Archive of SID

مجله دانشکده پزشکی
دانشگاه علوم پزشکی تهران
سال ۶۳، شماره ۱۲، صفحات ۱۰۰۶ تا ۱۰۱۴ ، (۱۳۸۴)

میزان جداسازی هموفیلوس آنفلوآنزای تیپ b در مایع مغزی نخاعی کودکان مشکوک به مننژیت با روش‌های کشت و PCR

مرکز طبی کودکان، ۸۲-۱۳۸۱

مروت طاهری‌کلانی (دانشجوی باکتری‌شناسی)*،دکتر فرخ اکبری‌نخجوانی (استادیار)*، دکتر بهرام کاظمی (دانشیار)، دکتر فرهاد بنکدار هاشمی (استادیار)*، دکتر محمد حقی‌آشتیانی (دانشیار)***، دکتر کرامت نوری (استادیار)****،شادی شاهسون (کارشناس ارشد)*،یوسف عرفانی (کارشناس ارشد)*****،امیر پیمانی (کارشناسی ارشد)*،مینا عابدینی (کارشناسی ارشد)*****

* گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
** گروه انگل‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
*** کلینیکال پاتولوژی، رئیس آزمایشگاه بیمارستان مرکز طبی کودکان تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران
**** گروه آمار حیاتی و اپیدمیولوژی دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
***** گروه میکرب شناسی، آزمایشگاه میکرب شناسی، بیمارستان مرکز طبی کودکان تهران

چکیده

مقدمه: مننژیت باکتریایی یک عفونت جدی و برخی مواقع یک عفونت کشنده‌ای است که سیستم عصبی مرکزی را تحت تاثیر قرار می‌دهد. عامل حدود ۹۵٪ از مننژیت‌های کودکان هموفیلوس آنفلوآنزای تیپ b (Hib)، استرپتوکوک پنومونیه، E.coli و استرپتوکوکوس آگالاکتیه می‌باشند. روش‌های آزمایشگاهی مرسوم مانند کشت که برای شناسایی عوامل بیماریزای مننژیت به کار می‌روند، به حدود ۳۶ ساعت یا بیشتر وقت نیاز دارند. به علاوه مشاهده شده است که به دنبال کاربرد درمان ضد میکروبی قبل از جمع آوری نمونه، توانایی کشت در تایید وجود میکروارگانیسم ایجاد کننده مننژیت در حدود ۳۰٪ می‌باشد. به همین دلیل روش‌های غیر کشت نظیر PCR مورد استفاده قرار گرفته اند.

مواد و روشها: در این مطالعه از سال ۱۳۸۱ تا سال ۱۳۸۲ به مدت یکسال، ۳۰۰ نمونه مایع مغزی – نخاعی از مرکز طبی کودکان تهران جمع آوری گردید و آزمایشات کشت و PCRبا استفاده از پریمرهای اختصاصی Hib بر روی همه آنها انجام گرفت.

یافته ها: از تعداد کل ۳۰۰ نمونه در ۳۲ مورد نتیجه کشت مثبت بود، که از این میان هموفیلوس آنفلوآنزای تیپ b در ۵ مورد جدا گردید. با استفاده از PCR علاوه بر ۵ نمونه‌ای که کشت آنها مثبت بود، در ۲ مورد دیگر هم Hib تشخیص داده شد.

نتیجه‌گیری و توصیه‌ها: نتایج این مطالعه نشان داد که هموفیلوس آنفلوآنزای تیپ b عامل ۱۵/۶ ٪ از موارد مننژیت‌های باکتریایی کودکان به شمار می‌رود. همچنین مقایسه دو روش کشت و PCR نیز نشان داد که روش اخیر در مقایسه با کشت دارای حساسیت و ویژگی ۱۰۰ ٪ و ۹۹٪ می‌باشد. با توجه به اینکه در مننژیت ضرورت تشخیص و درمان سریع وجود دارد، در صورت وجود امکانات PCR ، استفاده از این روش توصیه می‌شود.

کلمات کلیدی: مننژیت باکتریایی، هموفیلوس آنفلوآنزای تیپ b، PCR

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

منتژیت باکتریایی یک عفونت جدی و برخی مواقع یک عفونت کشنده‌ای است که سیستم عصبی مرکزی را تحت تاثیر قرار می‌دهد. این باکتری، عامل التهاب منتژ در نتیجهٔ آلودگی باکتریایی آن می‌باشد. منتژیت تقریباً همیشه با تب همراه بوده و بی‌قراری عمومی همراه با درد در مفاصل و عضلات شایع می‌باشد. سردرد شدید، شایع‌ترین علامت منتژیت است که معمولاً ناشی از تغییر شکل عروق منتژ می‌باشد (۱).

عامل حدود ۹۵٪ از منتژیت‌های کودکان هموفیلوس آنفلوآنزای تیپ b (Hib)، استرپتوکوک پنومونیه، E.coli و استرپتوکوکوس آگالاکتیه می‌باشند. بیشتر موارد منتژیت‌های ایجاد شده در کودکان بالاتر از یک ماه ناشی از یکی از عوامل ذکر شده در بالا می‌باشد. هموفیلوس آنفلوانزای تیپ b یکی از مهم‌ترین عوامل ایجاد کننده منتژیت در کودکان بین ۱۲-۶ ماه در کشور هایی است که در مقابل Hib واکسینه نشده اند (۲). روش‌های آزمایشگاهی مرسوم مانند کشت که برای شناسایی عوامل بیماریزای منتژیت به کار می‌روند، به حدود ۳۶ ساعت یا بیشتر وقت نیاز دارند. به علاوه مشاهده شده است که به دنبال کاربرد درمان ضد میکروبی قبل از جمع‌آوری نمونه، توانایی کشت در تایید وجود میکروارگانیسم ایجاد کننده منتژیت در حدود ۳۰٪ ماست. قابل توجه این که اطلاعات به دست آمده از مرکز مراقبت از بیماری‌های قابل انتقال سازمان بهداشت جهانی نشان دهنده تفاوت میان موارد مشکوک به منتژیت و مواردی است که کشت آن‌ها را تایید می‌کند. برای غلبه بر این مشکل روش‌های غیر کشت نظیر PCR مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۳). تا قبل از معرفی واکسن‌های کونژوگه Hib، بیشتراز ۹۵٪ از موارد بیماری تهاجمی ناشی از هموفیلوس آنفلوآنزا، توسط سروتیپb ایجاد می‌شد. در کشورهایی که واکسیناسیون در آن‌ها در حال انجام است، انسیدانس بیماری تهاجمی ناشی ار Hib تا ۹۰٪ کاهش پیدا کرده است، اما گزارشاتی از ظهور مجدد بیماری تهاجمی ناشی از Hib در کشورهایی که به خوبی برنامه واکسیناسیون در آنها انجام گرفته است، هم وجود دارد. به این دلیل بررسی و مراقبت پس ازواکسیناسیون امری ضروری می‌باشد (۴).

ممکن است پایین بودن گزارشات در جوامعی که واکسیناسیون در آنها به صورت روتین انجام نمی گیرد، احتمالا ناشی از عدم موفقیت در جداسازی این باکتری از کشت و تعیین هویت این ارگانیسم باشد.

همانطوری که می‌دانیم منتژیت‌های باکتریایی جزو فوریت‌های پزشکی بوده و به تشخیص و درمان سریع نیاز دارند. عدم تشخیص به موقع و درمان نادرست موجب، از دست رفتن بیمار خواهد شد. در تشخیص منتژیت‌های باکتریایی علاوه بر علایم کلینیکی که مد نظرقرار می‌گیرند، استفاده از روش‌های آزمایشگاهی جهت شناسایی نوع عامل بیماری و شروع درمان مناسب کمک کننده بوده و می‌تواند میزان مرگ و میر ناشی از این بیماری‌ها را کاهش دهد.

روش‌هایی که تاکنون برای تشخیص هموفیلوس آنفلوآنزا به کار رفته است اگر چه با ارزش هستند، ولی همانطوری که قبلا ذکر شد، این تست‌ها یا به دلیل طولانی بودن زمان آزمایش و یا محدودیت هایی نظیر نداشتن امکانات لازم برای انجام آنها مشکلاتی را در زمینه تشخیص منتژیت به وجود آورده اند. به همین دلیل بررسی به منظور یافتن بهترین روش تشخیصی که از نظر مدت زمان انجام آزمایش و داشتن پاسخ به حداقل زمان ممکن نیاز داشته باشد، ادامه دارد. با توجه به کمبود مطالعات انجام شده بر روی این باکتری در کشورمان با استفاده از روش‌های نوین تشخیصی و اهمیت منتژیت در کودکان از نظر درمان سریع و به موقع، به نظر می‌رسد که استفاده از روش PCR که از حساسیت و ویژگی بالایی نسبت به سایر تست‌های مورد استفاده برای تشخیص Hib برخوردار است، مطلوب باشد.

مواد و روش‌ها

جمع آوری نمونه

نمونه مورد بررسی در این مطالعه، مایع مغزی نخاعی کودکان مشکوک به منتژیت بوده است. به این منظورآزمایشگاه

www.SID.ir

Archive of SID

میکرب‌شناسی مرکز طبی کودکان تهران به عنوان بیمارستان اصلی جهت جمع آوری نمونه‌های CSF از کودکان مشکوک به مننژیت انتخاب گردید.

مایع مغزی- نخاعی کودکان مشکوک به مننژیت که برای اولین بار به آزمایشگاه ارسال می‌گردید، نمونه‌گیری شد. ابتدا در شرایط استریل مقداری از نمونه به میکروتیوب‌های استریل که در اختیار همکاران آزمایشگاه قرارداده شده بود منتقل گردیده و تا انجام آزمایش PCR در فریز نگهداری می‌گردید. از باقی مانده نمونه‌ها هم برای آزمایشات میکرب شناسی، بیوشیمیایی و شمارش سلولی استفاده شده و نتایج آنها به همراه دیگر مشخصات بیماران از قبیل سن، جنس،علایم بالینی و سابقه مصرف آنتی‌بیوتیکی قبلی در یک پرسشنامه ثبت می‌گردید.

۳۰۰ نمونه در مدت یکسال (از اوسط دی ماه سال ۱۳۸۱ تا اوسط دی ماه سال ۱۳۸۲) تهیه شد.

کشت نمونه‌ها

پس از سانتریفیوژ مایع مغزی نخاعی از رسوب حاصل بر روی محیط‌های آگار خوندار، شکلات آگارو لوین تال کشت داده و نتایج در طی ۲۴ ساعت بعد مورد بررسی قرار گرفتند.

اکثر باکتری‌ها می‌توانند بر روی آگار خوندار رشد نمایند، اما برای رشد هموفیلوس آنفلوانزا (باکتری مورد نظر در این مطالعه)، پنوموکوک و منگوکوک نیاز به وجود Co_2 می‌باشد. به همین دلیل کشت‌های لوین تال و شکلات آگار در داخل جار شمعی قرار گرفتند.

پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون محیط‌های کشت مورد بررسی قرار گرفته ودر صورتی که رشدی مشاهده می‌شد، بلافاصله تست‌های تفریقی بر روی آنها انجام می گرفت. در صورتی که رشدی بر روی این محیط‌ها مشاهده نمی شد، محیط‌های جامد (مانند لوین تال و شکلات اگار) به مدت ۳ روز نگهداری می‌شدند، تا در صورتی که طی این مدت باز هم رشدی مشاهده نمی شد، این محیط‌ها از دور خارج می شدند. پس از مشخص شدن پلیت‌هایی که رشد بر روی آنها صورت گرفته بود، از تست‌های تشخیصی و افتراقی برای تشخیص باکتری‌ها استفاده می گردید که شامل رنگ آمیزی گرم، تست‌های اکسیداز و کاتالاز، پدیده رشد اقماری در اطراف کلونی‌های استافیلوکوکوس ارئوس و تست‌های نیازمندی به فاکتورهای X و V استفاده گردید و در نهایت با آنتی‌سرم اختصاصی تایید قطعی باکتری به عنوان هموفیلوس آنفلوانزای تیپ b صورت می گرفت.

آزمایش PCR

پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه دارای توالی زیر بودند:

Haem R
[5′-CAGTAAATACACCTGTTGCCCCTG-3′]
Haem L
[5′-GTTGTAGCAGCCATTCATCAAATA-3′]

طراحی این پریمرها برحسب ژن hpD این باکتری که یکی از پروتئین‌های اختصاصی غشای خارجیHib را کد می‌کند انجام گرفته است.

استخراج DNA از سوش استاندارد هموفیلوس انفلو آنزای تیپ b (ATCC 35056).

در ابتدا یک کلونی از باکتری برداشته، در PBS حل و دو بار شستشو داده شد. سپس با توجه به مقدار رسوب ۲۰۰-۱۰۰ میکرولیتر از بافر لیز کننده (NaCl:100mM, Tris:10mM, EDTA:1mM, 0.1-0.2% Triton x-100, 0.32M Sucrose) به آن اضافه گردید و میکروفیوژ حاوی نمونه به مدت یکساعت در حرارت $^{\circ}C$ ۵۰-۴۵ قرار داده شد. پس از آن نمونه به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شده وبا دور ۱۴,۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. در پایان برای انجام PCR از مایع رویی استفاده گردید.

استخراج DNA از نمونه‌های مایع مغزی - نخاعی

برای استخراج DNA از نمونه‌های مایع مغزی نخاعی بر طبق کار Shoma و همکارانش عمل کرده و مراحل زیر به ترتیب انجام گرفت (۱):

۱- نمونه CSF را به مدت ۱۵ دقیقه در داخل آب جوش قرار داده و طی این مدت چند بار سروته شدند.

۲- نمونه‌ها به مدت یک دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژشدند.

www.SID.ir

Archive of SID

۳- در مرحله بعد نمونه‌ها به مدت ٤ ساعت در داخل فریزر $-20\ ^{\circ}C$ ، و سپس به مدت ۵ دقیقه در داخل آب جوش قرار داده شدند. (با این عمل تمامی سلول‌ها لیز شده و DNA آزاد می‌شود).

٤- نمونه‌ها به مدت یک دقیقه با دور ۱۰,۰۰۰ سانتریفیوژشدند.

۵- در پایان برای انجام PCR از مایع رویی استفاده گردید.

حجم کل مورد استفاده برای انجام آزمایش PCR ۵۰ میکرولیتر بود. مواد مورد استفاده برای هر واکنش به صورت ذیل بود:

10 X PCR Buffer 5 µl (1X) (KCl, Tris HCl, Mg)
50 Mm Mg Cl_2 1.5 µl (1.5 mM)
100 mM dNTP 1 µl (0.2 mM)
Taq DNA pol 0.5µl (2.5 U) (Cinnagen,Lot.810017)
Primer R,L 2 µl (40 pM)

حجم Template DNA مورد استفاده در Set up روش با سوش استاندارد1 µl و برای نمونه های CSF ، 10 µl بوده است.

برنامه مورد استفاده برای انجام PCR با استفاده از دستگاه ترموسیکلر (Germany, ependurff) به صورت زیر بود:

Primary Denaturation 94 °C 5 min
Loop: 30
1- Denaturation 94 °C 1 min
2- Annealing 56 °C 1 min
3- Extension 72 °C 2 min
Final Extension 72 °C 8 min

برای الکتروفورز محصولات بدست آمده ازPCR از ژل آگارز ۱/۵ درصد استفاده گردید. برای الکتروفورز به این شکل عمل شد که به ازای هر cm از طول ژل ۵ ولت ولتاژ داده شود، بنابر این چون طول ژل حدود ۱۵ سانتی متر بود، ولتاژی در حدود ۷۵ ولت کافی بود. زمان لازم برای الکتروفورز هم به این شکل انتخاب گردید که الکتروفورز تا زمانی ادامه پیدا کند که باندها تا ۲/۳ از طول ژل را طی کرده باشند.

یافته ها

کشت هموفیلوس آنفلوآنزا و توزیع فراوانی باکتری‌های دیگر جدا شده از CSF

در طی این مطالعه ۳۰۰ نمونه مایع مغزی نخاعی جمع آوری گردید و آزمایشات کشت و PCR بر روی همه آن‌ها انجام گرفت. از این تعداد در ۳۲ مورد نتیجه کشت مثبت بود. در این میان هموفیلوس آنفلوآنزای تیپ b فقط در ۵ مورد جدا گردید، که ۱۵/٦ ٪ از کل نمونه های منتژیت‌های باکتریایی کودکان را شامل می‌شد. هموفیلوس آنفلوآنزای تیپ b بر روی هر دو محیط مورد استفاده در این مطالعه (لوین تال و شکلات آگار) رشد نمود. کلونی‌های این باکتری بر روی این محیط‌ها، بزرگ، موکوئیدی و دارای بویی شبیه لانه موش بودند. کلونی‌های این باکتری بر روی محیط لوین تال مشخص تر از محیط شکلات آگار بودند. سایر باکتری‌های جدا شده با روش کشت شامل استافیلوکوکوس کواگولاز منفی (۲۵٪)، پنوموکوک (۹/٤ ٪)، استافیلوکوک ارئوس (۹/٤ ٪)، منگوکوک (٦/۳ ٪)، E.coli (٦/۳ ٪)، آسینتوباکتر (٦/۳ ٪)، سودوموناس (٦/۳ ٪)، انتروکوک (۳/۲ ٪)، استافیلوکوک ساپروفیتیکوس (۳/۲ ٪)، استرپتوکوک ویریدانس (۳/۲ ٪)، استرپتوکوک آلفا- همولیتیکوس (۳/۲ ٪) و کلبسیلا (۳/۲ ٪) بودند.

از میان باکتری‌های جدا شده با روش کشت ٥٦ ٪ گرم مثبت و ٤٤ ٪ گرم منفی بودند. بر اساس نتایج کشت هموفیلوس انفلوآنزای تیپ b عامل ۱/۷ ٪ از کل منتژیت‌های کودکان را تشکیل داد (جدول۱).

جدول ۱- مقایسه نتایج کشت و PCR در تشخیص Hib در مایع مغزی نخاعی بیماران مشکوک به منتژیت

روش تشخیصی	نتایج آزمایش	
	مثبت	منفی
کشت	۵ (۱/۷ ٪)	۲۹۵ (۹۸/۳ ٪)
PCR	۷ (۲/۴ ٪)	۲۹۳ (۹۷/۶ ٪)

www.SID.ir

Archive of SID

ارتباط سن و جنس با مننژیت ناشی از Hib بر اساس کشت

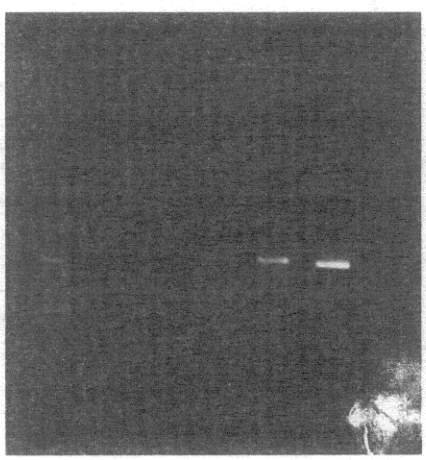
بر اساس نتایج کشت میانگین سنی ابتلا به هموفیلوس آنفلوآنزای تیپ b ۲٤ ماه و دامنه سنی ابتلا به آن بین ۱۰ تا ٤۲ ماه بود. جنس کودکان مبتلا به Hib بر اساس نتایج کشت شامل ۱ پسر و ٤ دختر بود، که بر این اساس ۸۰ ٪ از کودکان مبتلا به Hib را دختران تشکیل می‌دادند.

آزمایش تاییدی نمونه‌های Hib

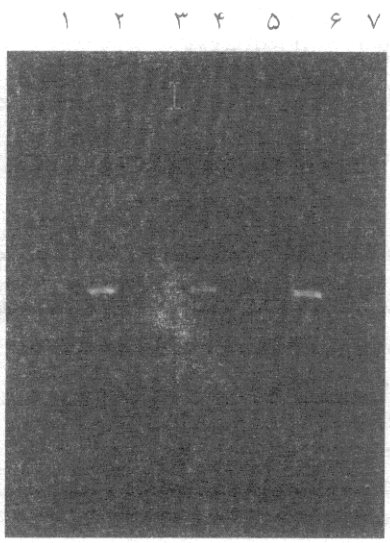
یکی از تست‌های مهمی که در این مطالعه برای تایید وجود Hib انجام گرفت، تست نیازمندی به فاکتورهای X و V بر روی محیط‌های فاقد این فاکتورها مانند محیط‌های مولر هینتون اگار و ژلوز ساده بود. در این مطالعه رشد کلونی‌های باکتری در اطراف فاکتورهای X و V مشاهده گردید.

PCR نمونه‌های CSF

برای انجام آزمایش PCR در ابتدا این روش با استفاده از سوش استاندارد و نیز نمونه‌های کشت مثبت از نظر Hib ، Set up گردید، که نتایج آن در تصاویر ۱ و۲ نشان داده شده است. از میان سایر نمونه‌های CSF ، که از نظرکشت منفی بودند، PCR توانست در ۲ مورد Hib را تشخیص دهد. در این مطالعه محصولات PCR تمام نمونه‌های مثبت ازنظرهموفیلوس آنفلوآنزای تیپ b الکتروفورز شدند که نتایج آن در تصاویر ۳ نشان داده شده است.



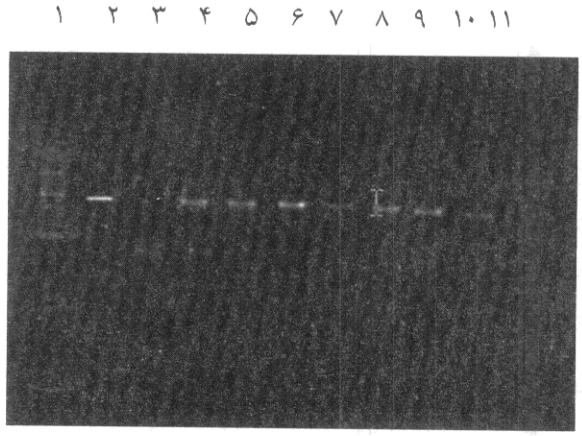
تصویر۱- ژل الکتروفورز محصولات PCR سوش استاندارد هموفیلوس آنفلوآنزای تیپ b در مرحله Set up کردن روش PCR. ردیف (۱) شاخص وزنی DNA . ردیف (۲) آب مقطر (به عنوان کنترل منفی). ردیف (۳) DNA باکتری E.coli (به عنوان کنترل منفی). ردیف (۴) DNA هموفیلوس آنفلوآنزای سوش استاندارد (۰/۵ میکرولیتر). ردیف (۵) DNA هموفیلوس آنفلوآنزای سوش استاندارد (۱ میکرولیتر). ردیف (۶) DNA هموفیلوس آنفلوآنزای سوش استاندارد (۲ میکرولیتر) . ردیف (۷) DNA انسانی (به عنوان کنترل منفی)



تصویر ۲- ژل الکتروفورز محصولات PCR نمونه‌های کشت مثبت هموفیلوس آنفلوآنزا در مرحله Set up روش PCR .
ردیف (۱) شاخص ورنی DNA. ردیف (۲) کنترل مثبت (سوش استاندارد هموفیلوس آنفلوآنزای تیپ b). ردیف (۳) کنترل منفی (آب مقطر). ردیف (۴) DNA نمونه کشت مثبت شماره ۱ هموفیلوس آنفلوآنزا (۱۰ میکرولیتر). ردیف (۵) DNA کشت مثبت شماره ۱ هموفیلوس آنفلوآنزا (۵ میکرولیتر). ردیف (۶) DNA نمونه کشت مثبت شماره ۲ هموفیلوس آنفلوآنزا (۱۰ میکرولیتر). ردیف (۷) DNA نمونه کشت مثبت شماره ۲ هموفیلوس آنفلوآنزا (۵ میکرولیتر).

www.SID.ir

Archive of SID



تصویر۳- بررسی محصولات PCR تمام نمونه‌های مثبت Hib توسط PCR.

ردیف (۱) شاخص وزنی DNA. ردیف (۲) کنترل مثبت (سوش استاندارد هموفیلوس آنفلوآنزای تیپ b). ردیف (۳) کنترل منفی (آب مقطر). ردیف (۴ تا ۱۰) نمونه‌های مثبت هموفیلوس آنفلوآنزای تیپb. ردیف (۱۱) کنترل منفی (DNA باکتری E.coli).

تعیین فراوانی Hib با PCR و ارتباط سن وجنس با مننژیت ناشی از آن

بر اساس نتایجPCR ، هموفیلوس آنفلوانزای تیپb عامل ۲/٤ درصد از کل مننژیت‌های کودکان بوده است (جدول۱). بر این اساس متوسط سنی افراد مبتلا به Hib ۲۲ ماه و دامنه سنی آن‌ها هم بین ۱۰ تا ۲٤ ماه بوده است. بر اساس نتایج PCR ۸٦٪ از کودکان مبتلا را دختران تشکیل داده اند.

مقایسه دو روش کشت و PCR در تشخیص Hib

در این مطالعه کشت در ۵ مورد توانست Hib را در نمونه‌های CSF تشخیص دهد. در مقایسه با آن PCR هم توانست Hib را در۵ نمونه کشت مثبت تشخیص دهد. بر این اساس حساسیت PCR در مقایسه با کشت، ۱۰۰٪ تعیین گردید. از میان ۲۹۵ نمونه‌ای که کشت آن‌ها منفی بود، در ۲ مورد نتیجه PCR مثبت بود، که در نتیجه ویژگی PCR در مقایسه با کشت ۹۹٪ بوده است. در این مطالعه همچنین ارزش اخباری مثبت ومنفی PCR به ترتیب ۷۱٪ و ۱۰۰٪ بوده است. بر این اساس دقت روش PCR برای تشخیص Hib در نمونه‌های CSF ۹۹٪ تعیین گردید.

بحث

تشخیص Hib با PCR و مقایسه با کشت

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)، تکنیکی است که استفاده از آن در آزمایشگاههای میکروبیولوژی بالینی برای شناسایی عوامل ایجاد کننده بیماری‌های عفونی در حال افزایش است. دلیل استفاده از PCR در تشخیص منتژیت این است که روش‌های تشخیصی مرسوم نظیر اسمیر مستقیم، کشت و روشهای سرولوژیک در بسیاری از مواقع ناتوان از شناسایی عوامل بیماری می‌باشند (۱).

در مطالعه ما به این نتیجه رسیدیم که PCR تکنیک مفیدی برای شناسایی هموفیلوس آنفلوآنزای تیپ b در نمونه‌های مایع مغزی نخاعی کودکان مشکوک به منتژیت می‌باشد. در این مطالعه از ژن hpD که کد کننده یکی از پروتئین‌های اختصاصی غشای خارجی Hib می‌باشد، به عنوان DNA هدف برای تکثیر به وسیله PCR استفاده کردیم. پرایمر هایی که در اینجا استفاده کردیم ازحساسیت و ویژگی بالایی برای شناسایی Hib در نمونه‌های CSF برخوردار بودند. در مطالعه اخیر روش استخراج DNA از نمونه‌های مایع مغزی نخاعی بر اساس کارهای Shoma و همکارانش صورت گرفت (۱).

با استفاده از PCR می‌توان در طی یک روز نتایج لازم را به دست بیاوریم. این در حالی است که برای قرائت نتایج کشت مایع مغزی نخاعی به زمانی در حدود ٤۸ ساعت یا بیشتر وقت نیاز است. روش PCR در صورتی که فرد به خوبی آموزش دیده باشد، در مقایسه با کشت نیاز به زمان بسیار کمتری در حدود۵ ساعت دارد.

همانطوری که در اکثر آزمایشگاههای کشور مشاهده می‌شود و نیز بر اساس گزارشات مرکز مراقبت بیماری‌های سازمان بهداشت جهانی، تفاوت رو به افزایشی در میان موارد مشکوک به منتژیت و مواردی که کشت آنها را تایید می‌کند وجود دارد (٤). به همین دلیل و برای برطرف کردن این

www.SID.ir

Archive of SID

مشکل، استفاده از روش PCR ، در دستور کار قرار گرفت و نشان داد که در ۴۰٪ بیشتر از کشت، منتژیت ناشی از Hib را تشخیص می‌دهد. در این مطالعه PCR مایع مغزی نخاعی در مقایسه با روش کشت، حساسیت ۱۰۰٪ را نشان داد. با توجه به این مطلب PCR یک تست خوب برای شناسایی Hib در نمونه‌های CSF می‌باشد. در این مطالعه ما برای PCR در مقایسه با کشت ویژگی ۹۹٪ را به دست آوردیم. از اینجا می‌توان نتیجه گرفت که تست PCR علاوه بر حساسیت، از ویژگی بسیار بالایی نیز برای تشخیص Hib برخوردار می‌باشد.

کودکانی که از آنها مایع مغزی نخاعی اخذ می‌شود، دارای علایم بالینی مانند تب، سردرد شدید و در مواردی سفتی گردن هستند، که شک به وجود منتژیت را در آنها بالا می‌برد. از طرف دیگر ممکن است که قبل از اخذ نمونه، کودکان آنتی‌بیوتیک دریافت کرده باشند که موجب منفی شدن نتایج کشت شده باشد (۵). با توجه به وجود علایم بالینی در کودکان مشکوک به منتژیتی که کشت منفی و PCR مثبت بوده‌اند ونیز با توجه به مرسوم بودن استفاده از آنتی‌بیوتیک در کشور می‌توان نتیجه گرفت که به دلیل حساسیت و ویژگی بالای پرایمرهای طراحی شده برای Hib ، نتایج PCR واقعاً مثبت بوده است.

به هر حال صرفنظراز وجود موارد بالا در مورد تایید نتایج PCR ، اولین اقدام عملی در جهت تایید این نتایج، تکرار آزمایش PCR می‌باشد. نتایج مثبت PCR پس از دو بار تکرار باز هم نتیجه مثبت خود را تکرار کرد، که دلیلی بر صحیح بودن آزمایش PCR بود.

در این مطالعه کشت وPCR هر دو توانستند هموفیلوس آنفلوآنزای تیپ b را در نمونه‌های CSF تشخیص دهند. در اینجا بایستی ذکر شودکه با توجه به اینکه پرایمرهای ما فقط برای Hib طراحی شده بودند و نیز با توجه به نتایج کشت، می‌توان ادعا کرد که هموفیلوس آنفلوآنزای تیپ b مهمترین تیپ کپسولی هموفیلوس آنفلوآنزا است که موجب ایجاد منتژیت در کودکان می‌شود.

حساسیت و ویژگی PCR که در این مطالعه به دست آوردیم، تقریبا منطبق بر مطالعات قبلی در ارتباط با این گونه تست‌ها برای تشخیص منتژیت ایجاد شده توسط این باکتری می‌باشد. در مورد مطالعات قبلی حساسیت و ویژگی PCR به ترتیب دارای ۱۰۰٪ و ۹۳٪ می‌باشد. در مطالعات قبلی که بیشتر در تشخیص همزمان Hib ، نایسریا منتژیتیدیس و استرپتوکوکوس پنومونیه با استفاده از پریمرهای universal صورت گرفته است، حساسیت تست PCR ،۱۰۰٪ می‌باشد (۲،۱). بنابراین، مطالعه‌ای که ما در اینجا انجام دادیم، از نظر حساسیت مشابه و از نظر ویژگی بالاتر از نتایج مطالعات قبلی بوده است، زیرا ویژگی که ما در این مطالعه به دست آوردیم ۹۹٪ می‌باشد.

در پایان بحث این قسمت بایستی ذکر کنیم که تست حساس و اختصاصی PCR می‌تواند برای شناسایی سریع و در نتیجه کمک به مدیریت مناسب منتژیت ناشی ازHib در جهت کاهش میزان مرگ و میرناشی از آن بسیار کمک کننده باشد. در این مطالعه اگر چه هدف اصلی همان تشخیص Hib با PCR بوده است، اما بروز مقاومت در میان ایزوله‌های Hib ، استفاده از روش Multiplex-PCR را برای تشخیص همزمان Hib و ژن مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن غیرقابل اجتناب ساخته است. بنابراین توسعه مطالعه انجام شده با روش Multiplex می‌تواند علاوه بر تشخیص سریع Hib ، به پزشک کمک کند تا با انتخاب درمان آنتی‌بیوتیکی مناسب از بروز مرگ و میر در میان کودکان مبتلا به این بیماری بکاهد.

تعیین فراوانی Hib با PCR و کشت

میزان فراوانی هموفیلوس آنفلوآنزای تیپ b که در غیاب استفاده از واکسیناسیون روتین Hib مورد بررسی قرار می‌گیرد، در میان جوامع گوناگون و نواحی جغرافیایی مختلف متفاوت می‌باشد (۷). به طور ویژه‌ای در اروپای شمالی و آسیا گزارشات نسبتا کمی از فراوانی Hib وجود دارد. اگرچه دلایل زیادی برای این یافته پیشنهاد شده است، اما پاسخ قانع کننده‌ای برای آن وجود ندارد (۶).

در این مطالعه میزان فراوانی هموفیلوس آنفلوآنزای تیپ b با هر دو روش PCR و کشت مورد ارزیابی قرار گرفت. با توجه به نتایج این مطالعه در صورتی که کشت ملاک تعیین فراوانی قرار گیرد، Hib عامل ۶ / ۱۵ درصد از موارد

www.SID.ir

Archive of SID

منتژیت‌های باکتریایی کودکان و عامل ۱/۷ درصد از کل موارد منتژیت‌های کودکان محسوب خواهد شد. اما در صورتی که نتایج PCR ، ملاک قرار گیرد، هموفیلوس آنفلوآنزای تیپ b عامل ۲/٤ درصد از کل منتژیت‌های باکتریایی کودکان به شمار می‌رود. در مورد درصد فراوانی Hib در میان منتژیت‌های باکتریایی نمی توان درصد دقیقی پیشنهاد داد، زیرا پرایمرهای طراحی شده فقط مختص به Hib بوده و بنابراین اگر باکتری دیگری در CSF وجود داشته باشد، توسط این پرایمر شناسایی نخواهد شد.

نتایج به دست آمده در این مطالعه نشان داد که فراوانی ابتلا به Hib پایین تراز فراوانی ابتلا به آن در میان کشورهای همسایه می‌باشد. مثلا این میزان در پاکستان که یکی از کشورهای همسایه ایران است در حدود ٤۰٪ و عربستان ٦۰٪ گزارش شده است (۷).

به طور کلی آمار نشان می‌دهد که انسیدانس هموفیلوس آنفلوآنزای تیپ b در آسیا کم می‌باشد. شناسایی ارتباط بین میزان مصرف آنتی‌بیوتیک و انسیدانس بیماری ناشی از Hib در این رابطه ارائه شده است (۸).

مطالعات نشان داده‌اند که در نواحی از دنیا که انسیدانس بیماری Hib در آن‌ها کم گزارش می‌شود، استفاده از آنتی‌بیوتیک به میزان قابل توجهی بیشتر از نواحی است که در آن‌ها انسیدانس بالایی از این باکتری گزارش می‌شود (۸). به عنوان مثال استفاده از آنتی‌بیوتیک در میان کودکان در چین، ژاپن و تایوان بالا می‌باشد، به طوری که انسیدانس سالانه این باکتری در این کشورها به ترتیب ۱۰ ، ۷ و ۱ مورد گزارش شده است (۱۱-۹). در اسپانیا که کمترین انسیدانس منتژیت ناشی از هموفیلوس آنفلوآنزای تیپ b را در میان کشورهای اروپایی دارد، نشان داده شده است که ٤٦٪ از کودکان قبلا آنتی‌بیوتیک مصرف کرده اند. این در حالی است که در کشورهایی که انسیدانس بالایی از Hib گزارش می‌شود، استفاده از آنتی‌بیوتیک به میزان کمی گزارش شده است (۱۲). با توجه به مطالب بالا و با توجه به اینکه مصرف بی رویه آنتی‌بیوتیک در ایران امری معمول می‌باشد، احتمال می‌رود یکی از دلایل کم بودن جداسازی این باکتری در کشور همین امر باشد، اما بررسی ما با PCR نشان دادکه فراوانی این باکتری در کشور کمتر از ۲۰٪ است.

علاوه بر استفاده از آنتی‌بیوتیک، محققین امکان تاثیر عواملی دیگرمانند نژاد و قومیت را در انسیدانس Hib نیز مورد بررسی قرار داده اند. نشان داده شده است که در برخی از اقوام انسیدانس هموفیلوس آنفلوآنزای تیپ b بیشتر است، که بیانگر دخالت عوامل ژنتیکی و نژاد در انسیدانس این باکتری می‌باشد (٦). به طور جالب توجهی نشان داده شده است که در میان کودکان دارای نژاد آسیایی که در انگلیس زندگی می‌کنند، میزان ابتلا به هموفیلوس آنفلوآنزای تیپ b بیشتر از سایر نژادها می‌باشد، که این خود نشان می‌دهد که تفاوت‌های ژنتیکی نمی‌تواند سطح پایین انسیدانس Hib را در آسیا توجیه کند (۱۱).

با توجه به نتایج مطالعه اخیر، سن ابتلا به هموفیلوس آنفلوآنزای تیپ b همانند اکثر مطالعات ثبت شده کمتر از ٤ سال بوده است که ضرورت واکسیناسیون را در کشور مطرح می‌کند. در این مطالعه همچنین نشان داده شد که میزان ابتلای دختران بیشتر از پسران بوده است. البته این یافته در تناقض با سایر مطالعاتی می‌باشد که در آنها میزان ابتلای پسران بیشتر ذکر شده است (۱۳). احتمالا این تفاوت ناشی از تعداد کم نمونه‌های مورد بررسی می‌باشد و شاید اگر تعداد نمونه بیشتری از تمام بیمارستان‌های تهران مورد بررسی قرار می‌گرفت، نتایج تا حدودی به آنچه که در مطالعات قبلی ذکر شده است نزدیکتر می‌شد. بنابراین بحث در این مورد به بررسی‌های بیشتری نیاز دارد.

به هر حال، نتایج مطالعه اخیر در مورد فراوانی هموفیلوس آنفلوآنزای تیپ b نشان داد که درصد فراوانی این باکتری ۱۰٪ بالاتر از فراوانی گزارش شده در مقالات قبلی می‌باشد. با توجه به یافته‌های این مطالعه هرچند که درصد فراوانی Hib در میان کودکان ایران کم بوده است، اما این باکتری همچنان یکی از مهمترین عوامل ایجاد کننده منتژیت در کودکان به شمار می‌رود.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

1. Shoma S, et al. Rapid detection of Haemophilus influenzae Type b in Bangladeshi children with pneumoniae and meningitis by PCR and analysis of antimicrobial resistance. J Health Nutr, 2001 Dec, 19 (4): 268-74.

2. Rudstrum, et al. Detection of bacterial DNA in CSF by an assay for simultaneous detection of Neissera meningitis, Haemophilus influenzae Type b and streptococcus by seminsted PCR strategy. J Clin Microb, 1994 Nov, 38 (11): 2738-449.

3. Turk DC, et al. Clinical importance of Haemophilus influenzae. In: Sell SH, Wright PW (eds) Biology of Haemophilus influenzae, Epidemiology, Immunology and prevention of disease. 1982 New York: Elsevier North Holland, pp, 3-9.

4. Saha SK, et al. The increasing burden of disease in Bangladesh children due to Haemophilus influenzae type b meningitis. Ann-Trop-Pediatr. 1997 Mar; 17 (1): 5-8.

5. Ishikawa T, et al. Epidemiology of bacterial meningitis in children: Achi prefecture, Japan, 1984-1993. Pediatric Neurology. 1996, 14: 244-250.

6. Gessner, B D. Worldwide variations in the incidence of Haemophilus influenzae type b meningitis and its association with ampicilin resistance. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2002, 21: 79-87.

7. Heikki P. Need for Haemophilus influenzae type b vaccination in Asia as evidenced by epidemiology of bacterial meningitis. Pediatr Infect Dis J, 1998, 17: S148-51.

8. Kanra G, et al. Microorganism involved in acute bacterial meningitis in children and the role of Haemophilus influenzae. Turk-J-Pediatr. 1996, Oct-Dec; 38 (4): 407-12

9. Yang Y, et al. Acute bacterial meningitis in children in Hafei, China 1990-1992. China Medical Journal, 1996, 109: 385-388.

10. Ishikawa T, et al. Epidemiology of bacterial meningitis in children: Achi prefecture, Japan, 1984-1993. Pediatric Neurology. 1996, 14: 244-250.

11. Wang C H, et al. Invasive Haemophilus influenzae disease and purulent meningitis in Taiwan. Journal of the Formosa Medical Association, 1996, 95: 599-604.

12. Ismail Hussein M, et al. Haemophilus influenzae meningitis in Malaysia. Pediatr Infect Dis J. 1998, Sep; 17: s 189-90.

13. Richard E, et al. NELSON, Essentials of PEDIATRICS, Fourth Edition. 2002.

www.SID.ir