مجله علمی پژوهـشی دانشگاه علوم پزشکی زنجـان
دوره ۱۴، شماره ۵۶، پاییز ۱۳۸۵، صفحات ۱۲ تا ۲۳

مقایسه‌ی آزمون‌های کشت و PCR برای تشخیص عفونت‌های تنفسی مایکوپلاسما پنومونیه

دکتر محمدحسن شاه حسینی*، دکتر مسعود مردانی**، زهرا حسینی***، دکتر حمیدرضا خرم خورشید****،
امیرعباس رحیمی*****، دکتر جلیل وند- یوسفی******

نویسنده‌ی مسئول: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهریار/شهرقدس، گروه میکروبیولوژی shahhosseiny@yahoo.com

دریافت: ۸۵/۱۰/۱۷ پذیرش: ۸۵/۱۲/۲۰

چکیده

زمینه و هدف: *مایکوپلاسما پنومونیه عامل گرفتاری‌های تنفسی مانند گلودرد، فارنژیت، رینیت، تراکئوبرونشیت و هم‌چنین مسئول بیش از بیست درصد موارد پنومونی‌های کسب شده از جامعه است. روش‌های متداول تشخیص مایکوپلاسما پنومونیه دارای محدودیت‌هایی است، بنابراین نیاز به به‌کارگیری روش‌های دقیق دیگر کاملاً احساس می‌گردد. روش‌های مولکولی، از جمله واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) دارای پتانسیل زیادی جهت تشخیص دقیق و سریع این عامل بیماری‌زا بوده و در نتیجه می‌توانند امکان شروع هر چه سریع‌تر درمان آنتی‌بیوتیکی بیماری را فراهم نمایند. در این مطالعه سعی شده است روش کشت و PCR مقایسه شده و یک روش سریع و عملی PCR برای شناسایی مایکوپلاسما پنومونیه طراحی و بررسی شود.*

روش بررسی: *بر روی نمونه‌های کلینیکی ۱۰۰ بیمار که با شکایات تنفسی به بیمارستان مراجعه کرده بودند، کشت و PCR انجام شد. یک روش PCR حساس با استفاده از پرایمرهای P4A و P4B و هدف ژنی P1 cytadhesin ، طراحی و بر روی نمونه‌های سوآپ جمع‌آوری شده از بیماران به‌کار گرفته شد. محصول PCR (۳۴۵ bp) به‌وسیله‌ی روش PCR-Cloning در پلاسمید pTZ57R کلون گردید و جهت تعیین توالی مورد استفاده قرار گرفت.*

یافته‌ها: *همه نمونه‌های کشت مثبت دارای نتیجه‌ی PCR مثبت هم بودند. در ۳۳ نمونه‌ی دیگر که از نظر کشت منفی بودند آزمایش PCR مثبت بود، در نتیجه ۴۳ نمونه از ۱۰۰ نمونه (۴۳درصد) دارای نتیجه‌ی مستقیم مثبت PCR بودند. حد شناسایی سنجش مولکولی حاضر در حد ۱۰ ارگانیسم مایکوپلاسما پنومونیه ارزیابی شد. در عین حال با ۱۱ نمونه مایکوپلاسمای مورد استفاده و همین‌طور ۱۷ گونه‌ی باکتریایی دیگر مورد استفاده در آزمون ویژگی هیچ محصولی تکثیر نگردید.*

نتیجه‌گیری: *این مطالعه دلالت بر این موضوع دارد که PCR یک روش حساس و قابل اعتماد برای تشخیص سریع مایکوپلاسما پنومونیه در نمونه‌های عفونت‌های تنفسی است.*

واژگان کلیدی: مایکوپلاسما پنومونیه، تشخیص، کشت، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

---

* دکترای تخصصی بیوتکنولوژی (فرآورده‌های بیولوژیک)، استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهریار/شهر قدس
** متخصص عفونی، استاد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
*** کارشناس ارشد میکروبیولوژی، مربی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهریار/ شهر قدس
**** متخصص ژنتیک، استادیار دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی
***** کارشناس ارشد ژنتیک، مربی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهریار/ شهر قدس
****** دکترای تخصصی میکروبیولوژی، دانشیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

مایکوپلاسما پنومونیه یکی از عوامل عفونت بخش فوقانی و تحتانی تنفس در انسان بوده و تصویر کلینیکی آن به‌صورت تراکئوبرونشیت کند پیشرونده همراه با بی‌قراری و سرفه‌های خشک است (۱،۲). طیف بیماری‌زایی این باکتری، از شکل‌های ملایم فارنژیت و تراکئوبرونشیت تا موارد پنومونی حاد را شامل می‌شود(۳). مطالعات اپیدمیولوژیک نشان داده است که این باکتری مسئول بیش از ۲۰ درصد پنومونی‌های کسب شده از جامعه می‌باشد(۱،۴). طیف گسترده‌ای از تظاهرات خارج تنفسی مانند عوارض هماتولوژیک، گوارشی، کلیوی، عضلانی- اسکلتی، قلبی- عروقی، ایمونولوژیک، درماتولوژیک و نورولوژیک در ارتباط با این باکتری گزارش شده است(۵). در حال حاضر کشت، روش‌های تشخیص سرولوژیک و تکنیک‌های تکثیر اسیدنوکلئیک سه روش قابل دسترس برای تشخیص روتین عفونت‌های مایکوپلاسما پنومونیه محسوب می‌شوند. اصولاً روش‌های مبتنی بر کشت، تکنیک‌هایی وقت‌گیر با حساسیت نسبتاً پایین و نیازمند امکانات و هم‌چنین تجربه‌ی کافی جهت تفسیر نتایج هستند(۶). روش‌های سرولوژیک هم به دلیل حساسیت نسبتاً کم، واکنش متقاطع و نیاز به سرم‌های فاز حاد و نقاهت روشی ایده‌آل به شمار نمی‌روند(۵،۶). در سال‌های اخیر جهت غلبه بر این مشکلات، روش‌های تکثیر اسید نوکلئیک مانند واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (Polymerase chain reaction [PCR])، توسعه‌ی فراوانی یافته است (۷، ۸). امروزه روش‌های تشخیصی بر اساس PCR به دلیل داشتن حساسیت، ویژگی و دقت بیشتر، روش‌هایی مناسب جهت تشخیص عواملی هم‌چون مایکوپلاسما پنومونیه به شمار می‌روند(۱۸-۹). میزان حساسیت و دقت PCR ، در شناسایی برخی قطعات خاص ژنوم مایکوپلاسما تا حد زیادی به نوع نمونه، روش استخراج DNA ، ژن هدف، پرایمرهای طراحی شده و روش شناسایی محصول بستگی دارد(۶). پرایمرهای طراحی شده عموماً جهت بخش‌های مشترک ژن S rRNA ۱۶ (۱۹)، ژن اپرون ATPase (۲۰)، ژن P1 (۲۱،۲۲،۲۳،۲۴) و یا هدف‌های دیگر مانند ژن فاکتور طویل سازی tuf (۲۵) طراحی شده است. ژن P1 پروتئینی با وزن مولکولی 169 KDa را در باکتری مایکوپلاسما پنومونیه کد می‌کند که نقش مهمی را در شدت بیماری‌زایی این باکتری از جهت چسبیدن به سلول‌های هدف ایفا می‌نماید(۲۶). اگر چه ژن‌های مشابهی در سایر گونه‌های مایکوپلاسما مشاهده می‌شود، ولی بخش‌های به شدت ثابت موجود در توالی ژن P1 مایکوپلاسما پنومونیه، آن را از نظر طراحی پرایمرهای مخصوص گونه، جذاب نموده است (۲۷). هدف مطالعه‌ی حاضر که در سال ۱۳۸۵ در دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهریار انجام گردید، روش کشت و PCR جهت شناسایی مایکوپلاسما پنومونیه در نمونه‌های کلینیکی و بهینه نمودن روش تشخیص کلینیکی است.

روش بررسی

سویه‌های باکتریایی: گونه‌های مولیکوتس به‌کار رفته در این مطالعه عبارتند از: مایکوپلاسما پنومونیه (NCTC 10119)، مایکوپلاسما آرجینینی، مایکوپلاسما هیورینیس، مایکوپلاسما ارال، مایکوپلاسما سینوویه، مایکوپلاسما گالیناروم (رازی ۱۳۵۰و۱۳۴۶)، مایکوپلاسما گالیسپتیکوم (رازی ۱۳۵۵)، مایکوپلاسما اویاپنومونیه (رازی ۱۳۶۴)، مایکوپلاسما آگالاکتیا (رازی ۱۳۴۳)، اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم (رازی ۱۳۶۹) و اکول پلاسما لیدلاوی. به‌علاوه میکروارگانیسم‌های استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس، استرپتوکوکوس پیوژنز، استرپتوکوکوس پنومونیه، باسیلوس سوبتیلیس، باسیلوس میکوئیدس، گونه‌های کورینه باکتریوم، گونه‌های کلاستریدیوم، انتروکوکوس فکالیس، اشریشیاکلی، گونه‌های

Archive of SID

www.SID.ir

سالمونلا، گونه‌های شیگلا، گونه‌های پروتئوس، هلیکوباکتر پیلوری، ساکارومیسس سرویزیه، گونه‌های آسپرژیلوس، کاندیدا آلبیکنس، و هم‌چنین سلول‌های انسانی و موشی از جهت آزمون ویژگی پرایمرهای مورد استفاده در PCR، مورد آزمایش و ارزیابی قرار گرفتند.

نمونه‌های دستگاه تنفس: در این مطالعه از ناحیه‌ی گلو ۱۰۰ بیمار (۴۳درصد مرد و ۵۷ درصد زن) با طیف سنی بین ۳ تا ۸۰ سال، که به علت ابتلا به عفونت‌های تنفسی به بیمارستان میلاد و لقمان حکیم تهران مراجعه و یا بستری شده بودند، به‌وسیله سوآپ نمونه‌گیری به عمل آمد (۲۲،۲۸). سوآپ‌های گرفته شده به لوله‌های ۱/۵ میلی‌لیتر حاوی محیط‌های انتقال فاقد گلوکز اضافه و سریعاً با استفاده از محیط‌های انتقالی به آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشگاه منتقل گردید. در آزمایشگاه، پس از آماده‌سازی نمونه‌های تنفسی، ابتدا آن‌ها را از فیلتر میلی‌پور ۰/۴۵ میکرون عبور داده و سپس از محلول صاف شده با استفاده از تیپ استریل، همزمان به محیط PPLO-agar حاوی گلوکز و آنتی بیوتیک‌های پنی‌سیلین (۲۰۰۰ واحد در میلی‌لیتر)، آمفوتریسینB (۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر)، تلقیح صورت گرفت (۲۹). همه‌ی محیط‌های تلقیح شده در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه گردیدند. پلیت‌ها به مدت سه هفته از روز سوم به بعد از جهت تغییر رنگ و رؤیت کلنی مورد مطالعه قرار گرفتند. محیط‌هایی که در طی کمتر از ۵ روز به رنگ زرد تغییر یافتند، به علت امکان آلودگی با غیر مایکوپلاسماها، از مطالعه خارج شدند و چنان‌چه در طی ۵ تا ۱۲ روز تغییر رنگ در محیط‌ها ظاهر می‌گردید، احتمال کشت مثبت مایکوپلاسما افزایش می‌یافت. با استفاده از بزرگ‌نمایی کم میکروسکوپ کلنی‌ها رؤیت می‌گردید.

استخراج DNA : مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه‌ی صاف‌شده به درون یک لوله‌ی ۱/۵ میلی‌لیتر منتقل و ۵۰ میکرولیتر روغن معدنی استریل روی آن اضافه شد. سپس لوله به مدت ۱۵ دقیقه در دمای جوش حرارت داده شد. بلافاصله بعد از حرارت، لوله‌ها در rpm ۱۴۰۰۰ سانتریفوژ شده و مقدار ۵۰ میکرولیتر از مایع روی سدیمان به یک لوله ی جدید منتقل شد. از سوش‌های باکتریایی مورد استفاده با استفاده از کیت استخراج DNG-Plus (سیناژن)، داکسی ریبونوکلوئیک اسید (deoxyribonucleic acid [DNA]) استخراج گردید. به‌طور خلاصه کشت مایکوپلاسما در مرحله‌ی انتهای فاز لگاریتمی برای ۳۰ دقیقه در rpm ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ شد (سویه های لیوفیلیزه، در یک میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر استریل حل شد و به طور مستقیم و بدون سانتریفوژ کردن وارد مرحله‌ی استخراج گردید). رسوب سلولی حاصل در ۱۰۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر استریل سوسپانسیون گردید. ۵۰۰ میکرولیتر ازمحلول DNG به لوله‌ی حاوی ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتریایی اضافه و بلافاصله ورتکس گردید. لوله‌ی حاوی سوسپانسیون و DNG یا Lysate، ۲۰ ثانیه شدیداً ورتکس گردید. به Lysate ، ۳۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول اضافه وسپس۱۰ بار لوله وارونه گردید. لوله سپس به مدت ۱۰ دقیقه درحرارت اتاق در rpm ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ شد. مایع رویی به آرامی و با وارونه کردن لوله تخلیه شد. با استفاده از سمپلر، مایع باقیمانده برروی رسوب نیز برداشته شد. به رسوب حاصل، ۱ میلی لیتر اتانل ۷۵ درجه اضافه و با ۱۰ مرتبه وارونه کردن لوله، محتویات آن به خوبی مخلوط شد. سپس به مدت ۵ دقیقه در rpm ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ و مایع رویی تخلیه و مجدداً مرحله‌ی فوق تکرار شد. مایع رویی تخلیه و با وارونه کردن لوله بر روی دستمال کاغذی، الکل‌های باقیمانده خارج شد. لوله‌ی حاوی رسوب به مدت ۵ دقیقه درحرارت ۶۵ درجه‌ی سانتی‌گراد، جهت خشک کردن DNA قرار داده شد. رسوب حاصل در ۱۰۰ میکرولیتر آب دیونیزه‌ی استریل، یا جهت نگهداری طولانی در تریس۱۰ میلی‌مولار با پی- اچ (pH) ۸ حل گردید. از سلول‌های انسانی و موشی هم به طریق فوق DNA استخراج

Archive of SID

www.SID.ir

شد. DNA ژنومیک باکتری‌های غیر مایکوپلاسمایی از طریق جوشاندن همراه با دترجنت غیریونی ترایتون ایکس ۱۰۰ (یک هزارم)، بدین طریق به‌دست آمد. یک کلنی از باکتری مورد نظر را در ۵۰ میکرولیتر از آب دوبار تقطیر استریل دیونیزه حاوی ترایتون ایکس ۱۰۰، سوسپانسیون کرده و ۵۰ میکرولیتر روغن معدنی استریل به آن اضافه شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای جوش، حرارت داده شد. بعد از سانتریفوژ در ۱۴۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ و سپس، ۴۰ میکرولیتر از مایع رویی رسوب و زیر روغن، به لوله‌ی جدید منتقل گردید. از این DNA در مراحل بعدی به عنوان الگو استفاده شد.

پرایمر و شرایط PCR : پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه، پرایمرهای مخصوص ژن P1 adhesin مایکوپلاسما پنومونیه (۳۱-۲۹، ۶) است (جدول ۱).

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر DNA مایکوپلاسما پنومونیه.

	Sequence(5'------3')
P4A	5′AGG CTC AGG TCA ATC TGG CGT GGA 3′
P4B	5′GGA TCA AAC AGA TCG GTG ACT GGG T3′

تکنیک تشخیصی PCR هم بر روی نمونه‌های اولیه‌ی صاف شده و هم‌چنین بر روی کلنی‌های رشد یافته بر روی محیط‌کشت (جهت تأیید کشت) انجام گردید. نمونه‌های کشت، با استفاده از یک سوآپ استریل و کشیدن آن به سطح محیط‌های واجد کلنی و انتقال آن به ۲۰۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر استریل و رادیونیزه تهیه، و سپس استخراج DNA به روش جوشاندن انجام گردید. ۵ میکرولیتر از DNA ژنومیک حاصل در مخلوط ۲۵ میکرولیتری PCR، با استفاده از پرایمرهای جلویی و عقبی مخصوص ژن P1 adhesin با غلظت نهایی ۰/۴ میکرومول (یک میکرولیتر از غلظت ده میلی مولار)، ۲/۵ میکرولیتر از بافر PCR (۱۰ X) (سیناژن)، ۱/۵ میلی‌مولار کلرید منیزیم ($MgCl_2$) (از غلظت ۵۰ میلی‌مولار (سیناژن))، ۰/۲ میلی‌مولار مخلوط dNTP (۱۰ میلی‌مولار) (سیناژن) و با استفاده از ۲ واحد آنزیم (۵ واحد در میکرولیتر) Taq DNA Polymerase (سیناژن) تکثیر یافت. چرخه های حرارتی شامل یک سیکل دو دقیقه ای ۹۴ درجه ی سانتی‌گراد، ۴۰ سیکل متوالی (شامل ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه، ۶۵ درجه‌ی سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه ی سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه) و یک سیکل پلیمریزاسیون نهایی ۷۲ درجه ی سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه بود. محصول PCR با سایز مورد نظر ۳۴۵ جفت باز، در کنار سایز مارکر و کنترل مثبت و منفی، برروی ژل آگاروز ۲ درصد و با استفاده از اتیدیوم بروماید و نور UV بررسی گردید.

ساخت کنترل مثبت از طریق PCR-Cloning: عمل کلون کردن قطعه‌ی ۳۴۵ جفت بازی با استفاده از کیت T/A Cloning کمپانی فرمنتانس و در وکتور pTZ57R این کیت، انجام گرفت. محصول PCR مستخرج از ژل مستقیماً برای عمل کلونینگ استفاده شد. با استفاده از محیط C-medium این کیت، سلول‌های مستعد سویه‌ی DH5-alfa باکتری اشریشیاکلی آماده شد. سپس عمل

Archive of SID

www.SID.ir

Ligation با استفاده از کیت مذکور انجام گرفت. مخلوط لایگیشن به مدت چهار ساعت در دمای اتاق (۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد) انکوبه گردید. بعد طی پروتکل کیت، مرحله ی ترانسفورماسیون انجام گردید. کلنی‌های سفید بر روی پلیت حاوی آمپی سیلین (۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) بعلاوه ماده‌ی X-Gal و IPTG انتخاب شدند. کلنی‌های سفید حاوی ژن مورد نظر می‌باشند. سپس به صورت راندوم ۱۰ عدد از کلنی‌های سفید انتخاب گردیده و بر روی پلیت LB agar واجد آمپی‌سیلین کشت خطی داده شد و مجدداً در ۳۷ درجه ی سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید. پس از این مدت یک یا دو کلنی به لوله‌های ۱/۵ میلی‌لیتر حاوی ۵۰ میکرولیتر آب دیونیزه اضافه کرده و یک قطره روغن معدنی استریل به آن افزوده و به شدت ورتکس گردید. سپس درب لوله‌ها با پارافیلم بسته شد و ۱۵ دقیقه در حمام آب جوش قرار داده شدند، تا غشای باکتری‌ها پاره و پلاسمید خارج گردد. لوله‌ها به مدت یک دقیقه در میکروسانتریفوژ با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردیده و سپس از مایع رویی برای PCR استفاده گردید. PCR با مواد و مقادیر ذکر شده قبلی انجام داده شد، و محصول بر روی ژل آگارز ۲ درصد مشاهده گردید. تمامی کلنی‌ها واجد قطعه ی مورد نظر بوده، بنابراین دو عدد از آن ها به نام pSHA345-1 و pSHA345-2 به صورت راندوم انتخاب و با استفاده از روش لیز قلیایی از آن‌ها پلاسمید استخراج و در مرحله‌ی بعد PCR را با استفاده از پلاسمیدهای استخراج شده انجام داده و محصول بر روی ژل آگارز ۲ درصد بررسی گردید. از پلاسمیدهای حاصل به عنوان کنترل مثبت و همین‌طور جهت تعیین توالی استفاده شد.

حساسیت و ویژگی: جهت بررسی حساسیت جفت پرایمرهای مورد استفاده، از دو روش استفاده شد. ۱: تهیه‌ی رقت از سوسپانسیون مایکوپلاسما پنومونیه با واحد کلنی‌ساز (CFU) مشخص، استخراج DNA از رقت‌ها و انجام آزمون PCR؛ ۲: رقیق‌سازی پلاسمید pSHA345-1 و انجام PCR بر روی محلول‌های حاوی مقادیر مشخص از پلاسمید. آزمون ویژگی هم با استفاده از تمام میکروارگانیسم‌های ذکر شده در بخش سویه های باکتریایی و همین‌طور DNA سلول‌های یوکاریوت، موش و انسان انجام شد.

توالی یابی: توالی DNA در جهت جلویی با استفاده از امکانات تعیین توالی اتوماتیک خاتمه‌دهنده رنگی به روش ختم زنجیره‌ی Dideoxy-Chain Termination انجام گردید.

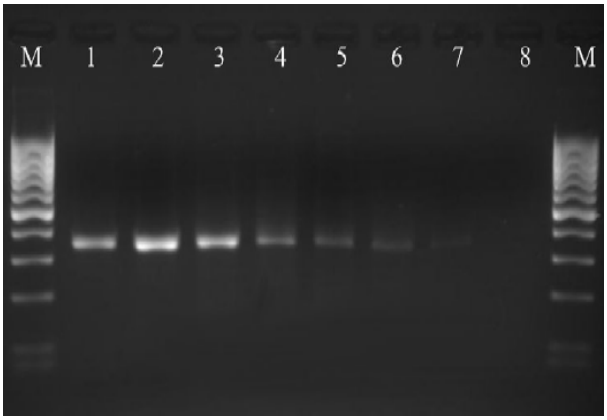
روش‌های آماری: اطلاعات با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی۱۳ تجزیه و تحلیل گردید. آزمون کاپا (Kappa) برای سنجش توافق دو روش کشت و PCR مورد استفاده واقع شد.

یافته ها

جهت بررسی و تأیید ویژگی سنجش PCR مخصوص گونه‌ی مایکوپلاسما پنومونیه، قطعه‌ی ۳۴۵ جفت بازی در پلاسمید pTZ57R و باکتری اشریشیاکلی DH5-alfa کلون و پلاسمیدهای pSHA345-1 وpSHA345-2 ساخته شد (شکل ۱). از این پلاسمید حاوی ژن مورد نظر، به‌عنوان کنترل مثبت (شکل ۲ ، ۱) و همین‌طور جهت تعیین توالی استفاده گردید. مقایسه‌ی توالی حاصل با سکانس‌های موجود از طریق برنامه‌ی BLAST، مطابقت حدود ۱۰۰درصد را نشان داد. از طریق رقت سازی پلاسمید حاوی ژن، حساسیت تست و به عبارت دیگر حد تشخیص در حد ۱۰ کپی در نمونه‌ی مورد آزمایش به‌دست آمد. تعیین حساسیت از طریق رقیق‌سازی کشت مایکوپلاسما پنومونیه با واحد سازنده‌ی کلنی مشخص هم انجام شد و نتایج مشابهی به‌دست آمد (شکل ۱).

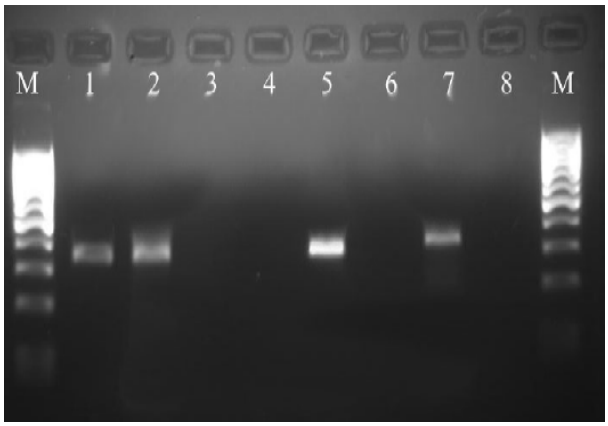
Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱: آزمون حساسیت PCR با استفاده از نمونه‌های کلنی شمارش شده مایکوپلاسما پنومونیه (CFU مشخص). ستون M: سایز مارکر، ستون۱: کنترل مثبت، ستون۲ الی ۷ حاوی نمونه‌های مشخص و به ترتیب ستون ۲ (۳۱۲۵۰ CFU)، ستون ۳ (۶۲۵۰ CFU)، ستون ۴ (۱۲۵۰ CFU)، ستون ۵ (۲۵۰ CFU)، ستون ۶ (۵۰ CFU)، ستون ۷ (۱۰ CFU)، ستون ۸: کنترل منفی (بافر TBE 0.5X).

جهت تشخیص عفونت مایکوپلاسمایی در نمونه‌های تنفسی، از پرایمرهای مخصوص گونه استفاده نمودیم. آزمون PCR مثبت در ۴۳ مورد از ۱۰۰ نمونه‌ی آزمایش شده (۴۳درصد)، از طریق تکثیر قطعه‌ی صحیح، تشخیص داده شد (شکل ۲). در ۱۰۰ نمونه‌ی مورد آزمایش، ۱۰ مورد کشت مثبت به‌دست آمد. همه‌ی نمونه های کشت مثبت دارای نتیجه PCR مثبت هم بودند.۳۳ نمونه‌ی دیگر وجود داشت که با روش PCR مثبت بودند ولی نتیجه‌ی کشت آن‌ها منفی بود. در آزمون ویژگی پرایمرهای P4A و P4B ، هیچ محصول ناخواسته‌ای (۳۴۵ bp) با DNA باکتری‌های مایکوپلاسمایی غیر از مایکوپلاسما پنومونیه، و همین‌طور باکتری‌های غیرمایکوپلاسمایی مانند استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس، استرپتوکوکوس پیوژنز، استرپتوکوکوس پنومونیه، باسیلوس سوبتیلیس، باسیلوس میکوئیدس، گونه‌های کورینه باکتریوم، گونه‌های کلاستریدیوم، انتروکوکوس فکالیس، اشریشیا کلی، گونه‌های سالمونلا، گونه‌های شیگلا، گونه‌های پروتئوس، هلیکوباکتر پیلوری، و همین‌طور DNA انسان و موش و یوکاریوت‌های پست مانند ساکارومیسس سرویزیه، گونه‌های آسپرژیلوس، کاندیدا آلبیکنس، دیده نشد.



شکل ۲: الکتروفورز ژل آگارز محصول PCR نمونه‌های بیماران با استفاده از پرایمرهای مخصوص گونه. ستون M: سایز مارکر، ستون۱: کنترل مثبت، ستون۲ ، ۵ و ۷: نمونه‌های بیماران که PCR آن ها مثبت شده است، ستون ۳ و ۴ و ۶ : نمونه‌های بیماران که PCR آن منفی شده است، ستون ۸ : کنترل منفی (بافر TBE 0.5X).

بحث

یکی از عواملی که موجب کاهش مورتالیتی، موربیدیتی و نیز کاهش هزینه‌های بیماری‌های عفونی می‌گردد، تشخیص سریع و دقیق می‌باشد. روش‌های سنتی مبتنی بر کشت گرچه در مواردی هنوز به عنوان استاندارد طلایی مطرح است ولی عموماً ویژگی‌های یک روش مطلوب در شناسایی میکروارگانیسم‌ها و از جمله مایکوپلاسما پنومونیه را ندارند (۷، ۸). در مطالعات مشابه که از تکنیک کشت به همراه روش‌های دیگر مثل روش PCR استفاده شده، نشان داده شده است که تکنیک کشت وقت‌گیر و دارای نتایج منفی کاذب زیادی می باشد (۱،۳۲). در مواردی هم که درمان

Archive of SID

www.SID.ir

آنتی‌بیوتیکی پیش از نمونه‌گیری انجام شود، نتیجه ی کشت منفی گزارش می‌گردد. لذا برای تعیین هویت مایکوپلاسما پنومونیه، روش کشت دارای نتایج ضعیفی بوده و بنابراین کاربرد روش های مولکولی هم‌چون PCR در اولویت است.

در این مطالعه، روش PCR بر پایه‌ی پرایمرهای مخصوص گونه‌ی مایکوپلاسما پنومونیه و هدف ژنی P1 Cytadhesin طراحی و اجرا شده است. بر این مبنا با بررسی توالی پرایمرهای مایکوپلاسما و مقایسه‌ی آن‌ها با توالی‌های دیگر پروکاریوت‌ها، پرایمرهای P4A و P4B انتخاب شدند (۲۹). در این بررسی، مناسب بودن این پرایمرها جهت تشخیص مایکوپلاسما پنومونیه در نمونه‌های بالینی ثابت گردید. شرایط بهینه شده‌ی این مطالعه صرفاً موجب تولید محصول اختصاصی با درجه‌ی بالایی از ویژگی و حساسیت و بدون هیچ محصول ناخواسته‌ای بمانند مطالعه‌ی شارما (۲۹)، کادیوکس(۳۰) و تانگ (۳۱) گردید.

اگر چه تعداد نمونه‌ها در این مطالعه زیاد نمی‌باشد ولی با به‌کار بردن تست PCR، موفق به شناسایی مایکوپلاسما در حدود ۴۳ درصد نمونه‌ها به روش مولکولی، و صرفاً در۱۰ درصد نمونه‌ها به روش کشت شدیم. این اعداد از لحاظ آماری کاملاً معنی‌دار و دارای اختلاف زیادی می‌باشند. در این بررسی میزان تعداد نمونه‌های PCR مثبت ۴/۳ برابر نتایج کشت بود. در مطالعه وارینگ (۲۲) هم تعداد نمونه‌های PCR مثبت تقریبا ۳/۵ برابر بیشتر از نمونه های کشت نشان داده شد. در مطالعه ابل- هورن (۳۲) هم تعداد نمونه‌های PCR مثبت، ۳ برابر نمونه‌های کشت مثبت به دست آمد. در بررسی حاضر هم مشخص شد که PCR حداقل ۴ برابر حساس‌تر از روش کشت می‌باشد. با آزمون کاپا (Kappa) یا اندازه‌گیری توافق، شاخص به‌دست آمده ۰/۲۵ است. با توجه به این‌که این عدد کمتر از ۰/۴ می باشد بیان‌گر توافق ضعیف بین روش کشت و PCR است. از این رو عملاً در تصمیم‌گیری‌های بالینی استفاده از روش کشت جهت تشخیص مایکوپلاسما پنومونیه، توصیه نمی‌شود.

از مسایل مهم در تشخیص مولکولی مایکوپلاسما پنومونیه می‌توان به جنبه‌های تکنیکی هم‌چون نحوه‌ی جمع‌آوری نمونه، روش انتقال و پردازش نمونه، انتخاب ژن هدف و پروتکل تکثیری، اهمیت کنترل کیفی (نتایج منفی و مثبت کاذب) و معتبرسازی تکنیک (۶) اشاره نمود. نمونه‌هایی که تا به حال در مطالعات مختلف جهت شناسایی مایکوپلاسما پنومونیه مورد استفاده واقع شده عبارتند از: نمونه‌ی خلط و لاواژ برونکوآلوالار (BAL)، سوآپ گلو و نازوفارنژ، آسپیراسیون نازوفارنژ، آسپیراسیون تراکئال، مایع پلور، آسپیراسیون ترانس توراسیک. در یک مطالعه، نمونه های سوآپ نازوفارنژیال و گلو جهت تشخیص مایکوپلاسما پنومونیه مورد مقایسه قرار گرفته و نتیجه‌گیری شده که سوآپ گلو از ارزش تشخیصی بالاتری نسبت به سوآپ نازوفارنژ برخوردار است (۲۸). هندا و همکارانش نیز سه نمونه خلط، BAL و سواپ‌های گلو را با تکنیک Capillary PCR مقایسه کرده‌اند و بالاترین جواب مثبت را با نمونه‌ی سوآپ‌های گلو گرفته‌اند (۲۰). در مطالعه‌ی حاضر نیز از سوآپ گلو به عنوان نمونه استفاده شد.

روش‌های مختلف استخراج DNA با یا بدون تیمار نمونه توسط محققین مختلف توضیح داده شده است. برخی از این روش‌های به‌کار رفته عبارتند از: ۱: رقیق کردن نمونه با سدیم کلراید ۰/۹درصد، اضافه کردن سدیم دودسیل سولفات(SDS)، استخراج با فنل/کلروفرم و رسوب با استات سدیم و اتانول (۳۳)، ۲: پیش تیمار با پروتیئناز K، اضافه کردن فنل/کلروفرم و رسوب با اتانول (۳۴)، ۳: تیمار با اسپوتازایم (Sputazyme) و هضم با پروتئیناز K (۲۰)، ۴: انکوباسیون با Chelex و سدیم آزاید (۳۵)، ۵: تیمار با سونیکاسیون (امواج اولتراسوند) و یا جوشاندن(۳۶)، ۶: استخراج با فنل/کلروفرم/ ایزوآمیل الکل و سپس استخراج با اتر(۳۷) و ۷: استخراج با فنل/کلروفرم و رسوب به‌وسیله‌ی

Archive of SID

www.SID.ir

استات سدیم یا سدیم کلراید(۱۶). در مطالعه‌ی حاضر از روش جوشاندن ساده در مورد نمونه‌های بالینی با نتایج مطلوب استفاده گردید. روش‌های استخراج با استفاده از کیت‌های تجارتی توسط محققینی مانند گنارپ(۲۸)، تانگ(۳۱) و گروندهال(۳۳) استفاده شده است. مطالعاتی که در آن، به مقایسه‌ی روش‌های مختلف استخراج DNA مایکوپلاسما پنومونیه در تشخیص مولکولی پرداخته‌اند نادر است (۳۲). بر اساس نتایج ابل- هورن، تکنیک استخراج DNA با فنل/کلروفرم مستلزم صرف زمان زیاد و کاهش حساسیت است و همین‌طور بر اساس نتایج حاصله اؤ تحقیق یون(۳۸)، روش یخ زدن/ جوشاندن جهت تهیه ی DNA مایکوپلاسما پنومونیه پیشنهاد گردیده‌است.

بخش‌های مختلفی از ژنوم مایکوپلاسما پنومونیه مانند ژن 16 S rRNA (۹،۱۶،۱۹)، ژن P1 Adhesin (۴۱-۳۹ ،۲۹،۳۱،۳۶، ۲۱،۲۲،۲۴،۲۵)، و ژن tuf (۲۳) جهت تعیین هویت آن به‌وسیله ی PCR و تحت پروتکل‌ها و تکنیک های مختلف، مورد استفاده واقع شده است. در مطالعه‌ی یون (۳۸)، پرایمرهای ژن P1 Adhesin حساس‌تر از پرایمرهای 16 S rRNA ارزیابی شده است که شاید علت این امر وجود کپی‌های متعدد ژن P1-Cytadhesin باشد. در این مطالعه هم به‌دلیل ویژه بودن و همین‌طور توالی ثابت ژن P1 ، از آن به عنوان هدف تکثیر استفاده گردید. مقایسه‌ی روش‌های مختلف PCR به‌دلایل: ۱: اختلاف در جمع آوری نمونه، ۲: در روش‌های استخراج، ۳: حجم نمونه، ۴: ژن هدف، ۵ : پرایمر، ۶ : پارامترهای سیکل حرارتی، ۷ : روش شناسایی، و ۸ : اختلاف در انتقال نمونه‌ها، دارای مشکلات خاص خود می‌باشد. به علاوه، اختلافات زیادی در واحدهای به‌کار رفته در اندازه‌گیری حدود حساسیت روش‌ها، به چشم می‌خورد. به این معنی که در برخی مطالعات، واحد سازنده ی کلنی (CFU)، در برخی واحد تغییر رنگ (Color Changing Units- CCU) و در برخی دیگر تعداد سلول یا مقدار DNA مورد استفاده واقع شده و حدود این واحدها هم متغیر تعریف شده است (۶). بنابراین فقدان یک روش ثابت برای ارزیابی متدهای مختلف به‌کار رفته، مقایسه بین آن‌ها را مشکل کرده است. درنتیجه، نیاز به یک روش استاندارد و حساس جهت ارزیابی روش‌های مختلف، کاملاً احساس می‌شود. با وجود مراقبت‌های زیاد و فضاسازی مناسب جهت تکنیک‌های تکثیری هم‌چون PCR ، باز امکان آلودگی با DNA در سیستم تشخیص مولکولی وجود دارد که درنتیجه باعث پاسخ مثبت کاذب می‌گردد. بنابراین کاربست کنترل‌های مناسب (کنترل مثبت، منفی و یا نوعاً کنترل درونی) در مراحل مختلف استخراج DNA ، تکثیر و مرحله‌ی تشخیص، کمک شایانی به کاهش آلودگی و نشان دادن آن می‌نماید (۷، ۸).

مقایسه‌های بین لابراتواری نیازمند کنترل کیفی در تکنیک‌های تکثیر اسیدنوکلئیک در شرایط آزمایشگاه می‌باشد. هدف مطالعه‌ی اورسی(۳۹) در سال ۲۰۰۳، ارزیابی کارآیی چهار سنجش متفاوت در شناسایی مایکوپلاسما پنومونیه به‌وسیله‌ی PCR در سه لابراتوار از طریق بررسی DNA استخراجی از نمونه‌های تنفسی بود. نتایج مثبت کاذب PCR در همه‌ی سه لابراتوار شرکت کننده در این مطالعه، ثبت گردید. در مطالعه دیگری که به‌وسیله یون(۳۸) انجام شد آلودگی و نتایج مثبت کاذب به تکرر مشاهده گردید. این آلودگی‌ها عمدتاً ناشی از نمونه‌های به‌شدت مثبت و همین‌طور نمونه‌های PCR مثبت قبلی بوده است. ابل- هورن(۳۲) به‌کارگیری تکنیک Nested-PCR را همراه با افزایش حساسیت و ویژگی و همین‌طور ریسک بیشتر آلودگی دانست. برای حل مشکل آلودگی، فضاسازی مناسب امری ضروری است که باعث کاهش نتایج مثبت کاذب می گردد. در این بررسی سعی شد با فضاسازی مناسب و به‌کارگیری تجهیزات مقتضی هر بخش،

Archive of SID

www.SID.ir

ریسک آلودگی و خصوصاً مثبت‌های کاذب را با توجه به کنترل‌های مثبت و منفی به صفر نزدیک کنیم.

نتیجه گیری

به‌طورکلی می‌توان گفت روش‌های کلاسیک تشخیصی، به‌دلایل محدودیت‌های ذاتی (صرف وقت زیاد، حساسیت کم، نیاز به مهارت و تجربه زیاد و همین‌طور مراحل دشوار و پرزحمت) فاقد معیارهای یک روش ایده‌آل جهت شناسایی مایکوپلاسما پنومونیه است. ولی روش‌های مولکولی هم‌چون روش‌های تکثیر اسیدنوکلئیک در شرایط آزمایشگاه، به دلیل پتانسیل بالقوه و بالفعل، کاربرد فراوانی در تشخیص عواملی هم چون مایکوپلاسماها دارند. نتایج این مطالعه به‌طور روشنی دلالت بر این نکته دارد که سنجش PCR بر مبنای سکانس‌های ژن P1 یک تکنیک ارزشمند و قابل اعتماد جهت شناسایی مایکوپلاسما پنومونیه در بیماری‌های تنفسی است.

تقدیر و تشکر

از خانم فاطمه اخلاقی، دکتر محسن لطفی و خانم سهیلا مرادی از موسسه رازی بخش مدیریت کنترل کیفی و میکروب‌شناسی برای در اختیار گذاشتن سوش‌های مایکوپلاسما، آقای دکتر کورش کمالی جهت مشاوره‌های آماری (دستیار تخصصی گروه اپیدمیولوژی و آمار زیستی دانشگاه علوم پزشکی تهران)، از دکتر سیروس زینلی (معاون پژوهشی پاستور) جهت مشاوره و کمک‌های علمی، دکتر شکرا... محمدی محمودآبادی(بیمارستان میلاد) جهت تهیه‌ی نمونه و آقای سید مهدی تهرانی جهت تایپ و امور کامپیوتر تقدیر و تشکر به‌عمل می‌آید.

منابع

1- Waiters KB, Talkington DF. Mycoplasma pneumoniae and its role as a human pathogen. ***Clin Microbiol Rev.*** 2004; 17(4): 697- 728.

2- Clyde W, Jr A. Clinical overview of typical Mycoplasma pneumoniae infections. ***Clin Infect Dis.*** 1993; 17(supple.1): S32- S6.

3- Jacobs E. Mycoplasma infections of the human respiratory tract. ***Wien Klin Wochenschr.*** 1997; 109: 574- 7.

4- Layani-Milon MP, Gras I, Valette M, Luciani J, Stagnara J, Aymard M. Incidence of upper respiratory tract Mycoplasma pneumoniae infections among outpatients in Rhone-Alpes, France, during five successive winter periods. ***J Clin Microbiol.*** 1999; 37: 1721- 6.

5- McMillan JA. Mycoplasma pneumoniae infection in pediatrics. ***Semin Pediatr Infect Dis.*** 1998; 9: 112- 9.

6- loens K, Uris D, Goossens H, Ieven M. Molecular diagnosis of Mycoplasma pneumoniae respiratory tract infections. ***J Clin Microbiol.*** 2003; 41: 4915- 23.

Archive of SID
www.SID.ir

۷- شاه حسینی محمد حسن. ***واکنش زنجیره‌ای پلیمراز***. چاپ اول. تهران: دانشگاه آزاد اسلامی، ۱۳۸۴، صفحات۲۵-۱.

۸- شاه حسینی محمد حسن. ***واکنش زنجیره‌ای پلیمراز***. چاپ اول. تهران: دانشگاه آزاد اسلامی، ۱۳۸۴، صفحات۱۰۱-۹۳.

9- Van-kuppeveld FJ, Van-der-logt JT, Angulo AF, et al. Genus- and species-specific identification of Mycoplasmas by 16S rRNA amplification. ***Appl Environ Microbiol.*** 1992; 58: 2606- 15.

10- Yamazaki T, Narita M, Sasaki N, Kenri T, Arakawa Y, Sasaki T. Comparison of PCR for sputum samples obtained by induced cough and serological tests for diagnosis of Mycoplasma pneumoniae infection in children. ***Clin Vac Immunol.*** 2006; 13(6): 708-10.

11- Pitcher D, Chalker VJ, Sheppard C, George RC, Harrison TG. Real-time detection of Mycoplasma pneumoniae in respiratory samples with an internal processing control. ***J Med Microbiol.*** 2006; 55: 149-55.

12- Dumke R, Luck PC, Noppen C, Schaefer C, Baum HV, Marre R, Jacobes E. Culture-independent molecular subtyping of Mycoplasma pneumoniae in clinical samples. ***J Clin Microbiol.*** 2006: 44(7): 2567-70.

13- Morozumi M, Nakayama E, Iwata S, Aoki Y, Hasegawa K, Kobayashi R. Simultaneous detection of pathogens in clinical samples from patients with community-acqured pneumonia by real-time PCR with pathogen specific molecular beacon probes. ***J Clin Microbiol.*** 2006; 44(4): 1440-6.

14- Beersma MFC, Dirven K, Dam AP, Templeton KE, Claas ECJ, Goossens H. Evaluation of 12 commercial tests and the complement fixation test for Mycoplasma pneumoniae-specific immunoglobulin G(IgG) and IgM antibodies, with PCR used as the gold standard. ***J Clin Microbiol.*** 2005; 43(5): 2277-85.

15- Shuvy M, Rav-Acha M, Izhar U, Ron M, Nir-Paz R. Massive empyema caused by Mycoplasma pneumoniae in an adult; a case report. ***BMC Infect Dis.*** 2006; 6(18): 1- 4.

16- Falguera M, Nogues A, Ruiz-Gonzales A, Garcia M, Puig T. Detection of Mycoplasma pneumoniae by Polymerase chain reaction in lung aspirates from patients with community-acquired pneumonia. ***Chest.*** 1996; 110: 972- 6.

17- Khanna M, Fan J, Pehler-Harrington K, Waters C, Douglass P. The pneumoplex assays, a multiplex PCR-enzyme hybridization assay that allows simultaneous detection of five organisms, Mycoplasma pneumonia, Chlamydia(Chlamydophila) pneumoniae, Legionella pneumophila, legionella micdadei, and Bordetella pertussis, and its real-time counterpart. ***J Clin Microbiol.*** 2005; 43(2): 565- 71.

18- Ginevra C, Barranger C, Ros A, et al. Development and evaluation of Chlamylege, a new commercial test allowing simultaneous detection and identification of Legionella, Chlamydophila pneumoniae, and Mycoplasma pneumoniae in clinical respiratory specimens by multiplex PCR. ***J Clin Microbiol.*** 2005; 43(7): 3247-54.

Archive of SID

www.SID.ir

19- Loens K, Ursi D, Ieven M, et al. Detection of Mycoplasma pneumoniae in spiked clinical samples by nucleic acid sequence based amplification. ***J Clin Microbiol.*** 2002; 40: 1339-45.

20- Honda J, Yano T, Kusaba M, et al. Clinical use of capillary PCR to diagnosis Mycoplasma pneumoniae**.** ***J Clin Microbiol.*** 2000; 38: 1382- 4.

21- Welti M, Jaton K, Altwegg M, Sahli R, Wenger A, Bille J. Development of a multiplex real time quantitative PCR assay to detect Chlamydia pneumoniae, Legionella pneumophila and Mycoplasma pneumoniae in respiratory tract specimens. ***Diagn Microbiol Infect Dis.*** 2003; 45: 85-95.

22- Waring AL, Halse TA, Csiza CK, Carlyn CJ, Arruda-Musser K, limburger RJ. Development of a genomic-based PCR assay for detection of Mycoplasma pneumoniae in a large outbreak in new york state. ***J Clin Microbiol 2001.*** 39: 1385- 90.

23- Nour M, Trabelsi A, Maatouk N, Hammami M. Amplification of P1 and 16S rRNA genes by nested PCR for detection of Mycoplasma pneumoniae in paediatric patients. ***Pathol Biol.*** 2005; 53: 9- 14.

24- Miyashita N, Saito A, Kohno S, et al. Multiplex PCR for the simultaneous detection of Chlamydia pneumoniae, Mycoplasma pneumoniae and Legionella pneumoniae in community-acquired pneumonia. CAP Study Group. ***Respir Med.*** 2004; 98: 542- 50.

25- Luneberg E, Jensen JS, Frosch M. Detection of Mycoplasma pneumoniae by polymerase chain reaction and nonradioactive hybridization in microtitre plate. ***J Clin Microbiol.*** 1993; 31: 1088-94.

26- Svenstrup HF, Nielsen PK, Drasbek M, Birkelund S, Christiansen G. Adhesin and inhibition assay of Mycoplasma genitalium and M. pneumoniae by immunofluorescence microscopy. ***J Med Microbiol.*** 2002; 51: 361- 73.

27- Su CJ, Tryon VV, Baseman JB. Cloning and sequence analysis of cytadhesin P1 gene from Mycoplasma pneumoniae. ***Infect Immun.*** 1987; 55: 3023-3029.

28- Gnarp J, Lunback A, Sundelof B. Comparison of nasopharyngeal and throat swabs for the detection of Chlamydia pneumoniae and Mycoplasma pneumoniae by polymerase chain reaction. ***Scan J Infect Dis.*** 1997; Suppl 104: 11-12.

29- SharmaS, BrousseauR, KasatiyaS. Detection and confirmation of Mycoplasma pneumoniae in urogenital specimens by PCR. ***J Clin Microbiol.*** 1998; 36(1): 277-80.

30- Cadieux N, Lebek P, Brousseau R. Use of triplex polymerse chain reaction for the detection and differentiation of mycoplasma pneumoniae and Mycoplasma genitalium in the presence of human DNA. ***J Gen Microbiol.*** 1993; 139: 2431-7.

31- Tong CYW, Donnelly C, Harvey G, Stillis M. Multiplex polymerase chain reaction for the simultaneous detection of Mycoplasma pneumoniae and Chlamydia psittaci in respiratory samples**.** ***J Clin Pathol.*** 1999; 52: 257-63.

Archive of SID

www.SID.ir

32- Abele-Horn M, Busch U, Nitschko H, et al. Molecular approaches to diagnosis of pulmonary diseases due to Mycoplasma pneumoniae. ***J Clin Microbiol.*** 1998; 36: 548-51.

33- Grondhal B, Puppe W, Kuhne I, Weigl JA, Schmitt HJ. Rapid identification of nine microorganisms causing acute respiratory tract infections by single tube multiplex reverse transcription PCR: feasibility study. ***J Clin Microbiol.*** 1999; 37: 1-7.

34- Corsaro D, Valassina M, Venditti D, Venard V, Le Faou A, Valensin PE. Multiplex PCR for rapid and differential diagnosis of Mycoplasma pneumoniae and Chlamydia pneumoniae in respiratory infections. ***Diagn Microbiol Infect Dis.*** 1999; 35: 105-8.

35- Kessler HH, Dodge DE, Pierer K, et al. Rapid detection of Mycoplasma pneumoniae by an assay based on PCR and probe hybridization in a nonradioactive microwell plate format. ***J Clin Microbiol.*** 1997; 35: 1592-94.

36- Buck GE, OHåra LC, Summersgill JT.Rapid, sensitive detection of Mycoplasma pneumoniae in simulated clinical specimens by DNA amplification. ***J Clin Microbiol.*** 1992; 30: 3280- 3.

37- Waries ME, Toikka P, Saarinen T, et al. Diagnosis of Mycoplasma pneumoniae pneumonia in children. ***J Clin Microbiol.*** 1998; 36: 3155- 9.

38-Ieven M, Ursi D, Van Bever H, Quint W, Niesters HG, Goossens H. Detection of Mycoplasma pneumoniae by two polymerase chain reactions and role of M.pneumoniae in acute respiratory tract infections in pediatric patients. ***J Infect Dis.*** 1996; 173: 1445- 52.

39- Ursi D, Ieven M, Noordhoek GT, Ritzler M, Zandleven H, Altwegg M. An interlaboratory comparison for the detection of Mycoplasma pneumoniae in respiratory samples by the polymerase chain reaction. ***J Microbiol Methods.*** 2003; 53: 289-94.

40- Leng Z, Kenny GE, Roberts MC.Evaluation of the detection limits of PCR for identification of Mycoplasma pneumoniae in clinical samples. ***Mol Cell Probes.*** 1994; 8: 125-30.

41- De Barbeyrac B, Bernet-Poggi C, Febrer F, Renaudin H, Dupon M, Bebear C. Detection of Mycoplasma pneumoniae and mycoplasma genitalium in clinical samples by polymerase chain reaction. ***Clin Infect Dis.*** 1993; 17(Suppl. 1): S83- 9.

Archive of SID

www.SID.ir