

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

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

چکیده

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

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

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

استنتاج: خصوصیات کارایی هر دو روش PCR و کشت دارای مزایا و معایبی می باشد. لذا در فرایندهای بالینی استفاده از هر دو روش پیشنهاد می شود. به ویژه در مواردی که شک به آلودگی نمونه، حضور میکروارگانیسم های دیر رشد یا پرنیاز و مصرف آنتی بیوتیک وجود دارد.

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

مقدمه

مایع مغزی- نخاعی (CSF) بلافاصله به پزشک مربوطه گزارش می شود. مننژیت های حاد اغلب توسط باکتری ها و ویروس ها ایجاد می شود و علائمی چون تب، سردرد، استفراغ، ترس از نور و تغییرات رفتاری و غیره در این

عقونتهای سیستم اعصاب مرکزی (CNS) بسیار خطرناک و مرگ آفرین قلمداد می شوند. این عفونت ها توسط باکتری ها، قارچ ها، ویروس ها و حتی پارازیت ها بوجود می آیند و وجود هر نشانه مثبتی از این عوامل در نمونه

E-mail: sarokhani2002@yahoo.com

۴. کارشناس ارشد ایمونولوژی مری دانشگاه علوم پزشکی قزوین
۵. کارشناس آزمایشگاه دانشگاه علوم پزشکی قزوین

مؤلف مسئول: محمدرضا ساروخانی- قزوین، دانشگاه علوم پزشکی قزوین

۱. متخصص بیوتکنولوژی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی قزوین
۲- فوق تخصص عفونی اطفال، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی قزوین
۳. کارشناس ارشد میکروبیولوژی مری دانشگاه علوم پزشکی قزوین

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

بیماران دیده می شود که وجود آنها پزشک را به گرفتن مایع مغزی- نخاعی جهت تشخیص قطعی مجبور می سازد. استاندارد فعلی تشخیص مننژیت باکتریال، بررسی میکروسکوپی و کشت CSF می باشد (۲،۱). اما مشکل اصلی این روش عدم حساسیت (وجود منفی کاذب) و به ویژه طولانی بودن زمان پاسخ دهی است که در شرایط معمول حداقل ۲۴ تا ۴۸ ساعت و در مواقعی که تعداد میکروارگانیسم در نمونه کم است، نیاز به زمان بیشتری دارد. از طرفی در صورتی که بیمار مصرف آنتی بیوتیک داشته و یا میکروارگانیسم های دیر رشد و پرتوقع در کار باشند، حساسیت بررسی میکروسکوپی و کشت CSF مورد تردید قرار می گیرد (۳-۸). در دهه اخیر، روش های تکثیری بر مبنای PCR جهت تشخیص زودرس و دقیق مننژیت باکتریال معرفی شده اند که هدف بیشتر آنها ژن 16S rDNA است که در بیشتر باکتری های واقعی، این ژن با تغییرات بسیار اندکی حفظ شده است (۹-۱۳). روش طلایی و استاندارد در شناسایی آزمایشگاهی مننژیت باکتریال، نشان دادن میکروارگانیسم عامل در نمونه های CSF است و در حال حاضر نیز بطور متداول از این روش ها استفاده می شود (۲،۱). لیکن با معرفی روش های مولکولی و تکثیر ژنومی، عقیده قبلی متزلزل شده و برخی این روش ها را موثرتر می دانند (۱۳).

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

مواد و روش ها

این تحقیق در طی سال ۱۳۸۶ روی نمونه های ۱۰۰ بیمار با علائم بالینی مشکوک به مننژیت (با تأیید پزشک

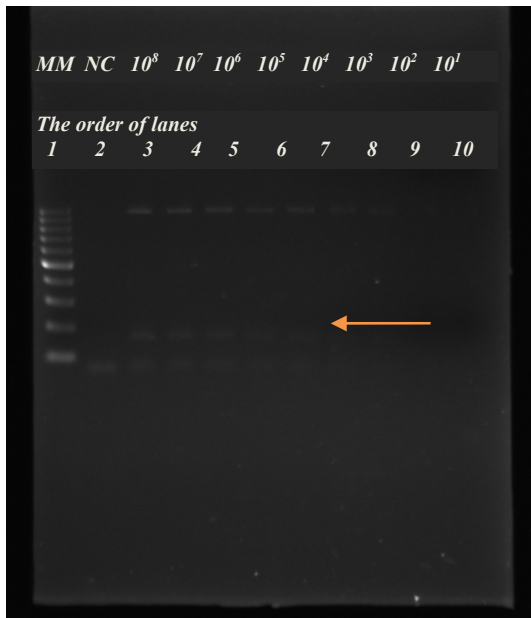
متخصص اطفال) مراجعه کننده به بیمارستان های دانشگاه علوم پزشکی قزوین صورت گرفت. اطلاعات دموگرافیک و نیز مرتبط با بیماری در قالب پرسشنامه ای از بیماران اخذ شد. در آزمایشگاه از هر نمونه CSF مقدار ۱۰۰ تا ۳۰۰ میکرولیتر در شرایط کاملاً استریل برداشته شد و در فریزر منهای ۸۶ درجه جهت مراحل بعدی استخراج و آزمون PCR نگهداری شد. مابقی حجم نمونه های CSF، مورد آزمون های استاندارد باکتریولوژیک (کشت و رنگ آمیزی گرم) واقع شد (۱). جهت استخراج DNA نمونه ها، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از CSF در لوله میکروسانتریفوز وارد و در حرارت آب جوش به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفت و سپس با نیروی سانتریفوژی ۱۰/۰۰۰g به مدت یک دقیقه رسوبات آن ته نشین شد (۱۴،۷). محتوای مناسب DNA سوپرناتانت هر لوله با استفاده از دستگاه جدید نانودراپ و مقایسه جذب در طول موج های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه گیری گردید. انتخاب پرایمرهای یونیورسال بر مبنای مقالات منتشر شده LU و Pandit بوده که مکمل نواحی حفظ شده ژن 16S rDNA می باشند. سکانس این پرایمرها به شرح زیر می باشند (۴-۶).

U1(F): 5'-CCAGCAGCCGCGGTA ATACG-3'
U2(R): 5'-ATCGG(C/A)TACCTTGTTACGACTTC--3'
این پرایمرها با سفارش در کمپانی ATG دانمارک سنتز شدند.

مخلوط واکنش PCR حاوی ۵ میکرولیتر (حدود ۵۰ نانوگرم) از استخراج DNA، ۱ میکرولیتر (۲۰ پیکومول) از هر یک از دو پرایمر U1 و U2، ۰/۳ میکرولیتر (۱/۵ واحد) از Taq پلی مرز با خلوص بالا، ۵ میکرولیتر از بافر 10X PCR، ۲/۵ میکرولیتر (۲/۵ میلی مول) از MgCl₂، ۰/۵ میکرولیتر (۰/۴mM) از dNTP و ۳۴/۷ میکرولیتر از آب مقطر (حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر) بود. تمام این مواد از کمپانی Fermentase تهیه شدند.

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

حساسیت آنالیتیکی روش برای تمام سه نوع سویه مشخص در حدود 10^2 تا 10^3 کلنی در میلی لیتر (حدود 10^1 نانوگرم در میکرولیتر) از CSF تعیین شد (تصویر شماره ۱).



تصویر شماره ۱: حساسیت روش PCR: رقت های سریالی از DNA باکتری E.coli تهیه و با روش 16S rDNA PCR و الکتروفورز ژل بررسی شده است. DNA های فوق از غلظت های 10^8 (ستون سوم از راست) تا غلظت 10^1 (ستون ۱۰ از سمت راست) واحد مولد کولونی در میلی لیتر از باکتری مذکور استخراج شده اند. به طوری که ملاحظه می شود DNA لوله تا رقت 10^2 واحد مولد کولونی همچنان توانسته باند مشخص مورد انتظار (996 bp) را ایجاد نماید (فلش). کنترل منفی (ستون ۲) و سایز مارکر (ستون ۱) نیز ملاحظه می شوند.

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

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

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

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

از نرم افزار SPSS ویرایش ۱۳/۵ جهت آنالیزهای آماری تعیین خصوصیات کارایی تست، شامل ویژگی و حساسیت و استفاده شد. ضریب کاپا نیز جهت بررسی توافق دو روش با همین نرم افزار محاسبه گردید. در این روش که برای مواردی است که نمی توان هیچ یک از دو روش مورد بررسی را به عنوان روش مرجع و طلایی در نظر گرفت و پارامترهای کارایی روش دیگر را با آن مقایسه کرد؛ با استفاده از جداول ویژه ای مقادیر انطباق و عدم انطباق داده های دو روش درج و سپس با محاسبه میزان توافق شانس، ضریب کاپا یا میزان توافق دو روش بدست می آید.

یافته ها

از ۱۰۰ بیمار مورد مطالعه ۷۰ نفر مذکر و ۳۰ نفر مونث بودند. میانگین سنی بیماران 8 ± 12 ماه به دست آمد. ۷۴ نفر از بیماران قبل از گرفتن نمونه CSF مصرف آنتی بیوتیک داشته و ۲۶ نفر مسابقه مصرف آنتی بیوتیک نداشتند.

جدول شماره ۱: انواع سویه های باکتریائی جدا شده با روش کشت

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

آنتی بیوتیک داشته اند ۳۸ مورد کشت منفی ولی PCR مثبت و ۲۴ مورد کشت و PCR هر دو مثبت و ۱۲ مورد کشت و PCR هر دو منفی بوده اند. (جدول شماره ۲) (مثال این موارد در تصویر شماره ۲ ارائه شده است).

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

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

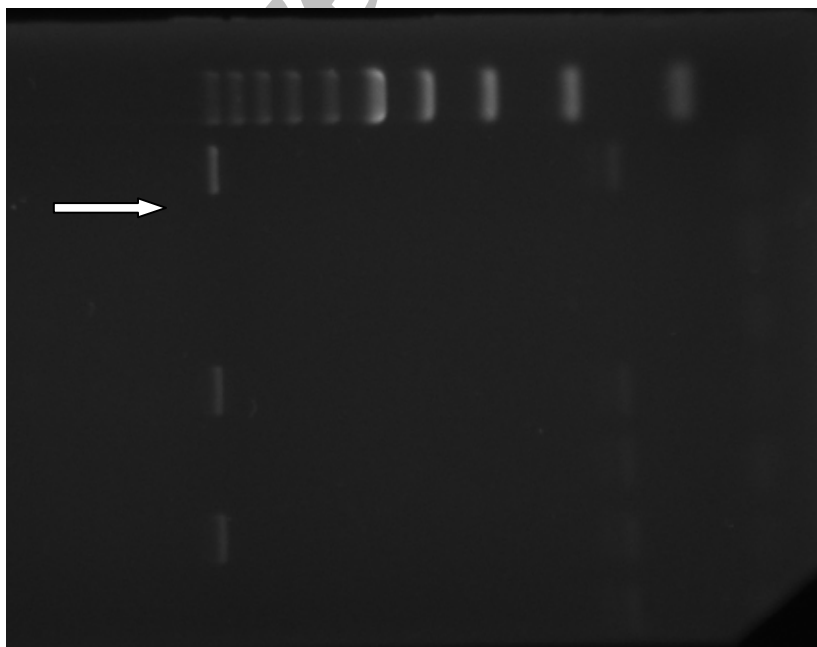
مصرف آنتی بیوتیک (n=74)			عدم مصرف آنتی بیوتیک (n=26)		
کشت		PCR	کشت		PCR
-	+		-	+	
۳۸	۲۴	+	۰	۱۲	+
۱۲	۰	-	۱۴	۰	-

از ۲۶ بیماری که قبل از نمونه گیری مصرف

آنتی بیوتیک نداشته اند، ۱۲ مورد کشت مثبت و PCR

مثبت و در ۱۴ مورد کشت منفی و PCR منفی بوده

است. اما از ۷۴ بیماری که قبل از نمونه گیری مصرف



تصویر شماره ۲: مثالی از نمونه های CSF مثبت و منفی که با روش 16S rDNA PCR تعیین گردیده اند. از بالا به پایین: سایز مارکر باده قطعه 100 bp، کنترل مثبت، کنترل منفی و نمونه های +، -، + و - به ترتیب زیر دیده می شوند. نمونه منفی: بیماری که کشت وی هم منفی بوده است (عدم مصرف آنتی بیوتیک) نمونه مثبت: بیماری که کشت وی منفی بوده است (مصرف آنتی بیوتیک). نمونه منفی: بیماری که کشت وی هم منفی بوده است (مصرف آنتی بیوتیک) نمونه مثبت: بیماری که کشت وی هم مثبت بوده است (مصرف آنتی بیوتیک) نمونه منفی: بیماری که کشت وی هم منفی بوده است (عدم مصرف آنتی بیوتیک). فلش باند مورد انتظار را نشان می دهد.

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

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

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

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

بحث

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

نشان داده نشده‌اند).

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

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

به هر حال در کلینیک و آزمایشگاهها بروز همه این حالات محتمل است و این تحقیق در صدد بررسی وضعیت دو روش مختلف در شرایط موجود می‌باشد. در این مطالعه از پرایمرهای ویژه نواحی کاملاً ثابت (conserved) ژن 16S rDNA که در ژنوم تمام باکتری‌ها و با کپی بالا موجود است و وجود تمام انواع

یو باکتری‌ها را نشان می‌دهد، استفاده شد تا بتواند بطور کلی مننژیت‌های باکتریال از ویرال را افتراق دهد. لیکن در مطالعات دیگر از پرایمرهای ویژه گونه‌های موجد مننژیت‌های باکتریال نظیر مننگوکک، لیستریا و پنوموکک و هموفیلوس استفاده شده است که اگرچه موجب اختصاصیت بالای تشخیص شده لیکن در این مطالعات هدف صرفاً جداسازی مولکولی آن گونه خاص و توان روش PCR در نشان دادن آن بوده است (۱۰،۹،۷،۳). اما حتی با استفاده از تکثیر ژن 16S rDNA با پرایمرهای یونیورسال مورد استفاده در این تحقیق نیز می‌توان با استفاده از آنزیم‌های محدودگر (RE) روش مولکولی RFLP را روی آمپلیکون به انجام رساند و گونه‌های ویژه باکتریایی را تفکیک نمود.

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

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

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

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

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

سپاسگزاری

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

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

References

1. Mahon C, Manuselis G, Lehman D, (eds). Text book of Diagnostic Microbiology. 3rd edition. Missouri, USA: Saunders Elsevier publication; 2006.
2. Xu J, Millar B.C, Moore J.E, Murphy K, Webb H, Fox AJ, et al. Employment of broad-range 16S rRNA PCR to detect aetiological agents of infection from clinical specimens in patients with acute meningitis. Rapid separation of 16S rRNA PCR amplicons without the need of cloning. Appl Microbiology 2003; 94: 197-206.
3. Corless C.E, Guiver M, Borrow R, Edwards Jones V, Fox A.J, Kaczmarek E.B. Simultaneous detection of Neisseria meningitidis, haemophilus influenzae, and streptococcus pneumonia in suspected cases of meningitis and septicemia using real-time PCR. J Clin Microbiol 2001; 39(4): 1553-1558.
4. Pandit L, Kumar S, Karunasagar I, Karanasagar ID. Diagnosis of partially treated culture-negative bacterial meningitis using 16 S rRNA universal primers and restriction endonuclease digestion. J Med Microbiol 2005; 54: 539-542.
5. Lu J, Perng C, Lee S, Wan C. Use of PCR with universal primers and restriction endonuclease digestion for detection and identification of common bacterial pathogens in cerebrospinal fluid. J Clin Microbiol 2000; 38(6): 2076-80.
6. Schurman T, Boer R, Kooistra-smid A.M, Vanzwet A. prospective study of use of PCR amplification and sequencing meningitis of 16S ribosomal DNA from CSF for diagnosis of bacterial meningitis in a clinical setting. J Clin Microbiol 2004; 42(2): 734-740.
7. Nakhjavani F.A, Bonakdar F, Kalani M.T, Kazemi B, Nouri J, Azadi N, et al. Detection of haemophilus influenzae type B in cerebrospinal fluid of suspected children with meningitis by PCR. Med J Islamic Republic of Iran 2005; 19(2): 181-184.
8. Kotilinen P, Jalavi J, Meurman O, Lethonen O, Rintala E, Seppala O, et al. Diagnosis of meningococcal meningitis by broad range bacterial PCR with cerebrospinal fluid. J Clin Microbiol 1998; 36(8): 2205-2209.
9. Jatton K. Development of polymerase chain reaction assay for detection of listeria monocytogenes in clinical cerebrospinal fluid samples. J Clin Microbiol 1992; 30(8): 1931-1936.
10. Abdel Salam H.A. Direct PCR assay for detection of Neisseria meningitidis in human cerebrospinal fluid. Folia Microbiol (Praha) 1999; 44(6): 697-702.
11. Lin H.W. Use of Universal polymerase chain reaction assay and endonuclease digestion for detection of Neisseria meningitidis. J Microbiol Immunol Infec 2004; 37(6): 371-374.

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

Archive of SID