

شناسایی مولکولی همزمان نیسریا مننژیتیدس و هموفیلوس آنفولانزا

مجتبی سعادت^{۱*}، شهرام نظریان^۲، بابک براتی^۳، حسین مهدی زاده^۴، هادی شیرزاده^۵، مجید صادقی زاده^۶، عباس موسی پور^۷

- ۱- دانشیار، گروه علوم زیستی، دانشگاه امام حسین (ع)، تهران، ایران
- ۲- کارشناس ارشد، گروه علوم زیستی، دانشگاه امام حسین (ع)، تهران، ایران
- ۳- کارشناس ارشد، گروه علوم زیستی، دانشگاه امام حسین (ع)، تهران، ایران
- ۴- کارشناس ارشد، گروه علوم زیستی، دانشگاه امام حسین (ع)، تهران، ایران
- ۵- دانشجوی دکتری، گروه علوم زیستی، دانشگاه امام حسین (ع)، تهران، ایران
- ۶- دانشیار، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۷- دانشجوی دکتری، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

پذیرش مقاله: ۸۷/۹/۱۳

دریافت مقاله: ۸۷/۴/۱۹

چکیده

هدف: مننژیت باکتریایی یکی از عفونت‌های جدی و گاهی کشنده است که روی سیستم اعصاب مرکزی تأثیر می‌گذارد. دانستن علت مننژیت ایجاد شده توسط عوامل ویروسی یا باکتریایی، به دلیل تفاوت در شدت بیماری و نیز درمان آن از اهمیت خاصی برخوردار است زیرا آنتی‌بیوتیک‌ها می‌توانند مانع از گسترش بعضی از این عوامل در بین مردم شوند. نیسریا مننژیتیدس و هموفیلوس آنفولانزا دو عامل مهم بیماری‌زا هستند که در ایجاد مننژیت حاد باکتریایی دخالت دارند.

روش‌های مختلفی برای شناسایی نیسریا مننژیتیدس و هموفیلوس آنفولانزا استفاده شده است، اما علاوه بر طولانی شدن نیاز به روش‌های حساس‌تری برای شناسایی این بیماری‌ها می‌باشد؛ بنابراین زمان آزمایش از حساسیت کمتری برخوردار بوده و انجام آن با مشکلاتی همراه است.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق برای شناسایی هموفیلوس آنفولانزا و نیسریا مننژیتیدس از روش Multiplex PCR (mPCR) استفاده شد. تأیید اولیه این زیرگونه‌ها به روش بیوشیمیایی صورت پذیرفت. به منظور شناسایی با استفاده از واکنش mPCR، دو جفت آغازگر اختصاصی ژن *lic-1* برای هموفیلوس آنفولانزا و ژن *opa* برای نیسریا مننژیتیدس طراحی شد.

نتایج: قطعه DNA تکثیر یافته برای هموفیلوس آنفولانزا ۱۵۰ جفت‌باز و برای نیسریا مننژیتیدس ۳۲۰ جفت‌باز بود. استرپتوکوکوس نمونیا به عنوان کنترل منفی استفاده شد و نتایج PCR آن با آغازگر طراحی شده منفی بود.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که PCR خصوصاً زمانی که نتایج رنگ‌آمیزی، کشت باکتری یا شناسایی آنتی‌ژن منفی بوده یا نتوان به‌طور قطعی نتایج آن‌ها را تأیید نمود، یک تکنیک تکمیلی مفید برای تشخیص می‌باشد.

کلیدواژگان: شناسایی، نیسریا مننژیتیدس، هموفیلوس آنفولانزا، Multiplex PCR.

۱- مقدمه

را تحت تأثیر قرار می‌دهد. اگر چه این عفونت در موارد درمان نشده یا درمان نامناسب با مرگ و میر بالایی همراه است ولی

مننژیت باکتریایی عفونت جدی و گاهی کشنده است که سیستم اعصاب مرکزی (Central Nervous System: CNS)

* نشانی مکاتبه: تهران، دانشگاه امام حسین (ع)، گروه علوم زیستی.

Email: saadati_m@yahoo.com

مرگ و میر ناشی از این بیماری را به مقدار زیادی کاهش داده است [۳-۱].

دو عامل باکتریایی نیسریا مننژیتیدس (*Neisseria meningitidis*) و هموفیلوس آنفولانزا (*Haemophilus influenzae*) جزء مهم‌ترین عوامل ایجادکننده مننژیت است و تشخیص آن‌ها با آزمون‌های بیوشیمیایی، سیتولوژی و کشت مایع مغزی-نخاعی (Cerebrospinal fluid: CSF) انجام می‌گیرد که زمان‌بر بوده و گاهی تا ۳۶ ساعت به طول می‌انجامد این در حالی است که تشخیص عامل مننژیت در پی مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها تا ۳۰ درصد کاهش می‌یابد [۴-۶]. بسیاری از محققین تلاش نموده‌اند تا روش‌های سریع و دقیقی را برای شناسایی عوامل ایجادکننده مننژیت با استفاده از روش‌های ایمونولوژی ارائه دهند، هر چند این روش‌ها به تنهایی یا با هم به طور کامل رضایت‌بخش نبوده است [۷، ۸]. عدم شناسایی دقیق و به موقع عامل بیماری و نیز مصرف آنتی‌بیوتیک نامناسب می‌تواند مرگ افراد مبتلا را در پی داشته باشد. این در حالی است که در بیماران مبتلا به مننژیت، بین تأخیر زمانی بیش از ۶ ساعت در تجویز آنتی‌بیوتیک و میزان مرگ و میر ارتباط مستقیم وجود دارد. نظر به اهمیت تشخیص سریع و دقیق عامل مننژیت، استفاده از روش‌های مولکولی از جمله PCR برای شناسایی عامل مننژیت در سال‌های اخیر رو به افزایش بوده است [۹، ۱۰]. در تحقیقی که توسط بیرتلس (Birtles) و همکارانش در سال ۲۰۰۵ انجام شد نشان دادند که در بیش از ۴۰ درصد عفونت‌های ناشی از نیسریا مننژیتیدس که با استفاده از PCR مورد تأیید قرار گرفته، میکروارگانیزم‌های دیگری از این نمونه‌ها جدا نشده است که دلالت بر حساسیت این روش دارد [۱۱]. این روش علاوه بر کمک به تشخیص سریع، دارای اختصاصیت و حساسیت زیاد بوده و می‌تواند به‌طور همزمان نسبت به شناسایی دو یا چند عامل اقدام نمود.

هدف از این تحقیق شناسایی هم‌زمان دو عامل باکتریایی نیسریا مننژیتیدس و هموفیلوس آنفولانزا بود که باعث بیماری مننژیت در انسان می‌شوند. روش تشخیصی

گزارش شده در این مطالعه قادر است در مواردی که پزشکان نسبت به تجویز آنتی‌بیوتیک اقدام نموده‌اند بدون نگرانی از عدم رشد این دو باکتری، نسبت به شناسایی این دو باکتری اقدام نماید.

۲- مواد و روش‌ها

برای انجام این مطالعه باکتری‌های مورد آزمایش به شرح زیر از مراکز آزمایشگاهی و دانشگاهی دریافت شد. باکتری‌های مورد استفاده در این تحقیق شامل نیسریا مننژیتیدس (PTCC 1507)، هموفیلوس آنفولانزا (ATCC 33930)، اشرشیاکلی (*Escherichia coli*) و سالمونلا پاراتیفی A (*Salmonella paratyphi A*) (NCTC 5702) از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شدند. باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylococcus aureus*) (ATCC 25923)، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس (*Staphylococcus epidermidis*)، شیگلا دیسانتری (*Shigella dysenteriae*)، لیستریا مونوسیتوژنز (*Listeria monocytogenes*)، کلبسیلا نمونیا (*Klebsiella pneumoniae*) و استرپتوکوکوس پیوژنز (*Streptococcus pyogenes*) از آزمایشگاه فرانس ایران تهیه شدند. پس از انتقال زیرگونه‌ها و نمونه‌ها، شناسایی آن‌ها با استفاده از محیط‌های انتخابی و افتراقی مختلف مورد بررسی و تأیید قرار گرفتند.

۲-۱- استخراج DNA ژنومی

برای استخراج و تخلیص DNA باکتری‌های گرم منفی (هموفیلوس آنفولانزا و نیسریا مننژیتیدس) با استفاده از روش کیهانی (Keyhani) و همکاران (۲۰۰۵) [۱۲] و باکتری‌های گرم مثبت (باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، و استرپتوکوکوس پیوژنز) از روش براتی (Barati) و همکاران (۲۰۰۶) [۱۳] استفاده شد. برای بررسی کیفیت محصول تخلیص شده، DNA ژنومی روی

ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شد.

۲-۲- انتخاب قطعات ژنی و تهیه آغازگرهای مناسب (Primers)

دو جفت آغازگر مخصوص ژن *opa* برای نیسریا مننژیتیدس و ژن پلی ساکارید کپسولی (*lic1*) برای هموفیلوس آنفولانزا طراحی شد. پس از انتخاب آغازگرهای مورد نظر، به وسیله نرم افزارهای مولکولی (DNASIS, BLAS, Oligo) وجود لوپ، دمای ذوب و سایر خصوصیات آغازگرها بررسی شد. به دنبال تأیید خصوصیات، آغازگرها برای ساخت به شرکت MWG آلمان سفارش داده شد. پس از ساخته شدن آغازگرها و قبل از استفاده در واکنش PCR کیفیت آن‌ها با الکتروفورز روی ژل ۱۵ درصد پلی اکریل آمید بررسی شد. این آغازگرها عبارتند از:

Men-f	TTT-TAA-TCA-GTT-AAA-CCG-AAT-ACG
Men-r	CAT-AAT-CTG-CCG-CTA-TCC-TCC
Flu-f	AAT-GAA-TAC-AAA-AAT-GCT-ATG-CAA
Flu-r	AAA-TGA-AAT-ACT-TCC-TCA-GGC-TTG

آغازگرهای Men-f, Men-r، قطعه‌ای به طول ۳۲۰ جفت‌باز را تکثیر نموده که مربوط به ژن *opa* باکتری نیسریا مننژیتیدس است و آغازگرهای Flu-f, Flu-r، قطعه‌ای به طول ۱۵۰ جفت‌باز را تکثیر نموده که مربوط به ژن *lic1* باکتری هموفیلوس آنفولانزا است.

۲-۳- واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) و

هضم آنزیمی

برای انجام فرایند PCR و همچنین هضم آنزیمی، موادی از جمله آنزیم DNA پلیمرز (*Taq DNA polymerase*)، آنزیم‌های محدودالثر و نشانگر DNA ladder (Marker) ۱۰۰ جفت‌بازی از شرکت Fermentas خریداری شد. Tris-base، dNTP، EDTA، MgCl₂، RNase، اتیودیوم بروماید (Ethidium bromide) و لیزوزیم نیز از شرکت Cinnagen تهیه شد. واکنش در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد. در این واکنش ۱ میکرولیتر از DNA الگو،

۰/۵ میکرولیتر از آنزیم DNA پلیمرز (*Taq* ۵ واحد در میکرولیتر)، ۰/۵ میکرولیتر از هر آغازگر (۲۰ پیکومول در میکرولیتر)، ۲ میکرولیتر از مخلوط dNTPs (۲/۵ میلی مولار)، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (۱۰ x) و ۱/۵ میکرولیتر از نمک MgCl₂ (۵۰ میلی مولار) با یکدیگر مخلوط و حجم نهایی با آب دوبار تقطیر به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد.

برنامه PCR طبق جدول ۱ انجام شد. پس از انجام واکنش ۵ میکرولیتر از محصولات واکنش به همراه یک میکرولیتر محلول رنگزا (Loading buffer) در ژل آگارز ۲ درصد به مدت ۱۵ دقیقه تحت تأثیر ولتاژ ۱۰۰ الکتروفورز شد. پس از اطمینان از تکثیر قطعه مورد نظر با استفاده از نشانگر DNA Ladder ۱۰۰ جفت‌بازی توسط الکتروفورز روی ژل آگارز، جایگاه برش آنزیمی روی قطعه تکثیر شده با توجه به آغازگرها و توالی مشخص آن‌ها با استفاده از نرم‌افزار DNASIS مورد بررسی قرار گرفت.

جدول ۱ برنامه دستگاه Thermal cycler برای تکثیر قطعات

ردیف	مرحله	درجه حرارت	زمان	تعداد چرخه‌ها
۱	واسرشتگی اولیه (Denaturation)	۹۴ درجه سانتی‌گراد	۲ دقیقه	۱ چرخه
۲	واسرشتگی اتصال تکثیر	۹۴ درجه سانتی‌گراد ۵۵ درجه سانتی‌گراد ۷۲ درجه سانتی‌گراد	۳۰ ثانیه ۳۰ ثانیه ۳۰ ثانیه	۲۸ چرخه
۳	تکثیر نهایی	۷۲ درجه سانتی‌گراد	۲ دقیقه	۱ چرخه

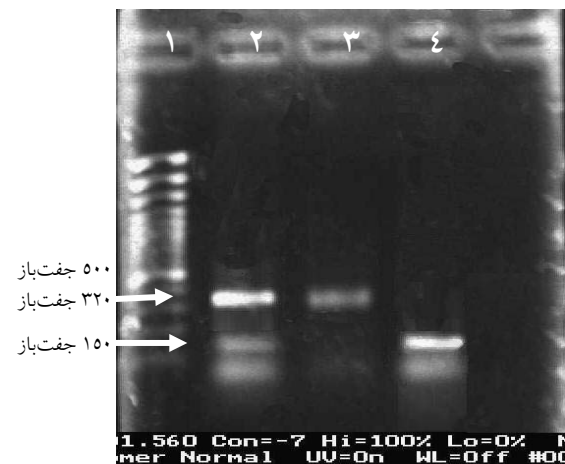
پس از اطمینان از تکثیر قطعه مورد نظر، نسبت به برش آن‌ها توسط آنزیم *HaeIII* اقدام شد. برای این منظور برنامه برش آنزیمی طبق جدول ۲ برای محصولات PCR که در داخل یک میکرولوله قرار داشتند، طراحی شد. پس از آماده شدن شرایط واکنش لوله به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا آنزیم مورد نظر محصول PCR را برش دهد. پس از این زمان، محصولات حاصل از هضم آنزیمی روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز و قطعات به دست آمده مشاهده شد.

مورد نظر طراحی و کیفیت آن‌ها در الکتروفورز با ژل پلی‌اکریل‌آمید بررسی و تأیید شد.

۳-۱- نتایج حاصل از واکنش PCR با نمونه‌های

ژنومی نیسریا مننژیتیدس

واکنش PCR با آغازگرهای طراحی شده روی نمونه‌های ژنومی باکتری نیسریا مننژیتیدس و الکتروفورز آن‌ها توسط ژل آگارز ۲ درصد انجام شد، نتیجه واکنش مطابق شکل ۱ بررسی شد. برای جستجوی نیسریا مننژیتیدس واکنش PCR با یک جفت آغازگر ویژه ژن *opa* انجام شد که وجود قطعه ۳۲۰ جفت‌باز مربوط به تکثیر بخشی از ژن *opa* نشان‌دهنده وجود این ژن در باکتری نیسریا مننژیتیدس بود که از این طریق نسبت به شناسایی این باکتری اقدام شد (شکل ۱، ستون ۳) از نشانگر ۱۰۰ جفت‌باز برای کنترل استفاده شد (شکل ۱، ستون ۱).



شکل ۱ نتیجه حاصل از الکتروفورز محصول واکنش PCR. نتایج حاصل از واکنش PCR با محصول ژنومی دو باکتری به صورت Multiplex: ستون ۱: نشانگر ۱۰۰ جفت‌باز، ستون ۲: Multiplex PCR از باکتری نیسریا مننژیتیدس و هموفیلوس آنفولانزا، ستون ۳: واکنش PCR با آغازگرهای *Men-f*، *Men-r* قطعه‌ای به طول ۳۲۰ جفت‌باز را تکثیر نموده که مربوط به ژن *opa* باکتری نیسریا مننژیتیدس است، ستون ۴: واکنش PCR با آغازگرهای *Flu-f*، *Flu-r* قطعه‌ای به طول ۱۵۰ جفت‌باز را تکثیر نموده که مربوط به ژن پلی‌ساکارید کپسولی (*lic1*) باکتری هموفیلوس آنفولانزا است.

جدول ۲ برنامه برش آنزیمی قطعه تکثیر شده

نام قطعه تکثیر شده	نام آنزیم: پروژن دهنده	میزان محصول برای برش	بافر R+	میزان آنزیم	آب دوبار تقطیر	دما و مدت واکنش
<i>opa</i>	<i>HaeIII</i>	۶ میکرولیتر	۲ میکرولیتر	۱ میکرولیتر	۱۱ میکرولیتر	۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۳ ساعت

۲-۴- تعیین حساسیت واکنش بر حسب تعداد باکتری

برای محاسبه حساسیت واکنش براساس تعداد باکتری، پس از کشت باکتری و اندازه‌گیری جذب نوری (Optical Density: OD) محیط کشت، ابتدا از محیط مورد نظر تا 10^{-10} رقت تهیه کرده و برای تمامی رقت‌ها واکنش PCR انجام شد و برای محاسبه تعداد باکتری در هر رقت فرایند شمارش باکتری (Colony count) انجام گرفت.

به‌منظور تعیین توالی، ابتدا ۵۰ میکرولیتر از هر یک از قطعات تکثیر شده توسط کیت تخلیص محصول PCR شرکت Fermentas تخلیص شد، سپس محصول PCR برای تعیین توالی به شرکت فراپژوه (Faza Pajoo) ارسال شد.

۲-۵- تعیین میزان اختصاصی بودن واکنش PCR

برای این منظور، واکنش PCR با ژنوم تخلیص شده از باکتری‌های نیسریا مننژیتیدس، هموفیلوس آنفولانزا، سالمونلا پاراتیفی، اشرشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، شیگلا دیسانتری، لیستریا مونوسیتوزنز، کلبسیلا نمونیا و استرپتوکوکوس پیورنز با همان آغازگرها انجام شد و محصول واکنش روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز و مشاهده شد.

۳- نتایج

زیرگونه‌های مورد استفاده به‌وسیله روش‌های استاندارد آزمایشگاهی شناسایی شدند. آغازگرها و قطعات انتخاب شده برای PCR توسط نرم‌افزارهای مولکولی همان‌گونه که بیان شد، بررسی قرار گرفتند و دو جفت آغازگر برای تکثیر قطعات

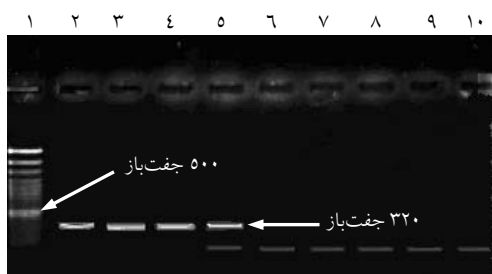
۳-۲- نتایج حاصل از واکنش PCR با نمونه‌های ژنومی هموفیلوس آنفولانزا

پس از واکنش PCR با نمونه‌های ژنومی باکتری هموفیلوس آنفولانزا و الکتروفورز آن‌ها توسط ژل آگارز ۲ درصد، نتیجه واکنش بررسی شد (شکل ۱). برای جستجوی هموفیلوس آنفولانزا واکنش PCR با یک جفت آغازگر ویژه ژن *licI* انجام شد که وجود قطعه ۱۵۰ باز مربوط به تکثیر بخشی از ژن *licI* نشان‌دهنده وجود این ژن در باکتری هموفیلوس آنفولانزا بود که از این طریق نسبت به شناسایی این باکتری اقدام شد (شکل ۱، ستون ۴).

برای شناسایی همزمان دو باکتری نیسریا منتزیتیدس و هموفیلوس آنفولانزا از روش Multiplex-PCR استفاده شد. وجود قطعه ۳۲۰ جفت‌باز مربوط به تکثیر بخشی از ژن *opa* مربوط به باکتری نیسریا منتزیتیدس و قطعه ۱۵۰ جفت‌باز مربوط به تکثیر بخشی از ژن *licI* از باکتری هموفیلوس آنفولانزا بوده و همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود با این روش می‌توان در یک زمان هر دو باکتری را شناسایی نمود (شکل ۱، ستون ۲).

پس از برش و هضم آنزیمی، دو قطعه ۱۸۴ جفت‌باز و ۱۳۶ جفت‌باز حاصل شد. قطعات حاصل از برش آنزیمی با قطعات مورد نظر که توسط نرم‌افزار DNASIS تعیین شده بود مطابقت داشت (شکل ۲). همچنین نسبت به تعیین توالی قطعات *licI* و *opa* اقدام شد که با توالی مورد انتظار در بانک ژنوم (Genebank) مطابقت داشته و صحت محصولات به‌دست آمده به اثبات رسید.

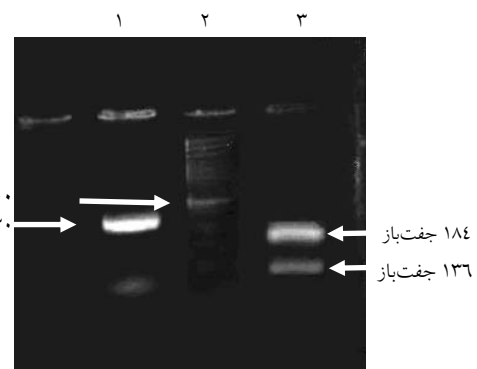
برای تعیین حساسیت واکنش برای دو باکتری مورد نظر پس از تهیه رقت‌های مختلف نسبت به انجام PCR اقدام شد. نتایج به‌دست آمده در شکل شماره ۲ و ۳ مشاهده می‌شود. حساسیت واکنش بر حسب تعداد باکتری هم انجام شد و تعداد باکتری ۴۵۰۰ CFU/ml (Colony-forming unit/ml) برای نیسریا منتزیتیدس (شکل ۳) و ۱۵۰۰۰ CFU/ml برای هموفیلوس آنفولانزا (شکل ۴) برای حساسیت آن‌ها مشخص شد که به‌نظر می‌رسد حساسیت مناسبی باشد.



شکل ۳ تعیین حساسیت بر حسب میزان غلظت DNA ژنومی باکتری نیسریا منتزیتیدس که حساسیت ۴۵۰۰ CFU/ml برای نیسریا منتزیتیدس مشخص شد. ستون ۱: این ستون مربوط به نشانگر ۱۰۰ جفت‌باز است، ستون‌های ۲ تا ۱۰: این ستون‌ها مربوط به رقت‌های 10^{-1} تا 10^{-9} DNA ژنومی این باکتری است.

۴- بحث

منتزیت عفونت مهم و خطرناک CNS است که در اثر عفونی شدن لایه‌های سه‌گانه مننژ ایجاد می‌شود. اگر چه گزارش‌های محققین نشان‌دهنده کاهش میزان مرگ و میر ناشی از عوامل باکتریایی در جهان است، اما مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها می‌تواند مقاومت‌های میکروبی را به‌دنبال داشته



شکل ۲ برش آنزیمی محصول PCR (نیسریا منتزیتیدس). ستون ۱: محصول PCR. ستون ۲: Ladder ۱۰۰ جفت‌باز، ستون ۳: قطعات حاصل از برش آنزیمی *opa*.

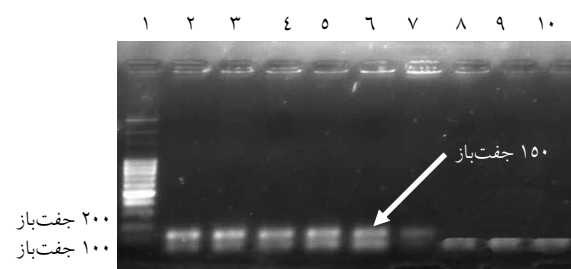
برای اطمینان از صحت قطعات تکثیر شده؛ محصول PCR ژن *opa* در این مطالعه تحت عمل هضم آنزیمی قرار گرفت.

و حساس برای تشخیص DNA به عنوان شاخص حضور یک میکروارگانیسم در مقادیر بسیار کم است. از این روش می توان در تشخیص سریع میکروارگانیسم های بیماری زا که یا در مقادیر بسیار کم وجود داشته و تشخیص آن ها نیاز به وقت و کار زیادی دارد یا اصلاً قابل کشت نیستند، استفاده کرد [۱۴]. بنابراین در سال های اخیر مطالعات زیادی در مورد استفاده از روش PCR برای تشخیص عوامل ایجادکننده مننژیت صورت گرفته است. از PCR برای شناسایی هموفیلوس آنفولانزا [۱۵] و نیز نیسریا مننژیتیدیس [۱۶] استفاده شده است و در مطالعه ای که توسط نی (Ni) و همکارانش در سال ۱۹۹۲ روی CSF انجام دادند، حساسیت شناسایی این آزمون را ۹۱ درصد اعلام نمودند [۱۷]؛ این در حالی بود که رادستروم (Radstrom) و همکارانش در سال ۱۹۹۴ میزان حساسیت را ۹۴ درصد و میزان اختصاصیت را تا ۹۶ درصد گزارش نموده اند [۱۸] هرچند آن ها با نتایج مثبت کاذب هم مواجه بوده اند.

به منظور اطمینان از صحت قطعات تکثیر یافته مورد نظر، از دو روش برش آنزیمی و تعیین توالی استفاده شد. در روش برش آنزیمی پس از استخراج توالی ژن ها و یافتن جایگاه آغازگرها روی آن ها و به دست آوردن اندازه دقیق قطعات تکثیر شده توسط نرم افزار مولکولی DNASIS، جایگاه برش آنزیمی روی دو قطعه بررسی شد. با توجه به جایگاه برش آنزیم های محدودالانتر، آنزیم *HaeIII* برای قطعه تکثیر یافته ژن *opa* در نظر گرفته شد که از برش آن دو قطعه ۱۳۶ جفت باز، ۱۸۷ جفت باز حاصل شد. هضم آنزیمی و بررسی نتیجه حاصل از آن توسط الکتروفورز نیز صحت قطعات تکثیر شده را تأیید کرد. در روش تعیین توالی نیز توالی قطعات تکثیر شده مشخص شد و در مقایسه آن ها با توالی مورد انتظار که از بانک ژنوم استخراج شده بود صحت محصولات PCR به اثبات رسید. در مورد قطعه تکثیر شده از ژن *licI* به دلیل این که طول این قطعه کوچک بود و محل مناسبی برای برش آنزیمی در این قطعه وجود نداشت، بنابراین برای تأیید این قطعه فقط نسبت به تعیین توالی آن اقدام شد.

توانایی هموفیلوس آنفولانزا در استقرار در نواحی مختلف بدن از جمله حلق و بینی با عملکرد ژن *lic-I* مرتبط است. این در حالی است که تمام زیرگونه های نیسریا مننژیتیدیس دارای

باشد. عوامل میکروبی زیادی از قبیل استافیلوکوکوس، لیستریا مونوسیژن، اشرشیاکلی، نیسریا مننژیتیدیس، استریتوکوکوس نمونیا و هموفیلوس آنفولانزا باعث ایجاد این عفونت در انسان می شوند، اما دو عامل دخیل در عفونت که مجموعاً بیش از ۶۸ درصد کل موارد مننژیت را در انسان ایجاد می کنند، مننژیت ایجاد شده توسط نیسریا مننژیتیدیس و هموفیلوس آنفولانزا است.



شکل ۴ تعیین حساسیت بر حسب تعداد باکتری هموفیلوس آنفولانزا که حساسیت ۱۵۰۰۰ CFU/ml برای هموفیلوس آنفولانزا مشخص شد. ستون ۱: نشانگر، ستون های ۲ تا ۱۰: این ستون ها مربوط به رقت های 10^{-1} تا 10^{-9} DNA ژنومی این باکتری است.

روش های مختلفی برای شناسایی این باکتری ها گزارش شده است که هر کدام دارای معایبی از جمله زمان طولانی برای شناسایی، حساسیت و اختصاصیت کم، هزینه زیاد، واکنش های کاذب مثبت یا منفی، نیاز به افراد مجرب و در نهایت مشکل رشد در محیط های کشت معمولی است. این در حالی است که در بعضی از این روش ها از جمله استفاده از رنگ آمیزی گرم و اکریدین ارنج (Acridine orange) (برای شناسایی این دو باکتری در نمونه های CSF به طور مستقیم) که یک روش ساده، ارزان و سریع برای تشخیص هستند و در ۷۵ تا ۹۰ درصد موارد جواب مثبت است اما در مواردی که قبل از نمونه برداری درمان آنتی بیوتیکی شروع شده باشد، این میزان تا ۴۰ درصد کاهش می یابد. بنابراین این روش ها معمولاً روش اطمینان بخشی برای تشخیص این عوامل نیستند.

روش PCR که امروزه از آن به طور وسیعی در تشخیص طیف گسترده ای از عوامل بیولوژیک استفاده می شود یک روش بسیار اختصاصی و در عین حال حساس برای شناسایی انواع ژن ها و عوامل بیولوژیک است. همچنین PCR یک روش مهم

رادستروم و همکارانش با انجام مرحله دوم واکنش توانستند این حساسیت را تا 3×10^2 CFU/ml افزایش دهند. علت افزایش این حساسیت، انجام مجدد واکنش PCR بوده که از محصول PCR اولیه در واکنش دوم استفاده شده بود [۵]. اگرچه این روش پرهزینه و وقت گیر است. در این تحقیق حساسیت واکنش برای شناسایی باکتری‌های نیسریا مننژیتیدیس و هموفیلوس آنفولانزا به ترتیب $4/5 \times 10^2$ CFU/ml و $1/5 \times 10^4$ CFU/ml تعیین شد.

بنابراین با توجه به مزیت‌های این روش، به کارگیری این روش تشخیصی (پس از انجام آزمایش‌های بالینی لازم) برای شناسایی عفونت‌های مذکور برای صحت و تسریع در شناسایی در آزمایشگاه‌های تشخیصی مفید و سودمند خواهد بود.

۵- تشکر و قدردانی

نویسندگان بدین وسیله از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران و آزمایشگاه رفرانس ایران بابت در اختیار قرار دادن زیرگونه‌های مورد نیاز این تحقیق تقدیر و تشکر می‌نمایند.

پروتئین Opa هستند. Opa توانایی مقاومت باکتری در برابر فاگوسیتوز را ایجاد می‌کند. این ژن به دلیل داشتن نواحی محافظت شده به عنوان ژن هدف برای تشخیص باکتری مورد استفاده قرار می‌گیرد. به منظور شناسایی با استفاده از واکنش mPCR، دو جفت آغازگر اختصاصی ژن *lic-1* برای هموفیلوس آنفولانزا و ژن *opa* برای نیسریا مننژیتیدیس طراحی شد. در این مطالعه از Multiplex PCR برای شناسایی سریع و همزمان دو عامل ایجادکننده عفونت مننژ هموفیلوس آنفولانزا و نیسریا مننژیتیدیس استفاده شد. حساسیت و اختصاصیت این دو عامل مهم بیماری‌زا بررسی شد. این روش شناسایی به عنوان یک روش مناسب برای آزمون‌های اپیدمیولوژی و نیز برای زیرگونه‌هایی که غیر قابل کشت بوده یا در بیمارانی که قبل از شناسایی این دو عامل بیماری‌زا آنتی‌بیوتیک دریافت کرده‌اند، می‌تواند کاربرد مناسبی داشته باشد.

در تحقیقاتی که رادستروم و همکارانش [۱۷] با استفاده از PCR دو مرحله‌ای انجام دادند، نشان دادند که عامل مننژیت در CSF در اولین واکنش می‌تواند حساسیتی تا 3×10^5 CFU/ml را شناسایی نموده که کمتر از حساسیت به دست آمده در مطالعه ما بود و این تفاوت می‌تواند به علت امکان وجود ممانعت‌کننده‌ها و مهارکننده‌ها در نمونه CSF بوده باشد.

۶- منابع

- [1] Peltola H. Worldwide Haemophilus influenzae type b disease at the beginning of the 21st century: global analysis of the disease burden 25 years after the use of the polysaccharide vaccine and a decade after the advent of conjugates. Clin Microbiol Rev 2000; 13(2): 302-17.
- [2] Adams WG, Deaver KA, Cochi SL, Plikaytis BD, Zell ER, Broome CV, Wenger JD. Decline of childhood Haemophilus influenzae type b (Hib) disease in the Hib vaccine era. JAMA 1993; 269(2): 221-6.
- [3] Auburtin M, Wolff M, Charpentier J, Varon E, Le Tulzo Y, Girault C, Mohammedi I, Renard B, Mourvillier B, Bruneel F, Ricard JD, Timsit JF. Detrimental role of delayed antibiotic administration and penicillin-nonsusceptible strains in adult intensive care unit patients with pneumococcal meningitis: the PNEUMOREA prospective multicenter study. Crit Care Med 2006; 34(11): 2758-65.
- [4] Tunkel AR, Hartman BJ, Kaplan SL, Kaufman BA, Roos KL, Scheld WM, Whitley RJ. Practice guidelines for the management of bacterial meningitis. Clin Infect Dis 2004; 39: 1267-84.
- [5] Gray LD, Fedorko DP. Laboratory diagnosis

- of bacterial meningitis. *Clin Microbiol Rev* 1992; 5(2): 130–45.
- [6] Dalton HP, Allison MJ. Modification of laboratory results by partial treatment of bacterial meningitis. *Am J Clin Pathol* 1968; 49(3): 410–3.
- [7] Olcen P. Serological methods for rapid diagnosis of *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis* and *Streptococcus pneumoniae* in cerebrospinal fluid: a comparison of coagglutination, immunofluorescence and immunoelectroosmophoresis. *Scand J Infect Dis* 1978; 10: 283-9.
- [8] Salih MA, Ahmed HS, Hofvander Y, Danielsson D, Olcén P. Rapid diagnosis of bacterial meningitis by an enzyme immunoassay of cerebrospinal fluid. *Epidemiol Infect* 1989; 103(2): 301-10.
- [9] Marty A, Greiner O, Day PJ, Gunziger S, Mühlemann K, Nadal D. Detection of *Haemophilus influenzae* type b by real-Time PCR. *J Clin Microbiol* 2004; 42(8): 3813–5.
- [10] Hassan-King M, Baldeh I, Adegbola R, Omosigho C, Usen SO, Oparaugo A, Greenwood BM. Detection of *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae* DNA in blood culture by a single PCR assay. *J Clin Microbiol* 1996; 34(8): 2030-2.
- [11] Birtles A, Hardy K, Gray SJ, Handford S, Kaczmarek EB, Edwards-Jones V, Fox AJ. Multilocus sequence typing of *Neisseria meningitidis* directly from clinical samples and application of the method to the investigation of meningococcal disease case clusters. *J Clin Microbiol* 2005; 43(12): 6007-14.
- [12] Keyhani AH, Saadati M, Karimi-Rahjerdi A, Kamali M. Detection of shiga toxin genes by multiplex PCR. *Mil Med J* 2005; 7(4): 321-9. (Persian)
- [13] Barati B, Saadati M, Bahmani MK. Isolation and detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* type A by multiplex PCR. *Mil Med J* 2006; 8(2): 119-28. (Persian)
- [14] Cherian T, Lalitha MK, Manoharan A, Thomas K, Yolken RH, Steinhoff MC. PCR-Enzyme immunoassay for detection of *Streptococcus pneumoniae* DNA in cerebrospinal fluid samples from patients with culture-negative meningitis. *J Clin Microbiol* 1998; 36(12): 3605–8.
- [15] Shoma S, Rahman M, Yasmin M. Rapid detection of *Haemophilus influenzae* type b in Bangladeshi children with pneumonia and meningitis by PCR and analysis of antimicrobial resistance. *J Health Popul Nutr* 2001; 19(4): 268-74.
- [16] Failace L, Wagner M, Chesky M, Scalco R, Jobim LF. Simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus* sp. by polymerase chain reaction for the diagnosis of bacterial meningitis. *Arq Neuropsiquiatr* 2005; 63(4): 920-4.
- [17] Ni H, Knight AI, Cartwright K, Palmer WH, McFadden J. Polymerase chain reaction for diagnosis of meningococcal meningitis. *Lancet* 1992; 340(8833): 1432–4.
- [18] Radström P, Bäckman A, Qian N, Kraggsbjerg P, Pahlson C, Olcén P. Detection of bacterial DNA in cerebrospinal fluid by an assay for simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and streptococci using a seminested PCR strategy. *J Clin Microbiol* 1994; 32(11): 2738–44.

