[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-11-27]

مجله علوم پزشکی مدرس
دوره ۱۱، شماره ۱ و ۲: از ۷۳-۸۰
بهار و تابستان ۱۳۸۷

شناسایی مولکولی همزمان نیسریا منتژیتیدس و هموفیلوس آنفولانزا

مجتبی سعادتی[1*]، شهرام نظریان[2]، بابک براتی[3]، حسین مهدی‌زاده[4]، هادی شیرزاد[5]، مجید صادقی‌زاده[6]، عباس موسی‌پور[7]

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

دریافت مقاله: ۸۷/۴/۱۹ پذیرش مقاله: ۸۷/۹/۱۳

چکیده

هدف: منتژیت باکتریایی یکی از عفونت‌های جدی و گاهی کشنده است که روی سیستم اعصاب مرکزی تأثیر می‌گذارد. دانستن علت منتژیت ایجاد شده توسط عوامل ویروسی یا باکتریایی، به‌دلیل 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 منتژیتیدس و هموفیلوس آنفولانزا دو عامل مهم بیماری‌زا هستند که در ایجاد منتژیت حاد باکتریایی دخالت دارند.

روش‌های مختلفی برای شناسایی نیسریا منتژیتیدس و هموفیلوس آنفولانزا استفاده شده است، اما علاوه بر طولانی شدن نیاز به روش‌های حساس‌تری برای شناسایی این بیماریزاها 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 منتژیتیدس از روش Multiplex PCR (mPCR) استفاده شد. تأیید اولیه این زیرگونه‌ها به روش بیوشیمیایی صورت پذیرفت. به‌منظور شناسایی با استفاده از واکنش mPCR، دو جفت آغازگر اختصاصی ژن *lic-1* برای هموفیلوس آنفولانزا و ژن *opa* برای نیسریا منتژیتیدس طراحی شد.

نتایج: قطعه DNA تکثیر یافته برای هموفیلوس آنفولانزا ۱۵۰ جفت‌باز و برای نیسریا منتژیتیدس ۳۲۰ جفت‌باز بود. استرپتوکوکوس نمونیا به‌عنوان 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 منتژیتیدس، هموفیلوس آنفولانزا، Multiplex PCR.

۱- مقدمه

منتژیت باکتریایی عفونت جدی و گاهی کشنده است که سیستم اعصاب مرکزی (Central Nervous System: CNS) را تحت تأثیر قرار می‌دهد. اگر چه این عفونت در موارد درمان نشده یا درمان نامناسب با مرگ و میر بالایی همراه است ولی

* **نشانی مکاتبه:** تهران، دانشگاه امام حسین(ع)، گروه علوم زیستی.
Email: saadati_m@yahoo.com

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-11-27]

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

دو عامل باکتریایی نیسریا منتژیتیدس *(Neisseria meningitidis)* و هموفیلوس آنفولانزا *(Haemophilus influenzae)* جزء مهم‌ترین عوامل ایجادکننده منتژیت 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 به‌طول می‌انجامد این در حالی است که تشخیص عامل منتژیت در پی مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها تا ۳۰ درصد کاهش می‌یابد [٤-٦]. بسیاری از محققین تلاش نموده‌اند تا روش‌های سریع و دقیقی را برای شناسایی عوامل ایجادکننده منتژیت با استفاده از روش‌های ایمونولوژی ارائه دهند، هر چند این روش‌ها به تنهایی یا با هم به‌طور کامل رضایت‌بخش نبوده است [۷، ۸]. عدم شناسایی دقیق و به‌موقع 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 منتژیت، بین تأخیر زمانی بیش از ٦ ساعت در تجویز آنتی‌بیوتیک و میزان مرگ و میر ارتباط مستقیم وجود دارد. نظر به اهمیت تشخیص سریع و دقیق عامل منتژیت، استفاده از روش‌های مولکولی از جمله PCR برای شناسایی عامل منتژیت 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 ٤٠ درصد عفونت‌های ناشی از نیسریا منتژیتیدیس که با استفاده از PCR مورد تأیید قرار گرفته، میکروارگانیسم‌های 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 می‌توان به‌طور همزمان نسبت به شناسایی دو یا چند عامل اقدام نمود.

هدف از این تحقیق شناسایی هم‌زمان دو عامل باکتریایی نیسریا منتژیتیدس و هموفیلوس آنفولانزا بود که باعث بیماری منتژیت 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 منتژیتدیس (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 رفرانس 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 منتژیتیدس) 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 (۲۰۰٦) [۱۳] استفاده شد. برای بررسی کیفیت محصول تخلیص شده، DNA ژنومی روی

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-11-27]

ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شد.

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

دو جفت آغازگر مخصوص ژن *opa* برای نیسریا منتژیتیدس و ژن پلی‌ساکارید کپسولی (*lic1*) برای هموفیلوس آنفولانزا طراحی شد. پس از انتخاب آغازگرهای مورد نظر، به‌وسیله نرم‌افزارهای 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 ازاستفاده در واکنش PCR کیفیت آن‌ها با الکتروفورز روی ژل ۱۵ درصد پلی‌اکریل‌آمید 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 به‌طول ۳۲۰ جفت‌باز را تکثیر نموده که مربوط به ژن *opa* باکتری نیسریا منتژیتیدس است و آغازگرهای Flu-f، Flu-r قطعه‌ای به‌طول ۱۵۰ جفت‌باز را تکثیر نموده که مربوط به ژن *lic1* باکتری هموفیلوس آنفولانزا است.

۲-۳- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) و هضم آنزیمی

برای انجام فرایند PCR و همچنین هضم آنزیمی، موادی از جمله آنزیم DNA پلیمراز *Taq* (*Taq* DNA polymerase)، آنزیم‌های محدودالاثر و نشانگر DNA ladder (Marker) ۱۰۰ جفت‌بازی از شرکت Fermentas خریداری شد. Tris-base، EDTA، dNTP، $MgCl_2$، RNase، اتیدیوم 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 پلیمراز *Taq* (۵ واحد در میکرولیتر)، ۰/۵ میکرولیتر از هر آغازگر (۲۰ پیکومول در میکرولیتر)، ۲ میکرولیتر از مخلوط dNTPs (۲/۵ میلی‌مولار)، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (۱۰ x) و ۱/۵ میکرولیتر از نمک $MgCl_2$ (۵۰ میلی‌مولار) 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 به‌همراه یک میکرولیتر محلول رنگزا (Loading buffer) در ژل آگارز ۲ درصد به‌مدت 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 Termal cycler برای تکثیر قطعات

ردیف	مرحله	درجه حرارت	زمان	تعداد چرخه‌ها
۱	واسرشتگی‌اولیه (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 Hae*III* 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 به‌مدت 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 به‌دست آمده مشاهده شد.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-11-27]

جدول ۲ برنامه برش آنزیمی قطعه تکثیر شده

نام قطعه تکثیر شده	نام آنزیم برش‌دهنده	میزان محصول برای برش	بافر +R	میزان آنزیم	آب دوبار تقطیر	دما و مدت واکنش
opa	Hae*III*	٦ میکرولیتر	۲ میکرولیتر	۱ میکرولیتر	۱۱ میکرولیتر	۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۳ ساعت

۲-٤- 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 فزاپژوه (Faza Pajooh) ارسال شد.

۲-۵- تعیین میزان اختصاصی بودن واکنش PCR

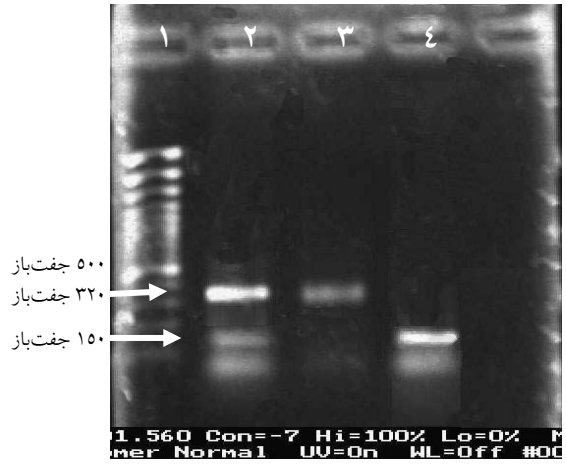
برای این منظور، واکنش PCR با ژنوم تخلیص شده از باکتری‌های نیسریا منتژیتیدس، هموفیلوس آنفولانزا، سالمونلا پاراتیفی، اشرشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، شیگلا دیسانتری، لیستریا مونوسیتوژنز، کلبسیلا نمونیا و استرپتوکوکوس پیوژنز با همان آغازگرها انجام شد و محصول واکنش روی ژل آگارز 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 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 منتژیتیدس

واکنش PCR با آغازگرهای طراحی شده روی نمونه‌های ژنومی باکتری نیسریا منتژیتیدس و الکتروفورز آن‌ها توسط ژل آگارز ۲ درصد انجام شد، نتیجه واکنش مطابق شکل ۱ بررسی شد. برای جستجوی نیسریا منتژیتیدس 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 منتژیتیدس 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).



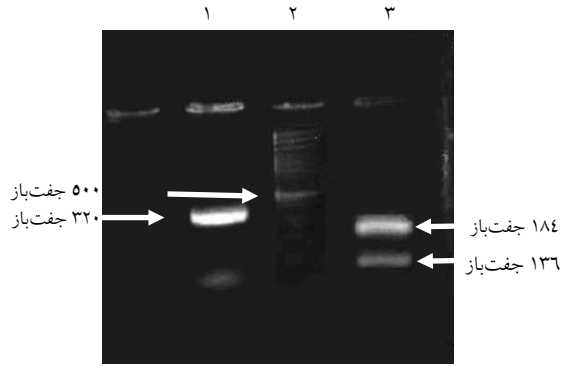
شکل ۱ نتیجه حاصل از الکتروفورز محصول واکنش PCR. نتایج حاصل از واکنش PCR با محصول ژنومی دو باکتری به‌صورت Multiplex؛ **ستون ۱:** نشانگر ۱۰۰ جفت‌باز، **ستون ۲:** Multiplex PCR از باکتری نیسریا منتژیتیدیس و هموفیلوس آنفولانزا، **ستون ۳:** واکنش PCR با آغازگرهای Men-f، Men-r قطعه‌ای به‌طول ۳۲۰ جفت‌باز را تکثیر نموده که مربوط به ژن *opa* باکتری نیسریا منتژیتیدس است، **ستون٤:** واکنش PCR با آغازگرهای Flu-r، Flu-f قطعه‌ای به‌طول ۱۵۰ جفت‌باز را تکثیر نموده که مربوط به ژن پلی‌ساکارید کپسولی (*lic1*) باکتری هموفیلوس آنفولانزا است.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-11-27]

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 *lic1* انجام شد که وجود قطعه ۱۵۰ باز مربوط به تکثیر بخشی از ژن *lic1*، نشان‌دهنده وجود این ژن در باکتری هموفیلوس آنفولانزا بود که از این طریق نسبت به شناسایی این باکتری اقدام شد (شکل ۱، ستون ٤).

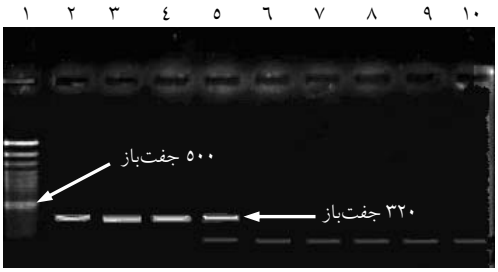
برای شناسایی همزمان دو باکتری نیسریا منتژیتیدس و هموفیلوس آنفولانزا از روش Multiplex-PCR استفاده شد. وجود قطعه ۳۲۰ جفت‌باز مربوط به تکثیر بخشی از ژن *opa* مربوط به باکتری نیسریا منتژیتیدس و قطعه ۱۵۰ جفت‌باز مربوط به تکثیر بخشی از ژن *lic-1* از باکتری هموفیلوس آنفولانزا بوده و همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود با این روش می‌توان در یک زمان هر دو باکتری را شناسایی نمود (شکل ۱، ستون ۲).



شکل ۲ برش آنزیمی محصول PCR (نیسریا منتژیتیدس). **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. پس از برش و هضم آنزیمی، دو قطعه ۱۸٤ جفت‌باز و ۱۳٦ 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 *lic-1* 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 ٤۵۰۰ CFU/ml (Colony-forming unit/ml) برای نایسریا منتژیتیدیس (شکل ۳) و ۱۵۰۰۰ CFU/ml برای هموفیلوس آنفولانزا (شکل ٤) برای حساسیت آن‌ها مشخص شد که به‌نظر می‌رسد حساسیت مناسبی باشد.



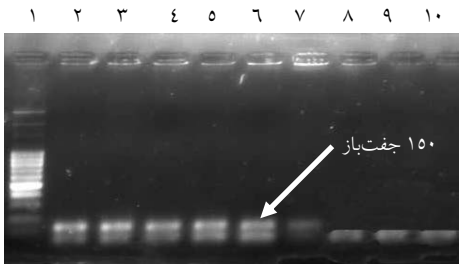
شکل ۳ تعیین حساسیت بر حسب میزان غلظت DNA ژنومی باکتری نیسریا منتژیتیدیس که حساسیت ٤۵۰۰ CFU/ml برای نیسریا منتژیتیدیس مشخص شد. **ستون ۱:** این ستون مربوط به نشانگر ۱۰۰ جفت‌باز است، **ستون‌های ۲ تا ۱۰:** این ستون‌ها مربوط به رقت‌های 10^{-1} تا 10^{-9} DNA ژنومی این باکتری است.

٤- بحث

منتژیت 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

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-11-27]

باشد. عوامل میکروبی زیادی از قبیل استافیلوکوکوس، لیستریا مونوسیتوژن، اشرشیاکلی، نیسریا منتژیتیدس، استرپتوکوکوس نمونیا و هموفیلوس آنفولانزا باعث ایجاد این عفونت در انسان می‌شوند، اما دو عامل دخیل در عفونت که مجموعاً بیش از ٦٨ درصد کل موارد منتژیت را در انسان ایجاد می‌کنند، منتژیت ایجاد شده توسط نیسریا منتژیتیدس و هموفیلوس آنفولانزا است.



شکل ٤ تعیین حساسیت بر حسب تعداد باکتری هموفیلوس آنفولانزا که حساسیت CFU/ml ۱۵۰۰۰ برای هموفیلوس آنفولانزا مشخص شد. **ستون ۱:** نشانگر، **ستون‌های ۲ تا ۱۰:** این ستون‌ها مربوط به رقت‌های 10^{-1} تا 10^{-9} DNA ژنومی این باکتری است.

روش‌های مختلفی برای شناسایی این باکتری‌ها گزارش شده است که هر کدام دارای معایبی از جمله زمان طولانی برای شناسایی، حساسیت و اختصاصیت کم، هزینه زیاد، واکنش‌های کاذب مثبت یا منفی، نیاز به افراد مجرب و در نهایت مشکل رشد در محیط‌های کشت معمولی است. این درحالی است که در بعضی از این روش‌ها از جمله استفاده از رنگ‌آمیزی گرم و اکریدین ارنج (Acridine orange) (برای شناسایی این دو باکتری در نمونه‌های CSF به‌طور 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 نمونه‌برداری درمان آنتی‌بیوتیکی شروع شده باشد، این میزان تا ٤٠ درصد کاهش می‌یابد. بنابراین این روش‌ها معمولاً روش اطمینان‌بخشی برای تشخیص این عوامل نیستند.

روش PCR که امروزه از آن به‌طور وسیعی در تشخیص طیف گسترده‌ای از عوامل بیولوژیک استفاده می‌شود یک روش بسیار اختصاصی و در عین حال حساس برای شناسائی انواع ژن‌ها و عوامل بیولوژیک است. همچنین PCR یک روش مهم و حساس برای تشخیص DNA به‌عنوان شاخص حضور یک میکروارگانیسم در مقادیر بسیار کم است. از این روش می‌توان در تشخیص سریع میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا که یا در مقادیر بسیار کم وجود داشته و تشخیص آن‌ها نیاز به وقت و کار زیادی دارد یا اصلاً قابل کشت نیستند، استفاده کرد [١٤]. بنابراین در سال‌های اخیر مطالعات زیادی در مورد استفاده از روش PCR برای تشخیص عوامل ایجادکننده منتژیت صورت گرفته است. از PCR برای شناسایی هموفیلوس آنفولانزا [١٥] و نیز نیسریا منتژیتیدیس [١٦] استفاده شده است و در مطالعه‌ای که توسط نی (Ni) و همکارانش در سال ۱۹۹۲ روی CSF انجام دادند، حساسیت شناسایی این آزمون را ۹۱ درصد اعلام نمودند [١٧]؛ این درحالی بود که رادستروم (Radstrom) و همکارانش در سال ١٩٩٤ میزان حساسیت را ٩٤ درصد و میزان اختصاصیت را تا ٩٦ درصد گزارش نموده‌اند [١٨] هرچند آن‌ها با نتایج مثبت کاذب هم مواجه بوده‌اند.

به‌منظور 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 ژن‌ها و یافتن جایگاه آغازگرها روی آن‌ها و به‌دست آوردن اندازه دقیق قطعات تکثیر شده توسط نرم‌افزار مولکولی DNASIS، جایگاه برش آنزیمی روی دو قطعه بررسی شد. با توجه به جایگاه برش آنزیم‌های محدودالاثر، آنزیم Hae*III* برای قطعه تکثیر یافته ژن *opa* در نظر گرفته شد که از برش آن دو قطعه ١٣٦ جفت‌باز، ۱۸۷ جفت‌باز 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 آن‌ها با توالی مورد انتظار که از بانک ژنوم استخراج شده بود صحت محصولات PCR به اثبات رسید. در مورد قطعه تکثیر شده از ژن *lic1* به‌دلیل این‌که 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-1* مرتبط است. این درحالی است که تمام زیرگونه‌های نیسریا منتژیتیدس دارای

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-11-27]

پروتئین Opa هستند. Opa توانایی مقاومت باکتری در برابر فاگوسیتوز را ایجاد می‌کند. این ژن به‌دلیل داشتن نواحی محافظت شده به‌عنوان ژن هدف برای تشخیص باکتری مورد استفاده قرار می‌گیرد. به‌منظور شناسایی با استفاده از واکنش mPCR، دو جفت آغازگر اختصاصی ژن *lic-1* برای هموفیلوس آنفولانزا و ژن *opa* برای نیسریا منتژیتیدس طراحی شد. در این مطالعه از Multiplex PCR برای شناسایی سریع و همزمان دو عامل ایجادکننده عفونت منتژ هموفیلوس آنفولانزا و نیسریا منتژیتیدیس استفاده شد. حساسیت و اختصاصیت این دو عامل مهم بیماری‌زا بررسی شد. این روش شناسایی به‌عنوان 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 منتژیت در CSF در اولین واکنش می‌تواند حساسیتی تا ۳×۱۰^{۵} CFU/ml را شناسایی نموده که کمتر از حساسیت به‌دست آمده در مطالعه ما بود و این تفاوت می‌تواند به‌علت امکان وجود ممانعت‌کننده‌ها و مهارکننده‌ها در نمونه CSF بوده باشد. رادستروم و همکارانش با انجام مرحله دوم واکنش توانستند این حساسیت را تا ۳×۱۰^{۲} 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 وقت‌گیر است. در این تحقیق حساسیت واکنش برای شناسایی باکتری‌های نیسریا منتژیتیدیس و هموفیلوس آنفولانزا به‌ترتیب $٤/٥\times۱۰^{۳}$ CFU/ml و $۱/٥\times۱۰^{٤}$ CFU/ml تعیین شد.

بنابراین با توجه به مزیت‌های این روش، به‌کارگیری 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 بدین‌وسیله 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.

٦- 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

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-11-27]

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, Kaczmarski 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, Kragsbjerg 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.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-11-27]

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-11-27]