲۳ نمونه کشت‌منفی زلالیـه (۵۶ درصـد) و ۱۱ مـورد از ۱۸ نمونـه کشت‌منفـی زجاجیـه (۶۱ درصـد)، براسـاس PCR نمونـه‌هـای مربوط، آندوفتالمیت باکتریایی وجود داشت.

نمودار ۱- توزیع فراوانی ۲۴ چشم براساس نتایج تشخیص آندوفتالمیت باکتریایی به تفکیک روش‌های تشخیصی

بحث

ویژگی‌های بالینی آندوفتالمیت حاد در زمان تظاهر، قـدرت کافی برای پـیش‌گـویی گونـه میکروبـی و راهنمـایی در تزریـق داخل زجاجیه‌ای آنتی‌بیوتیـک مناسـب و انتخـابی را ندارنـد[۲۷]. پیش‌رفت در درمان دارویی و جراحی باعث بهبـود پـیش‌آگهـی آندوفتالمیت عفونی شده است اما یک تشخیص سـریع و دقیـق برای رسیدن به نتیجه‌ای عملی و خوب، هنوز از اهمیت حیـاتی برخوردار است. به طور آرمانی، عامل عفونی باید قبـل از تجـویز آنتی‌بیوتیک مشخص شود. بـرخلاف کـشت میکـروب‌شـناختی، PCR می‌تواند عامـل عفـونی را در عـرض ۶-۴ سـاعت مـشخص نماید[۲۲].

تشخیص دقیق آندوفتالمیت، نیازمند توجه کافی بـه علایـم بالینی و آزمایش‌های میکروب‌شناسی است که به طـور مناسـب انتخاب شده‌اند. در حال حاضر بهترین آزمایش اسـتاندارد بـرای مشخص کردن جرم عفونی، کشت میکروب‌شناختی است زیرا به طور مستقیم، عوامل عفونی در حال رشد را مشخص می‌کند. در تشخیص آندوفتالمیت عفونی، نمونه‌های زجاجیه اغلب بـیش‌تـر از نمونه‌های زلالیـه، نتـایج مثبـت از خـود نـشان مـی‌دهنـد[۲۸]. تحقیقات نشان می‌دهند که تقریباً ۵۴ درصـد (۸۴-۲۷ درصـد) از چشم‌های مبتلا به آندوفتالمیت عفونی، دارای کشت زجاجیـه مثبت هستند. این میـزان بـرای کـشت زلالیـه، بـه ۳۷ درصـد کاهش می‌یابد[۱۰و۲۹].

اما در مطالعه ما، عامل عفـونی در نمونـه‌هـای زجاجیـه بـه وسیله کشت میکروب‌شناسی، در ۲۵ درصد موارد مشخص شـد. علت اختلاف با تحقیقات دیگر این است که در این مطالعه فقط از کشت هوازی استفاده شد و علت احتمـالی دیگـر، درمـان بـا آنتی‌بیوتیک قبل از مراجعه بیماران به مرکز ما بوده است.

در مطالعه مـا، اکثـر بیمـاران (۷۵ درصـد) بـا بررسـی‌هـای میکـروب‌شناسـی معمـول بـرای مـشخص کـردن بـاکتری در زجاجیـه، منفـی بـوده‌انـد امـا PCR توانـست در ۱۷ مـورد (۷۰ درصد) از کل بیماران، ژنوم بـاکتری را مـشخص نمایـد و نقـش مهم باکتری را به عنوان علت شایع آندوفتالمیت مشخص سـازد که با دیگر مطالعات هم‌خوانی دارد[۱۰].

التهاب‌های غیرعفونی پس از عمل، به علل متفـاوت زیـادی مانند شکل و طرح لنزها، دست‌کاری‌های جراحـی، بـاقی‌مانـدن قشر عدسی، سندرم عدسی سمی و یوویت فیکوژنیـک نـسبت داده شده‌اند[۳۰].

در موارد آندوفتالمیت پـس از ضـربه، غالبـاً تمـایز التهـاب ناشی از مصدومیت، از التهاب عفونی مـشکل اسـت و مـشخص کردن سبب‌شناسی در این موارد، بـسیار سرنوشـت‌سـاز خواهـد بود. مشخص کردن آندوفتالمیت عفونی یا استریل، نوع درمان را

Archive of SID
www.SID.ir

تعیین می‌نماید. سبب‌شناسی عفونی، تنها با تعیین کردن عامل عفونی در نمونه داخل چشمی ثابت می‌شود.

در مطالعات گذشته[۳۱و۱۱] نشان داده شده است که در آندوفتالمیت، نتایج کشت مثبت حاصل از زجاجیه رقیق‌نشده بیش‌تر از زلالیه است و حاکی از آن است که در صورت شک بالینی به آندوفتالمیت عفونی، بهتر است نمونه کشت از زجاجیه گرفته شود[۱]. دلیل این تفاوت، توانایی اتاق قدامی در حذف عوامل عفونی است[۱۱]. در مطالعه ما، PCR مایع زلالیه در ۵۸ درصد موارد و PCR زجاجیه در ۷۰ درصد موارد قادر به مشخص کردن ژنوم باکتری بوده است و اگرچه ۱۲ درصد اختلاف به نفع PCR زجاجیه وجود دارد ولی حساسیت PCR مایع زلالیه نسبت به کشت معمول میکروب‌شناختی مایع زجاجیه (۲۵ درصد موارد مثبت)، بسیار بیش‌تر است. این یافته‌ها بسیار مهمند، چرا که پاراسنتز اتاق قدامی نسبت به پاراسنتز زجاجیه، روش ساده‌تر و ایمن‌تری است و امکان انجام آن در مطب نیز وجود دارد. بنابراین پاراسنتز اتاق قدامی می‌تواند به عنوان روش انتخابی در تشخیص آندوفتالمیت به کار رود؛ البته به شرطی که روش‌های مولکولی بسیار حساس مانند PCR در دسترس باشند.

در بررسی نمونه‌های درون چشمی در مطالعه حاضر، PCR در تمام موارد کشت‌مثبت، مثبت بود به علاوه با کمک PCR، عفونت باکتریایی در ۶۱ درصد نمونه‌های زجاجیه‌ای که از نظر کشت باکتری‌شناسی منفی بوده‌اند، شناسایی گردید (موارد کشت منفی و PCR-مثبت آندوفتالمیت باکتریایی).

مطالعات بیش‌تری برای مشخص کردن گونه خاص باکتری در نمونه حاوی ژنوم باکتری لازم است. با آن‌که PCR یک آزمایش مستقیم برای اثبات وجود و حضور عامل عفونی است ولی به طور مستقیم نمی‌تواند بیماری‌زایی و توانایی عامل عفونی را در تکثیر و ازدیاد فعال، مشخص سازد. اما در آینده، پیش‌رفت در PCR ممکن است بتواند جهش در ژنوم بیماری‌زا را نشان دهد (که کاربرد آن، در جداسازی گونه‌های مقاوم به درمان آنتی‌بیوتیکی می‌باشد) و یا بتواند mRNA خاصی را نشان دهد که با آن، عفونت فعال، عفونت نهفته و یا عفونت قبلی مشخص و متمایز گردد.

نتیجه‌گیری و پیشنهادها

مطالعه ما به طور واضح نشان داد که Nested-PCR نمونه‌های درون چشمی و به ویژه زلالیه به عنوان آزمایش تشخیصی، دارای ارزش زیادی است و می‌تواند به عنوان جایگزینی برای کشت در نمونه‌هایی که با روش‌های معمول میکروب‌شناسی منفی گزارش شده‌اند یا در شرایطی که هنوز تشخیص بالینی مورد شک است، مورد استفاده قرار گیرد.

انجام مطالعات بیش‌تر با کشت‌های میکروب‌شناسی کامل‌تر و جامع‌تر و انواع دیگر PCR بر روی سایر انواع آندوفتالمیت، به ویژه آندوفتالمیت دیررس پس از عمل و آندوفتالمیت قارچی توصیه می‌گردد.

منابع

1- Puliafito CA, Baker AS, Haaf J, Foster CS. Infectious endophthalmitis: review of 36 cases. *Ophthalmology* 1982;89:921-929.
2- Cowen CL, Maddin WM, Hatem GF. Endogenous bacillus cereus endophthalmitis. *Ann Ophthalmol* 1982;19:65-68.
3- Ormerod LD, Paton BG, Haff J. Anaerobic bacterial endophthalmitis. *Ophthalmology* 1982;94:799-808.
4- Lohmann CP, Linde HI, Reischl U. Rapid diagnosis of infectious endophthalmitis using polymerase chain reaction (PCR): a supplement to conventional microbiological diagnostic method. *J Klin Monatsbl Augenheilkd* 1997;211:22-27(Abstract).
5- Hughes DS, Hill RJ. Infectious endophthalmitis after cataract surgery. *Br J Ophthalmol* 1994;78:227-232.
6- Okhravi N, Towler HMA, Hykin P, Matheson MM, Lightman S. Assessment of a standard treatment protocol on visual outcome following presumed bacterial endophthalmitis. *Br J Ophthalmol* 1997;81:719-725.
7- Carroll NM, Jaeger EEM, Choudhury S. Detection of and discrimination between gram positive and gram negative bacteria in intraocular samples by using nested-PCR. *J Clin Microbiol*

Archive of SID
www.SID.ir

2000;38:1753-1757.
8- Forster RK. Endophthalmitis: diagnostic cultures and visual results. *Arch Ophthalmol* 1974;92:387-392.
9- Rowsey JJ, Newson DL, Sexton DJ. Endophthalmitis current approaches. *Ophthalmology* 1982;89:1055-1066.
10- Therese KL, Anand AR, Madhavan HN. Polymerase chain reaction in the diagnosis of bacterial endophthalmitis. *Br J Ophthalmol* 1998;82:1078-1082.
11- Bazra M, Pavan PR, Doft BH. Evaluation of microbiological diagnostic techniques in postoperative endophthalmitis in the endophthalmitis vitrectomy study. *Arch Ophthalmol* 1997;115:1142-1150.
12- Records RE, Iwen PC. Experimental bacterial endophthalmitis following extracapsular lens extraction. *Exp Eye Res* 1989;49:729-737.
13- Rogers NK, Fox PD, Noble BA. Aggressive management of an epidemic of chronic pseudophakic endophthalmitis: results and literature survey. *Br J Ophthalmol* 1994;78:115-119.
14- Kalicharan DWL, Jongebloed LIL, Worst JGF. (An)aerobic bacteria found in the secondary-cataract material. A SEM/TEM Study. *Doc Ophthalmol* 1992;82:125-133.
15- Busin M, Cusumano A, Spitznas M. Intraocular lens removal from eyes with chronic low-grade endophthalmitis. *J Cataract Refract Surg* 1995;21:679-684.
16- Olive DM, Bean P. Principle and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol* 1999;37:1661-1669.
17- Van Belkum A. DNA fingerprinting of medically important microorganisms by use of PCR. *Clin Microbiol Rev* 1994;7:174-184.
18- Kawamura Y, HOU X, Sultana F. Distribution of staphylococcus spp. among human clinical specimens and emended description of staphylococcus caprae. *J Clin Microbiol* 1998;36:2038-2042.
19- Carroll NM, Okhravi N, Adamson P. Elimination of bacterial DNA from taqDNA polymerase using restriction endonuclease digestion. *J Clin Microbiol* 1999;37:3402-3404.
20- Greisen K, Loeffelholz M, Leong D. PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 1994;32:335-351.
21- Visser MR, Fluit AC. Amplification methods for the detection of bacterial resistance genes. *J Microbiol Methods* 1995;23:105-116.
22- Lohmann CP, Heeb M, Linde HJ. Diagnosis of infectious endophthalmitis after cataract surgery by polymerase chain reaction. *J Cataract Refract Surg* 1998;24:821-826.
23- Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase-catalyzed reaction. *Methods Enzymol* 1987;155:335-350.
24- Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am* 1990;262:56-65.
25- Erlich HA, Gelfand D, Sninsky JJ. Recent advances in the polymerase chain reaction [Review]. *Science* 1991;252:1643-1651.
26- Haqqi TM, Sarkar G, David CS, Simmer SS. Specific amplification of a refractory segment of genomic DNA. *Nucleic Acids Res* 1988;16:11844.
27- Johnson MW, Doft BH, Kelsey SF. The Endophthalmitis Vitrectomy Study. Relationship between clinical presentation and microbiologic spectrum. *Ophthalmology* 1997;104:261-272.
28- Peyman GA, Bassili SS. A practical guideline for management of endophthalmitis. *Ophthalmic Surg* 1995;26:294-303.
29- Forster RK, Abbott RL, Gelender H. Management of infectious endophthalmitis. *Ophthalmology* 1980;87: 313-319.
30- Meltzer DW. Sterile hypopyon after intraocular surgery. *Arch Ophthalmol* 1980;98:100-104.
31- Bohigian GM, Olk RJ. Factors associated with a poor visual result in endophthalmitis. *Am J Ophthalmol* 1986;101:332-341.

Archive of SID

www.SID.ir