مجله پزشکی کوثر
دوره ۱۴، شماره ۳، پاییز ۱۳۸۸
صفحات: ۱۲۶-۱۱۹

تشخیص همزمان عوامل شایع مننژیت باکتریایی: *نایسریا مننژیتیدیس*، *هموفیلوس انفلونزا* و *استرپتوکوکوس پنومونیه* با مولتی‌پلکس PCR

رمضانعلی عطایی* *PhD*، علی مهرابی توانا[۱] *PhD*، سید محمدجواد حسینی[۲] *MD*، علی کرمی[۲] *PhD*، زهرا سفیری[۲] *MSc*، محمد ا...وردی[۱] *MSc*

چکیده

اهداف. درمان فوری مننژیت باکتریایی به‌عنوان اورژانس پزشکی مستلزم تشخیص سریع و دقیق است. این امر می‌تواند از مرگ‌ومیر یا عوارض بعدی پیشگیری نماید. از این‌رو، هدف این تحقیق، راه‌اندازی روش تشخیص مولکولی مولتی‌پلکس PCR برای شناسایی مننژیت باکتریایی و تشخیص عوامل شایع آن بود.

مواد و روش‌ها. در این تحقیق، از پرایمر یونیورسال و نیز پرایمرهای اختصاصی استفاده شد. ژنوم ۲۰ سویه باکتریایی استخراج و با شرایط استانداردشده، طی دو مرحله تحت PCR قرار گرفت. محصول PCR با ژل آگاروز ۱٪ الکتروفورز و با سویه‌های استاندارد مقایسه شد. نتایج با استفاده از آنزیم HeaIII تأیید گردید.

یافته‌ها. استخراج ژنوم حداقل ۱۰ باکتری در یک میلی‌لیتر محیط کشت برای شناسایی ضروری بود. استفاده از پرایمر یونیورسال ساخته‌شده از ژن 16SrRNA امکان تکثیر یک قطعه ۱۰۰۰ جفت‌بازی را فراهم کرد. این قطعه در تمام سویه‌های موردمطالعه مشاهده شد. استفاده از پرایمر اختصاصی برای *نایسریا مننژیتیدیس* یک قطعه ۷۰۰ جفت‌بازی، برای *هموفیلوس انفلونزا* یک قطعه ۵۰۰ جفت‌بازی و *استرپتوکوکوس پنومونیه* یک قطعه ۳۰۰ جفت‌بازی ایجاد نمود.

نتیجه‌گیری. روش مولکولی در فاصله حدود ۳ ساعت وجود مننژیت باکتریایی را نشان می‌دهد و عوامل آن را شناسایی می‌کند. استفاده از این روش در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی موجب ارتقای سطح کیفی می‌شود و سرعت تشخیص را نیز افزایش می‌دهد.

کلیدواژه‌ها: مننژیت باکتریایی، تشخیص همزمان، مولتی‌پلکس PCR

Archive of SID

دریافت مقاله: ۱۳۸۸/۶/۲، پذیرش مقاله: ۱۳۸۸/۱۰/۹

*نویسنده مسئول: "مرکز تحقیقات کاربرد درمانی توکسین‌های میکروبی" و "گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی"، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...(عج)، تهران، ایران
ataee@bmsu.ac.ir
۱"مرکز تحقیقات کاربرد درمانی توکسین‌های میکروبی" و "گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی"، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...(عج)، تهران، ایران
۲ مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...(عج)، تهران، ایران

www.SID.ir

مقدمه

مننژیت یکی از اورژانس‌های مهم پزشکی است و تاخیر در تشخیص و درمان به‌موقع آن با عوارض و پیامدهای ناگوار همراه است [۱]. عوامل باکتریایی و ویروسی مختلفی در ایجاد این بیماری دخیل هستند. افتراق مننژیت باکتریایی از ویروسی تعیین‌کننده پروتکل درمانی است. با آن که باکتری‌های مختلف باعث مننژیت می‌شوند، ولی تحقیقات اخیر سه عامل شایع، یعنی *نایسریا مننژیتیدیس*، *هموفیلوس انفلوانزا* و *استرپتوکوکوس پنومونیه* را معرفی نموده است [۲، ۳]. از این‌رو، استفاده از روشی که بتواند باکتریایی بودن مننژیت را تعیین و به‌طور اختصاصی آن را شناسایی نماید، از ضروریات آزمایشگاه‌های تشخیص طبی است. در برخی از کشورها کاربرد گسترده Real Time-PCR و روش‌های پیشرفته دیگر به‌منظور تشخیص همزمان عامل بیماری و تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن در آزمایشگاه‌های میکروب‌شناسی پزشکی در حال گسترش است. زیرا، با استفاده از این تکنولوژی می‌توان عوامل عفونی باکتریایی و ویروسی را به‌طور همزمان تشخیص داد [۴، ۵]. با آن که نتایج برخی از تحقیقات حاکی از صرفه‌جویی در هزینه‌های هنگفت درمانی با استفاده از روش‌های تشخیصی پیشرفته است [۶]، در ایران، تحمیل هزینه‌های سنگین، به‌کارگیری روش‌های پیشرفته PCR را با محدودیت مواجه ساخته است. به این ترتیب، تلاش‌های زیادی در جریان است تا روشی ارزان و سریع طراحی شود که قادر باشد در مرحله اول، وجود طیف وسیعی از ارگانیزم‌ها را اثبات [۷، ۸] و در مرحله دوم، آنها را به‌طور اختصاصی شناسایی نماید. از این‌رو، ردیابی و شناسایی ارگانیزم‌ها در مایع مغزی- نخاعی (CSF) از نظر تشخیص مننژیت و سایر عفونت‌های سیستم عصبی مرکزی (CNS) با روش‌های ارزان و سریع ارزش حیاتی دارد. هدف این مطالعه، راه‌اندازی روش مولتی‌پلکس PCR برای تعیین باکتریایی بودن و نیز تشخیص افتراقی و همزمان سه عامل شایع مننژیت باکتریایی بود.

مواد و روش‌ها

سویه‌های باکتریایی، کشت و شمارش آنها: در این تحقیق سویه‌های باکتریایی از منابع مختلف تهیه شد و مورد بررسی قرار گرفت [۹]. هریک از باکتری‌ها، طبق روش‌های استاندارد در ۵ میلی‌لیتر محیط BHI Broth تلقیح و به‌مدت ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شد. سپس، از هر سویه باکتری رقت‌های سریالی $۱۰^{-۱}$، $۱۰^{-۲}$، $۱۰^{-۳}$، $۱۰^{-۴}$، $۱۰^{-۵}$، $۱۰^{-۶}$ و $۱۰^{-۷}$، تهیه شد و شمارش (با استفاده از روش شمارش کلونی) به‌عمل آمد. همچنین، محیط‌های کشت از نظر خالص بودن کنترل شدند. سپس، ژنوم هر نمونه استخراج و غلظت DNA با استفاده از روش اسپکتروفتومتری در طول موج ۲۶۰ نانومتر تعیین شد.

انتخاب پرایمر: پس از بررسی منابع و اطلاعات موجود در بانک ژنی، ترادفی از بخش مناسب ژن همگانی ۱۶SrRNA و نیز پرایمرهای اختصاصی برای باکتری‌های *نایسریا مننژیتیدیس*، *هموفیلوس انفلوانزا* و *استرپتوکوکوس پنومونیه* انتخاب شد و مورد بررسی قرار گرفت [۱۰]. ترادف پرایمرهای انتخابی در جدول ۱ ارایه شده است.

جدول ۱) پرایمرهای مورد استفاده

نام پرایمر	محل قرارگیری ۱۶srRNA	توالی '۳-'۵	تعداد نوکلئوتیدها
U۳	۵۰۹/۵۳۳	AACTCCGTGCCAG CAGCCGCGGTAA	۲۵
NM	۸۳۱-۸۴۷	TGTTGGGCAACCTG ATTG	۱۸
HI	۹۹۸-۱۰۱۵	CCTAAGAAGAGCTCA GAG	۱۸
STREP	۱۲۴۶/۱۲۶۳	GTACAACGAGTCGC AAGC	۱۸
U۸	۱۵۴۱-۱۵۱۷	AAGGAGGTGATCCA GCCGCAGGTTC	۲۵

بررسی نرم‌افزار مولکولی ژن و پرایمر ارایه‌شده (سیناژن؛ ایران) نشان داد که توالی انتخاب‌شده از ژن ۱۶SrRNA و ژن‌های اختصاصی، برای شناسایی طیف وسیعی از باکتری‌ها و نیز سه باکتری موردنظر مناسب بود. بررسی و انتخاب جفت‌پرایمرهای موردنظر برای تعیین میزان هومولوژی ناحیه انتخاب‌شده با ژنوم سایر میکروارگانیزم‌ها با استفاده از سایت NCBI و تکنیک Blast انجام شد. بعد از رقیق‌سازی، همه پرایمرها در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

آماده‌سازی و استخراج ژنوم باکتری‌ها: با روش کوتاه‌شده Salting out به شرح زیر انجام شد [۱۱].

Archive of SID
www.SID.ir

۱- یک میلی‌لیتر از کشت باکتریایی یا نمونه مایع نخاع به میکروتیوب‌های استریل منتقل شد.

۲- نمونه‌ها به‌مدت ۵ دقیقه با ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند و مایع رویی دور ریخته شد.

۳- به رسوب حاصل، ۲۰۰µl محلول STE افزوده و پس از مخلوط کردن به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد.

۴- به مخلوط حاصل، ۲۰۰µl SDS ۲٪ و متعاقبا، ۲۰۰µl سدیم‌استات ۳مولار افزوده و به‌آرامی مخلوط شد.

۵- مخلوط حاصل سانتریفیوژ (۵۰۰۰ دور در دقیقه، ۵ دقیقه، ۴ درجه سانتی‌گراد) شد.

۶- محلول رویی جدا و به لوله استریل جدید انتقال داده شد.

۷- یک میلی‌لیتر محلول اتانول ۱۰۰٪ به آن افزوده و به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری و در انتها سانتریفیوژ (۱۳۰۰۰ دور در دقیقه، ۲۰ دقیقه، ۴ درجه سانتی‌گراد) شد.

۸- محلول رویی دور ریخته و به رسوب حاصل، ۲۰۰µl ایزپروپانل افزوده و در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. به‌هنگام استفاده مجددا سانتریفیوژ (۱۵۰۰۰ دور در دقیقه، ۵ دقیقه، ۴ درجه سانتی‌گراد) شد.

۹- رسوب حاصل در ۲۵µl آب مقطر استریل حل شد.

۱۰- در نهایت، محصول استخراج‌شده روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شد.

اندازه‌گیری غلظت DNA: به‌منظور بررسی صحت روند انجام خالص‌سازی، غلظت نمونه‌ها به‌وسیله اسپکتروفتومتر (Techne؛ فرانسه) در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. با توجه به این‌که OD معادل ۱ برای DNA برابر با غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر است، میزان غلظت DNA استخراجی در نمونه‌ها محاسبه شد. همچنین، با محاسبه نسبت جذب نوری در ۲۶۰ نانومتر به جذب نوری در ۲۸۰ نانومتر، میزان خلوص DNA استخراجی محاسبه شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی (PCR): در دو مرحله صورت گرفت. در مرحله اول از دو پرایمر U۳ و U۸ استفاده شد. برای بهینه‌سازی دمای اتصال پرایمرها، ابتدا برای هریک از آنها آزمایش در دماهای ۶۵/۱، ۶۵/۵، ۶۶/۲، ۶۷/۳، ۶۸/۵، ۶۹/۹، ۷۱/۲، ۷۲/۵، ۷۳/۷، ۷۴/۷ و ۷۵/۳ درجه سانتی‌گراد انجام شد. در هر مرحله، یکی از دماها با هر یک از پرایمرها بررسی و سپس بهترین دما انتخاب شد. سایر شرایط بهینه در جدول ۲ و ۳ ارایه شده است.

جدول ۲) مقادیر مواد مختلف در مرحله بهینه‌سازی دما

ماده	غلظت نهایی	مقدار
dNTP (۱۰mM)	۰/۴mM	۰/۸µl
پرایمر U۳ (۲۰pmol) (رفت)	۰/۵pmol	۱µl
پرایمر U۸ (۲۰ pmol) (برگشت)	۰/۵pmol	۱µl
$MgCl_2$ (۵۰mM)	۱/۷۵mM	۰/۷µl
الگو (ژنوم باکتریایی)	-	۱µl
تگ DNAپلی‌مراز (۵۰۰U)	۱/۷۵U	۰/۷µl
بافر (10x)	۱X	۲µl
D.W	-	۱۲/۸µl
جمع	۲۰ µl	

جدول ۳) برنامه گرادیان دمایی ترموسایکلر

مرحله	تعداد چرخه	زمان	حرارت
Hot start	۱	۷min	۹۴°C
Denaturation	۲۸ چرخه	۱min	۹۴°C
Annealing		۱min	۶۵/۱، ۶۵/۵، ۶۶/۲، ۶۷/۳، ۶۸/۵، ۶۹/۹، ۷۱/۲، ۷۲/۵، ۷۳/۷، ۷۴/۷ و ۷۵/۳
Extention		۱min	۷۲°C
Final extention	۱	۶min	۷۲°C

در مرحله دوم، از محصول مرحله اول به‌عنوان الگو هم به‌صورت مستقیم و هم به‌صورت رقیق‌شده استفاده شد. بهترین واکنش در رقت یک‌هزارم حاصل شد. در این مرحله، از چهار پرایمر اختصاصی U۸، NM، HI و STREP برای آزمایش و بهینه‌سازی استفاده شد.

برای بهینه‌سازی شرایط دمایی هریک از پرایمرهای *نایسریا منتژیتیدیس* (NM)، *هموفیلوس انفلوانزا* (HI) و *استرپتوکوکوس پنومونیه* (STREP)، در حالی‌که غلظت سایر مواد ثابت بود، بهترین باند حاصل از PCR هر یک در دماهای ۶۵/۱، ۶۶/۲، ۶۶/۵، ۶۷/۳، ۶۸/۵، ۶۹/۶، ۷۱/۲، ۷۲/۵، ۷۳/۲، ۷۴/۷، ۷۴/۷ و ۷۵/۳ بررسی شد. برای بهینه‌سازی غلظت

Archive of SID
www.SID.ir

Mg^{2+}، از مقادیر ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸ و ۱ میکرولیتر از یون منیزیم استفاده و نتایج به‌دست‌آمده بررسی شد.

انجام واکنش به‌روش مولتی‌پلکس PCR: برای تشخیص همزمان سه عامل با انجام یک واکنش از سه پرایمر اختصاصی NM، HI و STREP و پرایمر U۸ استفاده شد. دمای استفاده‌شده برای اتصال پرایمرها ۷۲ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد. غلظت مواد استفاده‌شده در جدول ۴ ارایه شده است.

جدول ۴) مقادیر مواد در بهینه‌سازی مولتی‌پلکس PCR

ماده	غلظت نهایی	مقدار	ماده
dNTP(۱۰mM)	۰/۷µl	۰/۳۵mM	۰/۳۵mM
پرایمر NM (۲۰pmol) (رفت)	۰/۸µl	۰/۸pmol	۰/۸pmol
پرایمر HI (۲۰pmol) (رفت)	۰/۸µl	۰/۸pmol	۰/۸pmol
پرایمر STREP (۲۰pmol) (رفت)	۰/۸µl	۰/۸pmol	۰/۸pmol
پرایمر U۸ (۲۰ pmol) (برگشت)	۰/۸µl	۰/۸pmol	۰/۸pmol
$MgCl_2$ (۵۰mM)	۰/۸µl	۲mM	۲mM
الگو (ژنوم)	۰/۸µl	-	-
تگ DNAپلی‌مراز (۵۰۰U)	۰/۷µl	۱/۷۵U	۱/۷۵U
بافر (10x)	۱/۶µl	۰/۸ x	۰/۸ x
D.W	۱۲/۲µl	۰/۳۵mM	
جمع	۲۰µl		

مشاهده محصول PCR روی ژل آگارز: پس از استخراج ژنوم از نمونه‌های کشت باکتری یا مایع نخاع بیماران مبتلا به مننژیت طبق پروتکل و پروفایل حرارتی بهینه‌شده نهایی، واکنش PCR برای هریک از آنها انجام شد. همچنین، از ژل آگارز ۱٪ برای الکتروفورز محصولات PCR استفاده شد. به‌هنگام بارگذاری نمونه از بافر سنگین‌کننده 10X استفاده شد. این بافر سنگین‌کننده به‌صورت محلول باعث حفظ نمونه می‌شود و از خارج شدن آن از درون چاهک ژل جلوگیری می‌نماید. الکتروفورز با شدت جریان ۷۰ میلی‌آمپر و اختلاف پتانسیل ۸۵ ولت در ۵۰ دقیقه انجام شد. بعد از گذشت زمان موردنظر، ژل برای رنگ‌آمیزی و مشاهده باند به دستگاه ترانس‌ایلومیناتور (UVITEC) منتقل شد و باندهای مربوط به DNAی تکثیرشده مشاهده و با مقایسه با نردبان DNA تایید شد.

تایید محصول به‌وسیله برش آنزیمی: سه میکرولیتر از محصول مرحله دوم واکنش با سه میکرولیتر آنزیم Hae*III* درون میکروتیوب مخلوط و به‌مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس، محصول واکنش روی ژل آگارز الکتروفورز شد و باندهای ایجادشده با الگوی برش آنزیمی مقایسه گردید.

جدول ۵) اندازه‌گیری مقدار DNA بر حسب میکروگرم در میلی‌لیتر

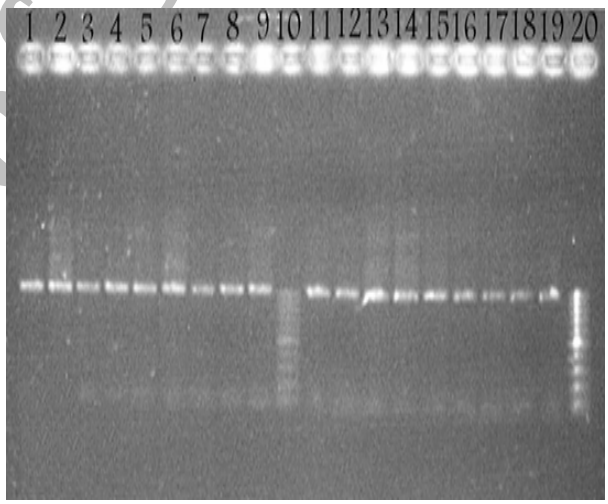
نام ارگانیزم‌ها	شماره سویه	غلظت DNA برحسب µg/ml	OD ۲۸۰ نانومتر	OD ۲۶۰ نانومتر
Escherichia coli	ATCC-۳۵۲۱۸	۲۸	۰/۴۲۹	۰/۵۶۰
Neisseria meningitidis	ATCC-۱۳۰۹۰	۴۷/۷	۰/۶۵۸	۰/۹۵۴
Haemophilus influenzae Type b	ATCC-۴۹۷۶۶	۳۵/۲	۰/۲۳۵	۰/۷۰۴
Neisseria meningitidis	PTCC-۱۵۰۷	۸۱/۲	۱/۲۳۱	۱/۶۲۴
Stereptococcus pyogenes group A	PTCC-۱۴۴۷	۳۰/۴	۰/۵۶۸	۰/۶۰۸
Kelebsiella pneumonia capsular type	PTCC-۱۲۹۰	۵۹/۵	۱/۰۶۳	۱/۱۹۰
Stereptococcus faecium	PTCC-۱۲۳۸	۱۸/۷	۰/۲۷۶	۰/۳۷۴
Stereptococcus fecalis	PTCC-۱۲۹۳	۱۲۶/۱	۱/۶۶۱	۲/۴۴۱
Shigella dysentriae serotype 6	PTCC-۱۲۳۸	۸۱/۴	۱/۳۹۷۱	۱/۶۲۸
Salmonella typhi	PTCC-۱۶۳۹	۸۳	۱/۵۹۰	۱/۶۶۰
Staphylococcus epidermidis	PTCC-۱۴۳۵	۶۳/۸	۱/۱۲۱	۱/۳۱۷
Stereptococcus pneumoniae	ATCC-۴۹۶۱۹	۲۶/۹	۰/۳۴۴	۰/۵۳۹
Heamophilus influenzae	ATCC-۴۹۷۶۶	۴۲/۱	۰/۶۱۲	۰/۸۴۲
Klebsiella pneumoniae	--	۴۲/۹	۰/۶۲۴	۰/۸۵۸
Pseudomonas aeroginosa	--	۸۲/۲	۱/۳۱۸	۱/۶۴۴
Streptococcus pneumoniae	--	۳۹/۵	۰/۵۹۴	۰/۷۸۹
Listeria monocytogenes	--	۴۱/۳	۰/۵۴۸	۰/۸۲۵
Staphylococcus aureus	--	۶۳/۹	۱/۰۴۹	۱/۲۹۷
Staphylococcus saprophyticus	--	۵۳/۷	۰/۷۹۰	۱/۰۷۳
Neisseria meningitidis sero groupe C	--	۴۲/۷	۰/۵۴۸	۰/۸۵۴

Archive of SID
www.SID.ir

نتایج

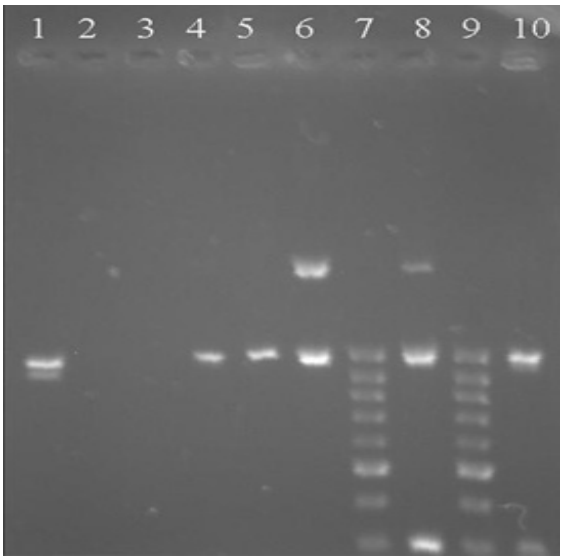
کشت سویه‌های باکتریایی و شمارش آنها: براساس نتایج کشت، باکتری‌ها خالص بودند. همچنین، رنگ‌آمیزی گرم در محیط BHI Broth، وجود باکتری یک‌دست را نشان داد. با افزودن گلیسرول۱۰٪ به محیط‌های کشت و نگهداری نمونه‌ها در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد، باکتری‌ها بیش از ۲ ماه نگهداری شدند. تعداد باکتری در هر میلی‌لیتر برای *نایسریا مننژیتیدیس* (ATCC 13090)، *هموفیلوس انفلوانزا* (ATCC 35056) و *استرپتوکوکوس پنومونیه* (ATCC 49619) به‌ترتیب برابر $۳/۹\times۱۰^{۶}$، $۲/۷\times۱۰^{۶}$ و $۴/۹\times۱۰^{۶}$ CFU/ml بود.

غلظت DNA استخراج‌شده از نمونه‌های باکتریایی: غلظت DNA حاصل برای هریک از باکتری‌ها در جدول ۵ نشان داده شده است.



شکل ۱) الکتروفورز محصول واکنش PCR ژنوم باکتری‌ها با استفاده از پرایمر عمومی (خطوط ۱۰ و ۲۰، نردبان ۱۰۰bp و سایر خطوط، ژنوم باکتری‌های مورد استفاده را نشان می‌دهند.)

بهینه‌سازی پرایمرها، شرایط دمایی و اتصال پرایمرها: پرایمر فراگیر (یونیورسال) قادر بود در مرحله اول واکنش وجود ژنوم باکتری را در محیط نشان دهد. چنان‌چه، پس از ایجاد شرایط مطلوب برای انجام واکنش PCR و ردیابی ژنوم باکتری‌های مختلف در شکل ۱ نشان داده شده است، در تمام موارد پس از رنگ‌آمیزی و مشاهده صفحات ژل، باندهای یکنواخت با اندازه یکسان (حدود ۱۰۰۰bp) حاصل شد که نشان‌دهنده تکثیر بخش موردنظر از ژن ۱۶SrRNA بود. همه سویه‌های مورداستفاده این باند را ایجاد نمودند، در حالی‌که در نمونه‌های کنترل منفی هیچ باندی مشاهده نشد (شکل ۲).

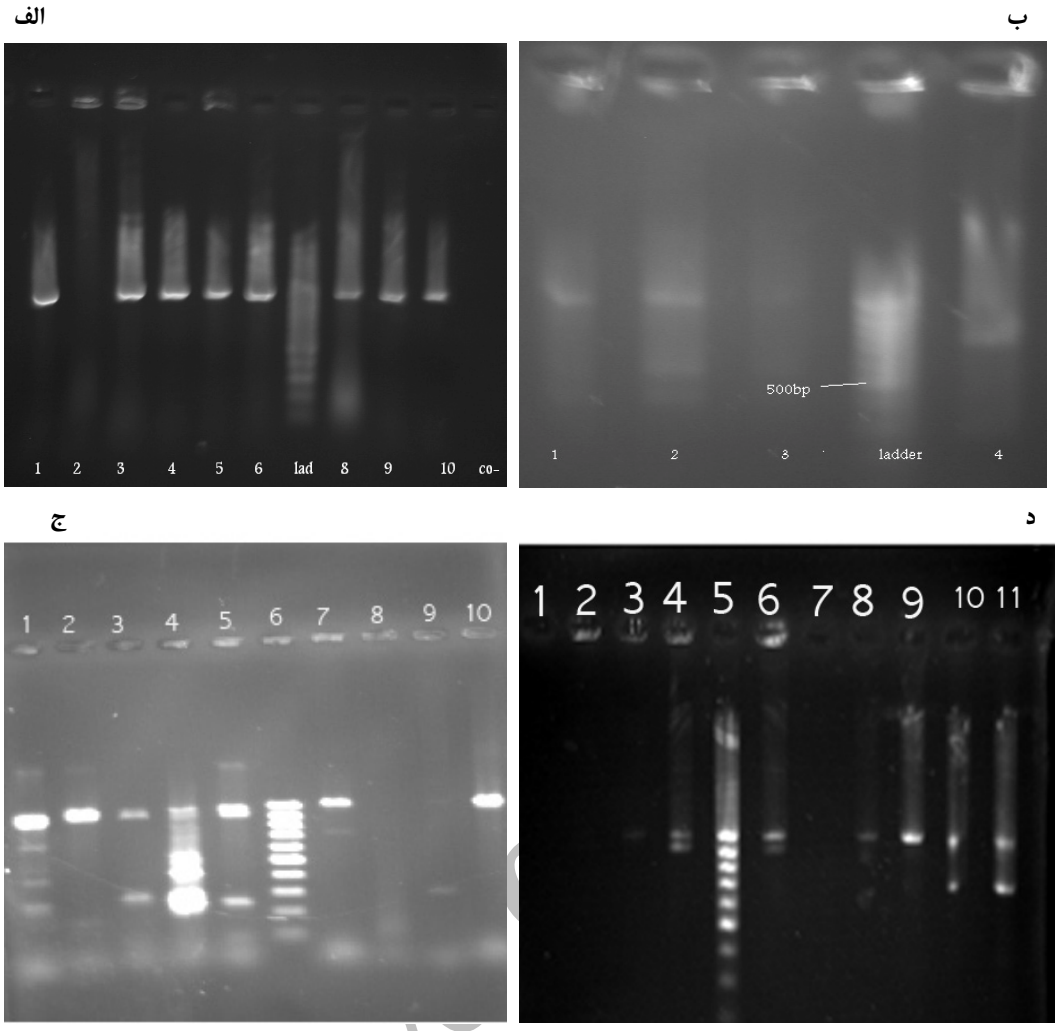


شکل ۲) الکتروفورز محصول PCR ژنوم باکتری‌های شایع عامل مننژیت و پرایمرهای اختصاصی (خطوط ۷ و ۹ نردبان ۱۰۰bp؛ خط ۱ پرایمر عمومی و ژنوم *نایسریا مننژیتیدیس*؛ خطوط ۲ و ۳ کنترل منفی؛ خطوط ۴ و ۵ *هموفیلوس انفلوانزا*؛ خطوط ۸ و ۱۰ ژنوم *استرپتوکوکوس پنومونیه* به همراه پرایمرهای عمومی و اختصاصی)

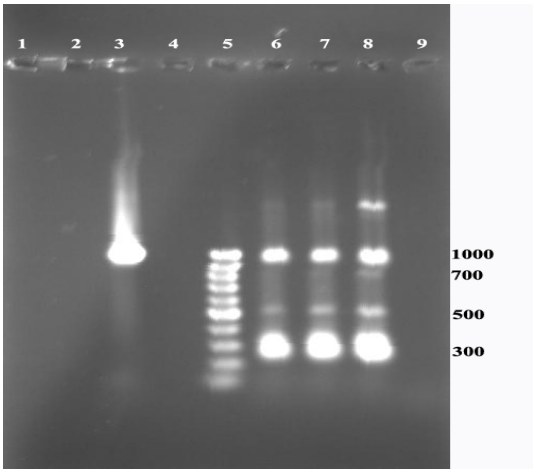
نتایج بهینه‌سازی چرخه دمایی برای باکتری‌های شایع عامل مننژیت در شکل ۳ نشان داده شده است. در قسمت "الف"، بهینه‌سازی دما برای پرایمر عمومی نشان داده شده است. دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای پرایمر عمومی بهترین باند را نشان داد (قسمت الف؛ خط ۵). در قسمت "ب"، بهینه‌سازی دما برای پرایمر اختصاصی *هموفیلوس انفلوانزا*، در دمای ۶۹/۶ درجه سانتی‌گراد بهترین باند را نشان داد (خط ۲). همچنین، در قسمت "ج"، بهینه‌سازی دما برای پرایمر اختصاصی *استرپتوکوکوس پنومونیه*، در دمای ۷۱/۲ درجه سانتی‌گراد بهترین باند را نشان داد (خطوط ۳ و ۵). در قسمت "د"، بهینه‌سازی دما برای پرایمر اختصاصی ژنوم *نایسریا مننژیتیدیس*، در دمای ۶۷/۳ و نیز در دمای ۷۲/۵ درجه سانتی‌گراد بهترین باند را نشان داد (خطوط ۱۱ و ۱۲).

بهینه‌سازی واکنش مولتی‌پلکسPCR: چنان‌چه در شکل ۴ نشان داده شده است، با استفاده از سه پرایمر اختصاصی و یک پرایمر عمومی، واکنش مولتی‌پلکسPCR برقرار شد. برش آنزیمی با Hae*III*، نتایج حاصل را تایید نمود.

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۳) بهینه‌سازی چرخه دمایی. الف) بهینه‌سازی دمایی در مرحله اول واکنش؛ ب) بهینه‌سازی دمایی در مرحله دوم واکنش برای *هموفیلوس انفلوانزا*؛ ج) بهینه‌سازی دمایی در مرحله دوم واکنش برای *استرپتوکوکوس پنومونیه*؛ د) بهینه‌سازی دمایی در مرحله دوم واکنش برای *نایسریا مننژیتیدیس*



شکل ۴) بهینه‌سازی شرایط مختلف واکنش مولتی‌پلکس PCR برای شناسایی *نایسریا مننژیتیدیس*، *هموفیلوس انفلوانزا* و *استرپتوکوکوس پنومونیه* (در خط ۱، ۲، ۴ و ۹ هیچ‌گونه نمونه‌ای بارگذاری نشده است. خط ۳، یک باکتری غیر از سه باکتری عامل شایع مننژیت را نشان داده است. خط ۵، نردبان DNA است. خط ۶، ۷ و ۸ نمونه بهینه‌شده واکنش مولتی‌پلکس PCR برای شناسایی باندهای ۷۰۰، ۵۰۰ و ۳۰۰ جفت‌بازی است.

چنانچه مشاهده می‌شود، در تمام موارد باند ۱۰۰۰جفت‌بازی که نشان‌دهنده باکتریایی بودن است دیده می‌شود.)

بحث

طی ۱۰ سال گذشته، پژوهشگران مزایای تشخیص مولکولی مبتنی بر PCR را مورد توجه قرار داده و در بسیاری از موارد اقدام به راه‌اندازی روش PCR برای تشخیص تنها یک باکتری نموده‌اند [۱۲]. زیرا این روش نسبت به روش‌های موجود نظیر کشت، از سرعت و دقت بیشتری برخوردار است. روش استاندارد طلایی برای شناسایی قطعی عوامل باکتریایی مننژیت کشت است. اما این روش تحت تاثیر درمان آنتی‌بیوتیکی (که در هنگام شک به مننژیت باکتریایی قبل از آنتی‌بیوگرام استفاده می‌شود) و نحوه انتقال نمونه که سبب مرگ باکتری می‌شود قرار می‌گیرد. به‌علاوه، این روش حداقل ۳۶ ساعت طول می‌کشد. در حالی‌که

Archive of SID
www.SID.ir

بیمار مبتلا به مننژیت ممکن است، در موارد عدم درمان در مدت کمتر از ۱۲ ساعت فوت نموده یا دچار ضایعات غیرقابل‌برگشت شود. در هر حال، مزایای روش‌های مبتنی بر PCR برای تشخیص سریع عوامل مختلف عفونت‌های میکروبی از جمله مننژیت باکتریایی توجه فراوانی را به خود مشغول کرده است. پژوهشگران با طراحی پرایمرهای مختلف، اقدام به توسعه روش PCR برای شناسایی *نایسریا مننژیتیدیس* نموده‌اند [۱۳، ۱۴]. ولی تشخیص یک باکتری تامین‌کننده نیاز بیمار نیست. از این‌رو، راه‌اندازی روش مولتی‌پلکسPCR که بتواند حداقل‌تعداد باکتری‌های شایع را پوشش دهد، مورد توجه قرار گرفته است [۱۵، ۱۶]. افزون بر اینها، استفاده از پرایمر عمومی امیدهای زیادی را برای تشخیص طیف وسیعی از باکتری‌ها به‌وجود آورده است، زیرا در باکتری‌ها، برخی از مناطق رمزکننده ژن ۱۶SrRNA و نیز ژن ۲۳SrRNA محافظت شده‌اند و در بسیاری از آنها تشابه فراوان وجود دارد. به این ترتیب، به‌عنوان ابزار مناسب برای ردیابی باکتری‌ها در نمونه‌های بالینی به‌ویژه در نمونه‌های CSF معرفی شده‌اند. در این تحقیق، از پرایمر ساخته‌شده از این ژن برای نشان دادن وجود باکتری در نمونه‌ها استفاده [۱۶] و وجود باکتری در نمونه‌ها نشان داده شد و با کاربرد پرایمرهای اختصاصی، امکان تشخیص سه باکتری شایع عامل مننژیت فراهم گردید.

هرچند همیشه خطر آلودگی و نتیجه مثبت یا حتی منفی کاذب وجود دارد، ولی در این تحقیق، بررسی همزمان ۲۰ باکتری فاقد نتیجه مثبت یا منفی کاذب بود. افزون بر این، می‌توان با در نظر گرفتن تمهیداتی از بروز پاسخ‌های ناخواسته پیشگیری نمود [۱۷]. در هر حال، باید توجه داشت که نگهداری مناسب و دستکاری هر نمونه‌ای برای تشخیص باکتری‌ها با PCR مرحله‌ای اساسی است.

روش کلاسیک استخراج DNA مبتنی بر انحلال ارگانیزم در حلال‌های آلی از قبیل "فنول- کلروفرم" و رسوب با اتانول یا ایزوپروپانول است. رسوب حاصل از برخی نمونه‌ها ممکن است به‌قدری کم باشد که قابل رویت نباشد. بنابراین، دستکاری رسوب مستلزم اعتماد به وجود ژنوم ارگانیزم به‌ویژه در جریان شست‌وشو است. بنابراین، به‌نظر می‌رسد، نتیجه به‌دست آوردن DNA از نمونه‌ای که تنها حاوی چند باکتری است، با اهداف آزمایش سازگار باشد.

در هر حال، امروزه اقدام ایده‌آل آن است که PCR فراگیر انجام شود و نواحی حفاظت‌شده‌ای را تکثیر نمایند که در انواع باکتری‌ها یافت می‌شود. در حقیقت، با پرایمر فراگیر، می‌توان وجود انواع مختلف باکتری را در نمونه ردیابی کرد [۱۸]. به این ترتیب، ترادف‌های مختلفی از ژن‌های فراگیر استفاده شده است. البته نظر به این‌که این روش از حساسیت زیادی برخوردار است، می‌تواند حتی باکتری‌های فلور طبیعی از جمله کوکوسی‌های گرم مثبت را نیز تشخیص دهد. این امر حاکی از آن است که عدم رعایت اصول انجام PCR اعتبار آن را به چالش می‌کشد. این امر برای تمام روش‌های PCR صدق می‌نماید. با وجود این، چنان‌چه در این تحقیق نشان داده شده است، بدون نیاز به دستگاه‌های پیچیده و گران‌قیمت، تشخیص سریع و افتراقی مننژیت باکتریایی از غیرباکتریایی امکان‌پذیر است و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، به‌طور همزمان با استفاده از روش مولتی‌پلکسPCR می‌توان باکتری را به‌طور اختصاصی شناسایی نمود.

در سال ۲۰۰۵ میلادی با استفاده از پرایمرهای تهیه‌شده از ژن‌های ctrA، ply و bex، روش مولتی‌پلکسPCR تک‌مرحله‌ای برای تشخیص همزمان *نایسریا مننژیتیدیس*، *استرپتوکوکوس پنومونیه* و *هموفیلوس انفلوانزا* طراحی شد و مورد ارزیابی قرار گرفت [۱۹]. پژوهشگران، حساسیت این روش را برای تنها سه باکتری فوق حدود ۹۳٪ بیان نموده‌اند. با این حال، درصورتی که در تحقیق آنها باکتری دیگری عامل مننژیت باشد، قابل تشخیص نبوده است. در حالی‌که در این تحقیق پرایمرهایی از نواحی محافظت‌شده ۱۶SrRNA باکتری‌های فوق و نیز بخش‌های فراگیر که در همه باکتری‌ها یکسان است، استفاده شد.

نتیجه‌گیری

علاوه بر اثبات وجود هر نوع عامل باکتریایی، امکان تشخیص سه عامل شایع مننژیت با حساسیت و اختصاصیت ۱۰۰٪ وجود دارد. تعیین ارزشمندی این روش مستلزم استفاده از آن برای تشخیص این باکتری‌ها در نمونه‌های بالینی است.

Archive of SID
www.SID.ir

منابع

1- Baron EJ. Implications of new technology for infectious diseases practice. Clin Infect Dis. 2006;43(10):1318-23.
2- Chanteau S, Sidikou F, Djibo S, Moussa A, Mindadou H, Boisier P. Scaling up of PCR-based surveillance of bacterial meningitis in the African meningitis belt: In disputable benefits of multiplex PCR assay in Niger. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2006;100:677-80.
3- Ataee RA, Mehrabi Tavana A, Ghorbani GH, Karimi-Zarchi AA, Hajia M, Hosseini SMJ, et al. Determination of bacteriological aetiology of 100 CSF samples of patients with meningitidis at four military hospitals in Tehran between 2003 and 2005. J Mil Med. 2005;7(1):49-56.
4- Espy JM, Uhe RJ, Sloan ML. Real-time PCR in clinical microbiology: Applications for routine laboratory testing. Clin Microbiol Rev. 2006;10(1):165-256.
5- Palka-Santini M, Cleven EB, Eichinger L, Kronke M, Krut O. Large scale multiplex PCR improves pathogen detection by DNA microarrays. BMC Microbiol. 2009;9:1-10.
6- Doern GV, Vautour R, Gaudet M. Clinical impact of rapid in vitro susceptibility testing and bacterial identification. J Clin Microbiol. 1994;32(7):1757-62.
7- Lu JJ, Perng CL, Lee SY. Use of PCR with universal primers and restriction endonuclease digestions for detection and identification of common bacterial pathogens in cerebrospinal fluid. J Clin Microbiol. 2000;38(6):2076-80.
8- Ataee RA, Mehrabi Tavana A, Safiri Z, Karami A, Izadi M, Hossaini MJ. Advantages of rapid diagnosis of bacterial meningitis by PCR in compare with direct microscopy and culture. Iran J Med Microbiol. 2007;1(1):61-6.
9- Ataee RA, Mehrabi Tavana A, Karami A, Izadi M, Hossaini SMJ, Safiri Z, et al. The assessment of universal primer for rapid detection of bacterial meningitis. Hakim Res J. 2009;11(4):27-32.
10- Stralin K, Ckman A, Holmberg H, Fredlund H, Olcen P. Design of a multiplex PCR for Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae, Mycoplasma pneumoniae and Chlamydophila pneumoniae to be used on sputum samples. APMIS. 2005;113(2):99-111.
11- Sombrook J, Rufell WD. Molecular cloning. 3rd ed. New York: Coldspring; 2001.
12- Sidikou F, Djibo S, Taha MK, Alonso JM, Djibo A, Kairo KK, et al. Polymerase chain reaction assay and bacterial meningitis surveillance in remote areas. Niger Emeging Infect Dis. 2003;9(11):1486-8.
13- Haolin NI, Angus I, Cartright K, Palmer WH, Mcfadden J. Polymerase chain reaction for diagnosis of meningococcal meningitis. Lancet. 1992;340(8833):1432-3.
14- Ataee RA, Zadegan MGA, Hajia M, Tavana AM, Godarzi Z, Nakhjavani F. Rapid diagnosis of Neisseria meningitides by PCR method. Yakhteh. 2006;8(30):92-7.
15- Radstrom P, Backman A, Qian N. 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.
16- Corless CE, Guiver M, Borrow R, Jones E, Fox JA, Kaczmarsk BE. Simultaneous detection of Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae and Streptococcus pneumoniae in suspected cases of Meningitis and Septicemia using real-time PCR. J Cli Microbiol. 2001;39(4):1553-8.
17- Villanueva AV, Podzorski RP, Reyes MP. Effects of various handling and storage conditions on stability of Treponema pallidum DNA in cerebrospinal fluid. J Clin Microbiol. 1998;36(7):2117-9.
18- Schuurman T, Boer FR, Kooistra-Smid MDA, VanZwet AA. Prospective study of use of PCR amplification and sequencing of 16s ribosomal DNA from cerebrospinal fluid for diagnosis of bacterial meningitis in a clinical setting. J Clin Microbiol. 2004;42(2):734-40.
19- Tzanakaki G, Tsopanomichalou M, Kesanopoulos K, Matzourani R, Sioumala M, Tabaki A, et al. Simultaneous single-tube PCR assay for the detection of Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae type b and Streptococcus pneumoniae. Clin Microbiol Infect. 2005;11(5):386-90.

Archive of SID

www.SID.ir

Kowsar Medical Journal
Volume 14, Issue 3, Fall 2009
Page: 21

Simultaneous detection of common bacterial meningitis: *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumonia* by multiplex PCR

Ataee R.[*] *PhD*, Mahrabi Tavana A.[1] *PhD*, Hossaini S.M.J.[2] *MD*, Karami A.[2] *PhD*, Safiri Z.[2] *MSc*, Allahverdi M.[1] *MSc*

Abstract

Aims. Rapid treatment of bacterial meningitis is a medical emergency. Reducing mortality is depending on rapid detection. Aim of this study was to setup multiplex PCR method for detection of common bacterial meningitis.

Materials & Methods. In this resaerch, the universal and specific primers were used. Genome of 20 bacterial strains were extracted and PCR was carried out under standarded condition in two steps. The PCR products were electrophoresed on 1% agarose and compared with standard strains. Results were confirmed by using Hea*III*.

Results. Genome extraction of at least 10 bacteria in millilitre of fluid culture was necessary for detection. Using the universal primer of 16SrRNA made possible the amplification of 1000bp sequence. This common sequence was seen in all studied bacterial strains. By using specific primers for *Nisseria meningitides, Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae* a 700bp, 500bp and 300bp sequence were produced, respectively.

Conclusion. The molecular method identifies bacterial meningitis within about 3 hours and recognizes its source. Using this method in medical laboratories improves the quality and also decrease the time of detection.

Keywords: Bacterial Meningitis, Simultaineus Diagnostic, Multiplex PCR

Archive of SID

Submission Date: 17/2/2009, Acceptation Date:12/7/2009

*Correspondence address: "Therapeutic Microbial Toxin Research Center" & "Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine", Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
ataee@bmsu.ac.ir
1 "Therapeutic Microbial Toxin Research Center" & "Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine", Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2 Molecular Biology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

www.SID.ir