پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره نوزدهم شماره ۶۹ فروردین و اردیبهشت سال ۱۳۸۸ (۲۱-۱۴)

مقایسه دو روش تشخیصی کشت و آزمون تکثیری 16srDNA در شناسایی باکتری های مایع مغزی نخاعی بیماران مشکوک به مننژیت باکتریایی در قزوین

محمدرضا ساروخانی[۱] پرویز ایازی[۲] صفر علیزاده[۳] فرشاد فروغی[۴] احمد سهمانی[۴] محترم آدینه[۵]

چکیده

سابقه و هدف : تشخیص اولیه و صحیح مننژیت باکتریال از اهمیت فوق‌العاده‌ای برخوردار است ولی به طور متداول امکانات آزمایشگاهی بهینه و سریعی در تشخیص عوامل مولد مننژیت وجود ندارد. هدف این ارزیابی مقایسه آزمون PCR با روش کشت در شناسایی باکتری مایع مغزی نخاعی (CSF) بیماران مشکوک به مننژیت در مراکز درمانی قزوین بود.

مواد و روش ها : ۱۰۰ نمونه CSF جمع‌آوری شد و هر یک به دو قسمت تقسیم گردید. روی یک قسمت از آنها روش‌های رایج کشت و رنگ‌آمیزی لام اجرا شد و از بخش دیگر، DNA استخراج و با استفاده از پرایمرهای یونیورسال برای ژن 16S rDNA روش PCR اجرا شد و خصوصیات کارایی این دو روش مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته ها : روش PCR توانست وجود ژنوم باکتریایی را در تمام ۳۶ نمونه کشت مثبت و همچنین در ۳۸ نمونه از ۶۴ نمونه کشت منفی نشان دهد لذا دارای حساسیت ۱۰۰ درصد، ویژگی ۴۰/۶ درصد، ارزش پیشگویی مثبت ۴۸/۶ درصد و ارزش پیشگویی منفی ۱۰۰ درصد (در صورت پذیرفتن روش‌های باکتریولوژیک به عنوان آزمون طلایی) می‌باشد. اما ضریب کاپا، توافق بین دو روش را برابر ۰/۳۳ نشان داد.

استنتاج : خصوصیات کارایی هر دو روش PCR و کشت دارای مزایا و معایبی می‌باشد. لذادر فرایندهای بالینی استفاده از هر دو روش پیشنهاد می‌شود. به ویژه در مواردی که شک به آلودگی نمونه، حضور میکروارگانیسم‌های دیر رشد یا پرنیاز و مصرف آنتی‌بیوتیک وجود دارد.

واژه‌های کلیدی: مننژیت باکتریایی، 16S rDNA PCR، خصوصیات کارایی تست، قزوین

مقدمه

عفونت‌های سیستم اعصاب مرکزی(CNS) بسیار خطیر و مرگ‌آفرین قلمداد می‌شوند. این عفونت‌ها توسط باکتری‌ها، قارچ‌ها، ویروس‌ها و حتی پارازیت‌ها بوجود می‌آیند و وجود هر نشانهٔ مثبتی از این عوامل در نمونه مایع مغزی- نخاعی (CSF) بلافاصله به پزشک مربوطه گزارش می‌شود. مننژیت‌های حاد اغلب توسط باکتری‌ها و ویروس‌ها ایجاد می‌شود و علائمی چون تب، سردرد، استفراغ، ترس از نور و تغییرات رفتاری و غیره در این

مولف مسئول: محمدرضا ساروخانی- قزوین، دانشگاه علوم پزشکی قزوین
E-mail: sarokhani2002@yahoo.com
۱. متخصص بیوتکنولوژی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی قزوین
۲- فوق تخصص عفونی اطفال، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی قزوین
۳. کارشناس ارشد میکروبیولوژی مربی دانشگاه علوم پزشکی قزوین
۴. کارشناس ارشد ایمونولوژی مربی دانشگاه علوم پزشکی قزوین
۵. کارشناس آزمایشگاه دانشگاه علوم پزشکی قزوین

تاریخ دریافت : ۸۷/۹/۹ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۸۷/۱۰/۱۰ تاریخ تصویب : ۸۸/۱/۱۹

www.SID.ir

بیماران دیده می‌شود که وجود آنها پزشک را به گرفتن مایع مغزی- نخاعی جهت تشخیص قطعی مجبور می‌سازد.

استاندارد فعلی تشخیص منتژیت باکتریال، بررسی میکروسکوپی وکشت CSF می‌باشد(۲،۱). اما مشکل اصلی این روش عدم حساسیت (وجود منفی کاذب) و به ویژه طولانی بودن زمان پاسخ‌دهی است که در شرایط معمول حداقل ۲۴ تا ۴۸ ساعت و درمواقعی که تعداد میکروارگانیسم در نمونه کم است، نیاز به زمان بیشتری دارد. از طرفی در صورتی که بیمار مصرف آنتی‌بیوتیک داشته و یا میکروارگانیسم‌های دیر رشد و پرتوقع در کار باشند، حساسیت بررسی میکروسکوپی و کشت CSF مورد تردید قرار می‌گیرد(۸-۳). در دهه اخیر، روش‌های تکثیری بر مبنای PCR جهت تشخیص زودرس و دقیق منتژیت باکتریال معرفی شده‌اند که هدف بیشتر آنها ژن 16S rDNA است که در بیشتر باکتری‌های واقعی، این ژن با تغییرات بسیار اندکی حفظ شده است(۱۳- ۹). روش طلایی و استاندارد در شناسایی آزمایشگاهی منتژیت باکتریال، نشان دادن میکرو ارگانیسم عامل در نمونه‌های CSF است و در حال حاضر نیز بطور متداول از این روش‌ها استفاده می‌شود(۲،۱) لیکن با معرفی روش‌های مولکولی و تکثیر ژنومی، عقیده قبلی متزلزل شده و برخی این روش‌ها را موثرتر می‌دانند(۱۳).

اما در مطالعات مختلف معرفی شده در منابع فوق، مقایسه روش‌های ملکولی به طور عمده با تعیین یک میکروارگانیسم خاص در روش کشت بوده است(۱۱-۱۴،۷). از طرفی در اکثر این مطالعات میزان توافق دو روش و یا ضریب کاپا بررسی نشده است. بنابراین در این تحقیق دو روش کشت و PCR روی نمونه‌های واحد CSF به محک آزمایش و مقایسه گذاشته می‌شوند تا کارایی آنها از ابعاد مختلف بررسی شود.

مواد و روش ها

این تحقیق در طی سال ۱۳۸۶روی نمونه‌های ۱۰۰ بیمار با علائم بالینی مشکوک به منتژیت (با تأیید پزشک متخصص اطفال) مراجعه‌کننده به بیمارستان‌های دانشگاه علوم پزشکی قزوین صورت گرفت. اطلاعات دموگرافیک و نیز مرتبط با بیماری در قالب پرسشنامه‌ای از بیماران اخذ شد. در آزمایشگاه از هر نمونه CSF مقدار ۱۰۰ تا ۳۰۰ میکرولیتر در شرایط کاملاً استریل برداشته شد و در فریزر منهای ۸۶ درجه جهت مراحل بعدی استخراج و آزمون PCR نگهداری شد. مابقی حجم نمونه‌های CSF، مورد آزمون‌های استاندارد باکتریولوژیک (کشت و رنگ‌آمیزی گرم) واقع شد(۱).

جهت استخراج DNA نمونه‌ها، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از CSF در لوله میکروسانتریفوژ وارد و در حرارت آب جوش به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفت و سپس با نیروی سانتریفوژی ۱۰/۰۰۰g به مدت یک دقیقه رسوبات آن ته‌نشین شد(۱۴،۷). محتوای مناسب DNA سوپرناتانت هر لوله با استفاده از دستگاه جدید نانودراپ و مقایسه جذب در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید.

انتخاب پرایمرهای یونیورسال بر مبنای مقالات منتشر شده LU و Pandit بوده که مکمل نواحی حفظ شده ژن 16S rDNA می‌باشند. سکانس این پرایمرها به شرح زیر می‌باشند(۶-۴).

U1(F): 5'-CCAGCAGCCGCGGTA ATACG-3'
U2(R):5'-ATCGG(C/A)TACCTTGTTACGACTTC--3'

این پرایمرها با سفارش در کمپانی ATG دانمارک سنتز شدند.

مخلوط واکنش PCR حاوی ۵ میکرولیتر(حدود ۵۰ نانوگرم) از استخراج DNA، ۱ میکرولیتر (۲۰ پیکومول) از هر یک از دو پرایمر U1 و U2 ، ۰/۳ میکرولیتر (۱/۵ واحد) از Taqپلی مرازباخلوص بالا، ۵ میکرولیترازبافر 10X PCR، ۲/۵ میکرولیتر(۲/۵ میلی مول) از $MgCL_2$، ۰/۵ میکرولیتر (۰/۴mM) از dNTP و ۳۴/۷ میکرولیتر از آب مقطر (حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر) بود. تمام این مواد از کمپانی Fermentase تهیه شدند.

سیکل‌های تکثیری PCR ، در دستگاه ترموسایکلر MWG به انجام رسید که شامل: ۳ دقیقه در ۹۵ درجه

Archive of SID

www.SID.ir

سانتی‌گراد و سپس ۳۰ سیکل به صورت ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. چندین کنترل منفی(آب) و مثبت(ژنوم‌حاوی 16S rDNA شناخته شده) در هر سری از واکنش‌های PCR آورده شد(۵،۴،۲).

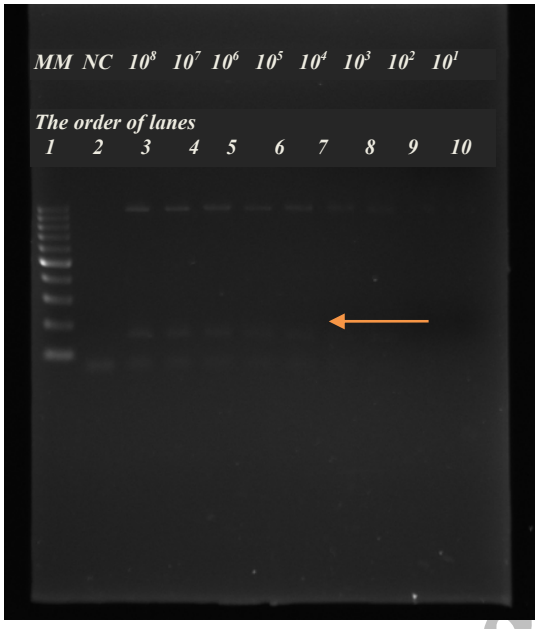
محصولات PCR (آمپلیکون‌ها) با استفاده از الکتروفورز ژل آگار ۱/۵ درصد مورد شناسایی قرار گرفتند. جهت تعیین حساسیت آنالیتیکی روش بکار گرفته شده، رقت‌های سریالی از غلظت‌های شناخته شده (مشابه دانسیته اپتیک لوله ۰/۵ مک فارلن لوله استاندارد باکتریولوژیک) سویه‌های مشخص شامل E.coli ATCC25972، H.influenza ATCC 35056 و S.peneumonia ATCC 49617 تهیه شد و پس از استخراج DNA و اندازه‌گیری محتویات DNAی آنها، به عنوان الگو در فرایند PCR استفاده شدند(۱۳).

از نرم‌افزارSPSS ویرایش۱۳/۵ جهت آنالیزهای آماری تعیین خصوصیات کارایی تست، شامل ویژگی و حساسیت و استفاده شد. ضریب کاپا نیز جهت بررسی توافق دو روش با همین نرم افزار محاسبه گردید. در این روش که برای مواردی است که نمی‌توان هیچ‌یک از دو روش مورد بررسی را به‌عنوان روش مرجع و طلایی درنظرگرفت و پارامترهای کارایی روش دیگر را با آن مقایسه کرد؛با استفاده از جداول ویژه ای مقادیر انطباق و عدم انطباق داده‌های دو روش درج و سپس بامحاسبه میزان توافق شانس، ضریب کاپا یا میزان توافق دو روش بدست می‌آید.

یافته ها

از ۱۰۰ بیمار مورد مطالعه ۷۰ نفر مذکر و ۳۰ نفر مونث بودند. میانگین سنی بیماران ۸ ± ۱۲ماه به دست آمد. ۷۴ نفر ازبیماران قبل ازگرفتن نمونه CSF مصرف آنتی‌بیوتیک داشته و ۲۶ نفر مسابقه مصرف آنتی‌بیوتیک نداشتند.

حساسیت آنالیتیکی روش برای تمام سه نوع سویه مشخص در حدود 10^2 تا 10^3 کلنی در میلی‌لیتر (حدود ۱۰ نانوگرم در میکرولیتر) از CSF تعیین شد (تصویر شماره ۱).



تصویر شماره ۱: حساسیت روش PCR: رقت‌های سریالی از DNA باکتری E.coli تهیه و با روش 16S rDNA PCR و الکتروفورز ژل بررسی شده است.DNA های فوق از غلظت‌های 10^8 (ستون سوم از راست) تا غلظت 10^1 (ستون ۱۰ ازسمت راست) واحد مولد کولونی در میلی‌لیتر از باکتری مذکور استخراج شده‌اند. به طوری که ملاحظه می‌شود DNA لوله تا رقت 10^2 واحد مولد کولونی همچنان توانسته باند مشخص مورد انتظار (996 bp) را ایجاد نماید (فلش). کنترل منفی (ستون۲) و سایز مارکر (ستون۱) نیز ملاحظه می‌شوند.

از ۱۰۰ نمونه مورد ارزیابی، کشت ۳۶ مورد مثبت بود و شایع‌ترین سویه جدا شده استافیلوکوک ارئوس بود (جدول شماره ۱).

همچنین از ۱۰۰ نمونه مورد ارزیابی، ۷۴ مورد دارای PCR مثبت بودند. مثالی از نمونه‌های PCR مثبت و PCR منفی چند مورد از بیماران در تصویر شماره ۲ آمده است.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول شماره ۱ : انواع سویه های باکتریائی جداشده باروش کشت

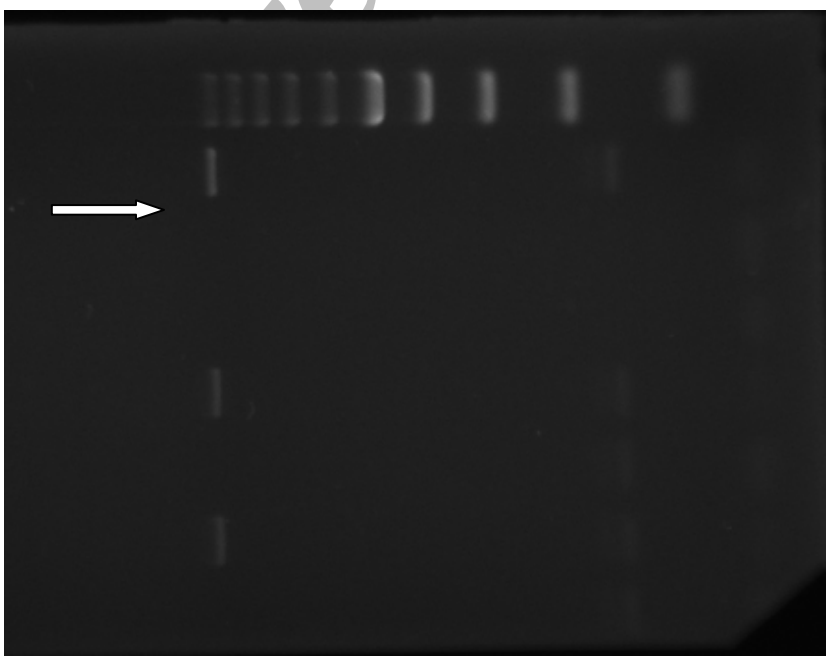
نوع سویه	درصد (تعداد) / درصد فراوانی	تعداد
Pneumococci	٪۸	۸
Haemophylus influenza	٪۶	۶
N. meningitides	٪۲	۲
K. pneumonia	٪۲	۲
Enterobacter sp.	٪۲	۲
Staph. aureus	٪۱۰	۱۰
Staph. pidermidis	٪۲	۲
Pseudomonas sp.	٪۲	۲
Acinetobacter sp.	٪۲	۲
Negative culture	٪۶۴	۶۴
جمع	٪۱۰۰	۱۰۰

از ۲۶ بیماری که قبل از نمونه‌گیری مصرف آنتی‌بیوتیک نداشته‌اند، ۱۲ مورد کشت مثبت و PCR مثبت و در ۱۴ مورد کشت منفی و PCR منفی بوده است. اما از ۷۴ بیماری که قبل از نمونه‌گیری مصرف آنتی‌بیوتیک داشته‌اند ۳۸ مورد کشت منفی ولی PCR مثبت و ۲۴ مورد کشت و PCR هردو مثبت و ۱۲ مورد کشت و PCR هر دو منفی بوده‌اند. (جدول شماره ۲) (مثال این موارد در تصویر شماره ۲ ارائه شده است).

اما با فرض عدم اطلاع از مصرف آنتی‌بیوتیک در بیماران (در عمل چنین است) برای ارزیابی کلی روش PCR، ابتدا نتایج با روش کشت (به عنوان آزمون طلایی) مقایسه شدند که نتایج در جدول شماره ۳ آمده است.

جدول شماره ۲ : مقایسه دو روش کشت و PCR بر اساس مصرف و یا عدم مصرف آنتی بیوتیک در جامعه مورد مطالعه

عدم مصرف آنتی بیوتیک (n=26)			مصرف آنتی بیوتیک (n = 74)		
PCR	کشت +	کشت —	PCR	کشت +	کشت —
+	۱۲	۰	+	۲۴	۳۸
—	۰	۱۴	—	۰	۱۲



تصویر شماره ۲ : مثالی از نمونه‌های CSF مثبت و منفی که با روش 16S rDNA PCR تعیین گردیده‌اند. از بالا به پایین: سایز مارکرباده قطعه 100 bp، کنترل مثبت ، کنترل منفی و نمونه‌های – ، + ، – و + و — به ترتیب زیردیده می‌شوند. نمونه منفی: بیماری که کشت وی هم منفی بوده است (عدم مصرف آنتی بیوتیک) نمونه مثبت: بیماری که کشت وی منفی بوده است (مصرف آنتی بیوتیک).نمونه منفی: بیماری که کشت وی هم منفی بوده است (مصرف آنتی بیوتیک) نمونه مثبت: بیماری که کشت وی هم مثبت بوده است (مصرف آنتی بیوتیک) نمونه منفی: بیماری که کشت وی هم منفی بوده است (عدم مصرف آنتی بیوتیک). فلش باند مورد انتظار را نشان می دهد.

www.SID.ir

جدول شماره ۳ : مقایسه نتایج 16S rDNA PCR با کشت در تعیین موارد مننژیت باکتریایی مشکوک در بیمارستان‌های دانشگاه علوم پزشکی قزوین

PCR	کشت (استاندارد)		جمع (n=100)
	مثبت (n=36)	منفی (n=64)	
مثبت N=74	۳۶	۳۸	n=۷۴
منفی N=26	صفر	۲۶	n=۲۶

بر مبنای داده‌های جدول شماره ۳ خصوصیات کارایی روش PCR به شرح ذیل محاسبه شد :

حساسیت (مثبت حقیقی): ۱۰۰ درصد، ویژگی (منفی حقیقی): ۴۰/۶ درصد، ارزش پیشگویی مثبت (PPV): ۴۸/۶ درصد و ارزش پیشگویی منفی (NPV): ۱۰۰ درصد. همچنین در این حالت ضریب کاپا با استفاده از نرم‌افزار SPSS جهت بررسی میزان توافق دو روش برابر ۰/۳۳ محاسبه شد.

بحث

در این مطالعه آزمون 16S rDNA PCR در تشخیص مننژیت‌های باکتریایی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصله مؤید عدم توافق کامل این روش با یافته‌های حاصل از روش‌های باکتریولوژیک (به عنوان استاندارد طلایی) می‌باشند. علی‌رغم این که برخی از خصوصیات کارایی تست نظیر حساسیت ۱۰۰ درصد و ارزش پیشگویی منفی ۱۰۰ درصد تست بسیار مناسب می‌باشد، لیکن ویژگی (۴۰/۶ درصد) و ارزش پیشگویی مثبت (۴۸/۶ درصد) این روش پایین است. این مطلب بدین مفهوم است که یا نتایج مثبت کاذب PCR بالا است و یا برعکس بعضی نتایج کشت به غلط منفی می‌باشند که حالت اخیر محتمل‌تر است. همان طور که در بخش مقدمه نیز ذکر شد، مصرف آنتی‌بیوتیک و یا حضور برخی ارگانیسم‌های ویژه چنین وضعیتی را در روش کشت بوجود می‌آورند(۸-۶). در مطالعه اخیر ۷۴ درصد از بیماران مصرف آنتی‌بیوتیک داشته‌اند (اطلاعات نشان داده نشده‌اند).

میزان توافق دو روش با استفاده از محاسبه نرم افزاری ضریب کاپا ۰/۳۳ حاصل شد که نشان‌گر توافق پایین دو روش با هم می‌باشد (هیچ یک دیگری را تأیید نمی‌کند). علی‌رغم این که در هیچ مطالعه‌ای عدم توافق دو روش را با ضریب کاپا نشان داده نشده است، ولی در تعدادی از مطالعات عدم توافق فوق‌الذکر به چشم می‌خورد(۸-۶).

بررسی نتایج ۲۶ مورد بیماری که قبل از نمونه‌گیری آنتی بیوتیک مصرف نکرده‌اند و ۷۴ بیماری که مصرف آنتی بیوتیک داشته‌اند، موید تاثیر شگرف و مداخله‌گر این عامل در توافق و یا عدم توافق این دو روش است؛ بطوریکه در عدم مصرف آنتی بیوتیک نتایج دو روش کاملاً مشابه است اما در مصرف آنتی بیوتیک تقارن نتایج دو روش کاهش می‌یابد. لیکن وجود میکروارگانیسم‌های پرتوقع و یا دیر رشد را نباید از نظر دور داشت. تاثیر مصرف آنتی بیوتیک بر نتایج کشت و PCR نمونه‌های مایع مغزی نخاعی غیر قابل انکار است اما به نظر می‌رسد که بر کشت بیش از PCR تاثیرگذار باشد. بر اساس اصول منطقی بعد از مصرف آنتی‌بیوتیک ابتدا کشت خون و بعد کشت مایع مغزی نخاعی و سر انجام با کمی تاخیر جواب PCR تحت تاثیر قرار می‌گیرد اما در مطالعه حاضر به این موضوع پرداخته نشد چون نیاز به پی‌گیری و نمونه‌گیری‌های متوالی و متعدد در طی زمان‌های مختلف وجود داشت تا از بررسی نتایج حاصل از نمونه‌های اخذ شده در زماهای متوالی نتایج استخراج شود از طرفی انجام این بخش تحقیق با اشکالات اخلاقی همراه بود.

به هرحال در کلینیک و آزمایشگاهها بروز همه این حالات محتمل است و این تحقیق در صدد بررسی وضعیت دو روش مختلف در شرایط موجود می‌باشد.

در این مطالعه از پرایمرهای ویژه نواحی کاملاً ثابت (conserved) ژن 16S rDNA که در ژنوم تمام باکتری‌ها و با کپی بالا موجود است و وجود تمام انواع

Archive of SID

www.SID.ir

یو باکتری‌ها را نشان می‌دهد، استفاده شد تا بتواند بطور کلی منتژیت‌های باکتریال از ویرال را افتراق دهد. لیکن در مطالعات دیگر از پرایمرهای ویژه گونه‌های موجد منتژیت‌های باکتریال نظیر منگوکک، لیستریا و پنوموکک و هموفیلوس استفاده شده است که اگرچه موجب اختصاصیت بالای تشخیص شده لیکن در این مطالعات هدف صرفاً جداسازی موکلولی آن گونه خاص و توان روش PCR در نشان دادن آن بوده است (۱۰،۹،۷،۳). اما حتی با استفاده از تکثیر ژن16S rDNA با پرایمرهای یونیورسال مورد استفاده در این تحقیق نیز می‌توان با استفاده از آنزیم‌های محدودگر (RE) روش مولکولی RFLP را روی آمپلیکون به انجام رساند و گونه‌های ویژه باکتریایی را تفکیک نمود.

در تعداد زیادی از منابع ذکر شده در مقدمه، انجام آزمون PCR برای سویه‌های مشخص شامل منگوکک (۹)، لیستریا مونوسیتوژن(۱۰)، همو فیلوس تایپ B (۷) و سه گونه مهم منگوکک، پنوموکک و هموفیلوس(۳) با ایجادشرایط اختصاصی برای جداسازی آن میکروارگانیسم خاص در محیط کشت، تعداد موارد کشت مثبت بالاتر رفته و لذا با تعداد مواردی که PCR آن‌ها را معین نموده انطباق بسیار بالاتری ایجاد شده است و در نتیجه اختصاصیت روش PCR نیز بالاتر بوده است. اما در این تحقیق روش متعارف کشت CSF در همه آزمایشگاه‌هاو روش PCR با پرایمرهای یونیورسال در نمونه‌هایی واحد با هم مقایسه شده‌اند و طبعاً سطح ویژگی پایین با روش کشت و یا ضریب توافق پایین دو روش می‌تواند به دلایل زیر باشد :

یکی از ویژگی‌های این تحقیق تعیین کمّی دقیق DNA استخراج شده با روش دستگاه نانو دراپ بوده است که در مطالعات دیگر به چشم نمی‌خورد.

در این تحقیق تمام موارد کشت مثبت، با روش PCR نیز مثبت شده‌اند، که حکایت از آن دارد که روش مولکولی به کار گرفته می‌تواند تمام انواع باکتری‌های گرم مثبت و منفی را جدا نماید.

در انجامPCR مشکلات ویژه‌ای به چشم می‌خورند: مثلاً حساسیت آنتی‌بیوتیکی (آنتی‌بیوگرام) عامل باکتریایی مولد منتژیت تعیین نمی‌شود(۷)، همچنین از مهم‌ترین عوامل مداخله‌گر در استفاده از PCR یونیورسال آلودگی نمونه‌هاست که می‌تواند در جریان نمونه‌گیری، استخراج DNA، تهیه مخلوط واکنش PCR، مرحله تکثیری و حتی شناسایی آمپلیکون رخ دهد(۱۵،۶،۵،۲) در مطالعه Corless و همکاران استفاده از مواد مخلوط واکنش فوق خالص و به خصوص آنزیم Taq نوترکیب، بخشی از نتایج مثبت کاذب PCR ترمیم یافته‌اند(۱۶) به ویژه بااستفاده از روش Real time PCR تکثیر ژن 16S rDNA توسط Dreier و همکاران، خطر آلودگی را کم و اختصاصیت تکثیر را فزونی بخشیده است(۱۷). در مطالعات Mohammadi و Dreier مزیت‌های روش Real time تکثیر ژن 16S rDNA نسبت به روش کشت برای فراورده‌های خونی و کنسانتره‌های پلاکتی جهت وجود آلودگی آنها نشان داده شده‌اند(۱۸،۱۶). در مطالعه جاری ضمن جلوگیری کامل ازآلودگی نمونه ها، ازآنزیم فاقد DNA (super Taq) استفاده شده که خود هزینه فرایند را بالا می‌برد از طرفی در این تحقیق از conventional PCR استفاده شده است که قطعا نسبت به روش Real time سخت‌تر بوده و احتمال آلودگی آن بیشتر است. در مطالعه Rosey و همکاران با مقایسه این دو روش PCR با هم ونیز با روش کشت واقعیت فوق به چشم می‌خورد(۱۹). با توجه به تمام این دلایل است که Pandit در مطالعه خود استفاده همزمان کشت CSF و PCR آن به ویژه برای نمونه‌های کشت منفی توصیه کرده است(۴). بالاخره چنانچه باکتری‌های مرده در نمونه مثلاً پس از مصرف آنتی‌بیوتیک مؤثر وجود داشته باشند، نتیجه آزمون PCR می‌تواند به طور کاذب همچنان مثبت باشد.

با توجه به مزایا و معایب خصوصیات کارایی هر دو روش، در حال حاضر نمی‌توان هیچ یک از این دو را به

Archive of SID

www.SID.ir

عنوان تست جامع و استاندارد در نظر گرفت وبر کاربرد همزمان هر دو روش، به ویژه در مواردی که حصول نتیجه سریع مدنظر است و یا ظن به آلوگی نمونه، حضور میکروارگانیسم‌های پرتوقع و دیر رشد و بخصوص مصرف آنتی‌بیوتیک وجود دارد، توصیه می‌شود.

سپاسگزاری

این مطالعه با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی قزوین (قرارداد شماره ۲۸/۲۰/۱۷۴) صورت گرفته است. بدین وسیله از همکاری پرسنل آزمایشگاه‌های بیمارستان‌های دانشگاهی قزوین قدردانی می‌شود.

References

1. Mahon C, Manuselis G, Lehman D, (eds). Text book of Diagnostic Microbiology. 3'rd edition. Missouri, USA: Saunders Elsevier publication; 2006.
2. Xu J, Millar B.C, Moore J.E, Murphy K, Webb H, Fox AJ, et al. Employment of broad-range 16S rRNA PCR to detect aetiological agents of infection from clinical specimens in patients with acute meningitis. Rapid separation of 16S rRNA PCR amplicons without the need of cloning. Appl Microbiology 2003; 94: 197-206.
3. Corless C.E, Guiver M, Borrow R, Edwards Jones V, Fox A.J, kaczmarski E.B. Simultaneous detection of Neisseria meningitides, haemophilus influenzae, and streptococcus pneumonia in suspected cases of meningitis and septicemia using real-time PCR. J Clin Microbiol 2001; 39(4): 1553-1558.
4. Pandid L, Kumar S, Karunasagar I, karanasagar ID. Diagnosis of partially treated culture-negative bacterial meningitis using 16 S rRNA universal primers and restriction endonuclease digestion. J Med Microbiol 2005; 54: 539-542.
5. Lu J, Perng C, Lee S, Wan C. Use of PCR with universal primers and restriction endonuclease digestion for detection and identification of common bacterial pathogens in cerebrospinal fluid. J Clin Microbiol 2000; 38(6): 2076-80.
6. Schurman T, Boer R, Kooistra-smid A.M, Vanzwet A. prospective study of use of PCR amplification and sequencing meningitis of 16S ribosomal DNA from CSF for diagnosis of bacterial meningitis in a clinical setting. J Clin Microbiol 2004; 42(2): 734-740.
7. Nakhjavani F.A, Bonakdar F, Kalani M.T, Kazemi B, Nouri J, Azadi N, et al. Detection of haemophilus influenzae type B in cerebro spinal fluid of suspected children with meningitis by PCR. Med J Islamic Republic of Iran 2005; 19(2): 181-184.
8. Kotilinen P, Jalavi J, Meurman O, Lethonen O, Rintala E, Seppala O, et al. Diagnosis of meningococcal meningitis by broad range bacterial PCR with cerebrospinal fluid. J Clin Microbiol 1998; 36(8): 2205-2209.
9. Jaton K. Development of polymerase chain reaction assay for detection of listeria monocytogenese in clinical cerebrospinal fluid samples. J Clin Microbial 1992; 30(80): 1931-1936.
10. Abdel Salam H.A. Direct PCR assay for detection of Neisseria meningitidis in human cerebrospinal fluid. Folia Microbiol (Praha) 1999; 44(6): 697-702.
11. Lin HW. Use of Universal polymerase chain reaction assay and endonuclease digestion for detection of Neisseria meningitidis. J Microbiol Immunol Infec 2004; 37(6): 371-374.

Archive of SID

www.SID.ir

12. Liu Y. Development and evaluation of 16S rDNA microarray for detecting bacterial pathogens in cerebrospinal fluid. Exp Biol Med (Maywood) 2005; 230(8): 587-591.
13. Saravoltaz L.D, Manzor O, Vandorvelde N, Pawlak J, Belian B. Broad- range bacterial polymerase chain reaction for early detection of bacterial meningitis. Clin Infect Dis 2003; 36: 40-45.
14. Plesis M, Smith A.M, Klugman K.P. Rapid detection of penicillin resistant streptococcus pneumoniae in cerebrospinal fluid by a seminested PCR strategy. J Clin Microbiol 1998; 36(2): 453-457.
15. Millar B.C, Xuj, Moore JE. Risk assessment models and contamination management. J Clin Microbiol 2002, 40: 1575-1580.
16. Corless C.E, Guiver M, Borrow R, Edward-Jones V, Kaczmarski E.B, Fox A.J. Contamination and Sensitivity issues with a real time universal 16S rRNA PCR. J Clin Microbiol 2000; 38(5): 1747-1752.
17. Drieier J, Stormer M, Kleesiek K. Real-time polymerase chain reaction in transfusion medicine: application for detection of bacterial contamination in blood products. Transfus Med Rev 2007; 21(3): 237-254.
18. Mohammadi T, Pietersz R.N,Vandenbroucke C.M, Savelkoul P.H Reesink H.W. Detection of bacteria in platelet concentrates: Comparison of broad-range real-time 16S rDNA polymerase chain reaction and automated culturing. Transfusion 2008; 45(5): 731-736.
19. Rosey A.L, Abachin E, Quesnes C.C, Pejin Z, Glorion C, Berche P, Ferroni A. Development of a broad-range 16S rDNA real-time PCR for the diagnosis of septic arthritis in children. J Microbiol Methods 2007; 68(1): 88-93.

Archive of SID

www.SID.ir