ارزیابی پرایمر عمومی جهت تشخیص سریع منشأیت باکتریال

دکتر رمضانعلی عطائی[۱*]، دکتر علی مهرابی‌توانا[۲]، دکتر علی کرمی[۲]، دکتر مرتضی ایزدی[۳]، دکتر سیدمحمدجواد حسنی[۲]، زهرا سفیری[۲]، محمد الله‌وردی[۱]

۱- گروه میکروب‌شناسی، مرکز تحقیقات کاربرد درمانی توکسین‌های میکروبی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا... ۲- مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا... ۳- مرکز تحقیقات بهداشت، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...

دریافت: ۸۷/۴/۲۰ پذیرش: ۸۷/۱۰/۲۲

Title: *The Assessment of Universal Primer for Rapid Detection of Bacterial Meningitis*

Authors: *Ataee RA, (PhD); Mehrabi Tavana A, (PhD); Karami A, (PhD); Izadi M, (MD); Hossaini SMJ, (MD); Safiri Z, (MSc); Aalahverdi M, (MSc).*

Introduction: *The aim of this study was to design a molecular detection for differentiation of bacterial from nonbacterial meningitis.*

Methods: *In this research, the universal primer was used. The DNA of 20 bacterial strains was extracted. Eubacterial 16SrRNA gene fragments (16S rDNA) were amplified by PCR with broad-range ribosomal primers. The PCR was curried out under optimized standard conditions. The PCR products were electrophoresed on agarose 1 % and compared with standard strains. The high specificity of the PCR assay was documented after testing bacteria of 20 different species.*

Results: *At least 10 bacteria could be found in 1 ml of fluid culture. The use of universal primer which contains 16SrRNA could be suitable amplification of a sequence with 1000bp. This sequence was found very similar in nearly all bacteria. Twenty different bacterial strains were tested. The sequence (1000bp) was seen in all bacterial strains applied in this study.*

Conclusion: *Use of this molecular method for any bacterial meningitis is applicable because of fast diagnosis in 3 hours, differentiating bacterial meningitis from non-bacterial, and finally the effective treatment of patients suffered with the disease. The method is effective in developing and developed countries.*

Keywords: *Bacterial meningitis, diagnosis, primer 16S rRNA, PCR.*

Hakim Research Journal 2009; 11(4): 27- 32.

* نویسنده مسؤول: دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...، دانشکده پزشکی، گروه میکروب‌شناسی، تلفن و نمابر: ۲۶۱۲۷۲۵۸

پست الکترونیک: ataee@bmsu.ac.ir

[Downloaded from hakim.tums.ac.ir on 2026-01-26]

چکیده

مقدمه: *درمان فوری مننژیت باکتریال به عنوان یک اورژانش پزشکی مورد توجه قرار گرفته است. زیرا می‌تواند از مرگ‌ومیر و یا عوارض بعدی پیشگیری نماید. از این رو، تشخیص سریع مننژیت باکتریال بسیار حایز اهمیت است. به علاوه، اقدام مناسب درمانی مستلزم تشخیص افتراقی صحیح می‌باشد. هدف این تحقیق طراحی روش تشخیص مولکولی جهت تفکیک مننژیت باکتریال از مننژیت غیرباکتریال است.*

روش کار: *در این تحقیق، از پرایمر universal استفاده شد. در حقیقت، این پرایمر در بر دارنده بخشی از ژن رمز کننده 16S rRNA با ترادف مشخص است که در تمام باکتری‌ها به صورت یک بخش حفاظت شده وجود دارد. ژنوم ۲۰ سویه باکتریایی استخراج و با شرایط استاندارد شده، PCR انجام گردید. محصول با ژل ۱٪ آگاروز الکتروفورز و با مقایسه با نمونه‌های استاندارد نتایج آنالیز گردید.*

یافته‌ها: *استخراج نمونه باکتریایی حاوی حداقل ۱۰ عدد باکتری در هر میلی‌لیتر امکان ردیابی آن را اثبات نمود. چنانچه استفاده از پرایمر universal ساخته شده از ژن 16S rRNA امکان تکثیر یک قطعه ۱۰۰۰ جفت بازی را تکثیر می‌نماید که در تمام باکتری‌ها مشابه است. هر یک از ۲۰ گونه باکتریایی استفاده شده در این تحقیق همگی قابل ردیابی و در الکتروفورز باند مزبور را نشان دادند.*

نتیجه‌گیری: *طبق یافته‌های این تحقیق، با استفاده از روش مولکولی می‌توان در فاصله ۳ ساعت وجود عفونت باکتریایی را نشان داد؛ بین مننژیت باکتریال از غیرباکتریال افتراق ایجاد نمود درمان مؤثر بیمار مبتلا به مننژیت باکتریال و نجات او. نتایج این تحقیق نشان‌دهنده سرعت، ارزانی و روشی مؤثر برای تشخیص سریع مننژیت باکتریال به ویژه در کشورهای در حال توسعه می‌باشد. احتمالاً با استفاده از این روش در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی بتوان سطح بهداشت و سلامت جامعه را ارتقا داد.*

گل‌واژگان: *پرایمر 16S rRNA، مننژیت باکتریایی، تشخیص سریع و PCR.*

مقدمه

تشخیص سریع مننژیت باکتریال و درمان به موقع یکی از اورژانس‌های مهم پزشکی است که می‌تواند از بروز عوارض و پیامدهای ناگوار این بیماری پیشگیری نماید. امروزه روش‌های تشخیص مبتنی بر اسیدهای نوکلئیک از ویژگی‌های سرعت عمل و حساسیت بالا برخوردار بوده و می‌توان با کمک این روش‌ها، مستقیماً عامل عفونی را در نمونه‌های بالینی تشخیص داد (۱). با این حال، تشخیص ارگانیسم مسؤول عفونت با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ممکن است با از دست دادن برخی ارگانیسم‌ها همراه باشد (۲) زیرا، تغییرات مختلف با ظهور سویه‌های متعدد همراه است (۳). در برخی از کشورها کاربرد گسترده تکنیک تکثیر همزمان DNA[1] جهت تشخیص همزمان عامل بیماری و تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن در آزمایشگاه‌های میکروب شناسی پزشکی در حال گسترش است. زیرا، با استفاده از این تکنولوژی می‌توان عوامل عفونی باکتریال و ویرال را به‌طور همزمان تشخیص داد (۴). به همین خاطر در کشور ما بیش از ۵۰ دستگاه وارد شده است. ولی با آن که نتایج برخی از تحقیقات حاکی از آن است که استفاده از روش تشخیصی پیشرفته منجر به صرفه‌جویی هزینه‌های درمانی می‌گردد (۵). در کشور ما، تحمیل هزینه‌های سنگین؛ به کارگیری روش‌های پیشرفته PCR را با محدودیت مواجه ساخته است. افزون بر این‌ها، اتیولوژی برخی از عفونت‌های سیستم اعصاب مرکزی ویروسی یا باکتریایی است و افتراق آن نقش اساسی در انتخاب درمان مناسب دارد (۶). به علاوه، در حالتی که باکتری بیماری‌زا در نمونه بالینی غیرقابل کشت یا برای رشد به زمان طولانی نیاز داشته باشد، استفاده از این روش‌ها اجتناب‌ناپذیر می‌گردد. با توجه به این که مایع مغزی نخاعی محیطی[2] عاری از میکروب در نظر گرفته می‌شود؛ تشخیص حتی یک باکتری در آن اهمیت بالینی زیادی در زمینه اثبات عفونت و انتخاب نوع درمان دارد. افزون بر این، در سال‌های اخیر نشان داده شده است که ایجاد برخی بیماری‌ها از جمله:

[1] Real Time-PCR

[2] Cerebrospinal fluid (CSF)

[Downloaded from hakim.tums.ac.ir on 2026-01-26]

آلزایمر و اماس با دخالت میکروارگانیسم‌هاست (۷ و ۸). لذا، تشخیص چند ارگانیسم با یک پروتکل استاندارد در نمونه CSF بیمار نقش حیاتی جهت تشخیص این بیماری‌ها دارد. به این ترتیب تلاش‌های زیادی در جریان است تا روشی طراحی گردد که قادر باشد در مرحله اول وجود طیف وسیعی از ارگانیسم‌ها را اثبات نماید (۹). از این رو، کشف و تعیین کمیت ارگانیسم‌ها در CSF از نظر تشخیص مننژیت و سایر عفونت‌های سیستم اعصاب مرکزی[3] با روش‌های ارزان و سریع ارزش حیاتی دارد. از این رو، هدف این مطالعه ارزیابی جنبه‌های مختلف تشخیص باکتری‌های شایع عامل مننژیت با استفاده از توسعه روش PCR با کاربرد پرایمر عمومی است.

روش کار

سویه‌های باکتریایی، کشت و شمارش آنها: در این تحقیق سویه‌های باکتریایی از منابع مختلف تهیه و مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۱). هر یک از باکتری‌ها را طبق روش‌های استاندارد باکتریولوژیک در ۵ میلی‌لیتر محیط BHI Broth تلقیح و به‌مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری گردید. سپس از هر یک؛ رقت‌های سریال: ۱۰-۱، ۱۰-۲، ۱۰-۳، ۱۰-۴، ۱۰-۵، ۱۰-۶، ۱۰-۷ تهیه و شمارش (با استفاده از روش کلونی کانت) به عمل آمد. همچنین، محیط‌های کشت از نظر خالص بودن بررسی شدند. سپس از هر نمونه استخراج ژنومی انجام و غلظت DNA در هر یک با استفاده از روش اسپکتروفتومتری و طول موج ۲۶۰ نانومتر تعیین گردید.

محیط‌های کشت: Thayer– Martin Agar و BHI Broth، BHI Agar، Blood agar base، معرف اکسیداز و تست‌های افتراقی، مواد و وسایل الکتروفورز از نمایندگی شرکت Merck تهیه گردید. سرسمپلر کریستالی، پرایمرها، آنزیم Taq پلی‌مراز و نوکلئوتیدها از شرکت سیناژن خریداری شد.

انتخاب پرایمر: پس از بررسی منابع و اطلاعات موجود در بانک ژنی در خصوص ترادف مختلف از ژن همه‌گانی 16S rRNA، بخش مناسبی از آن برای انجام PCR انتخاب و مورد بررسی قرار گرفت. به این ترتیب که از بین پرایمرهایی که تعداد بیشتری گزارش وجود داشت و نیز با توجه به ترادف ژنی 16S rRNA باکتری E.coli بخش مناسب انتخاب و مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس میزان حساسیت و اختصاصیت پرایمرها و نتایج آنالیز آنها با نرم‌افزار ملکولی BLAST پرایمر مطلوبی با مشخصات ذکر شده در جدول ۲ انتخاب گردید. بررسی نرم‌افزار مولکولی ژن و پرایمر ارایه شده نشان داد که سکانس انتخاب شده از ژن 16S rRNA مناسب‌ترین ژن برای شناسایی طیف وسیعی از باکتری‌هاست. سپس این پرایمر سفارش داده شد.

جدول ۱- سویه‌های باکتریایی استفاده شده در این تحقیق

نام ارگانیسم‌ها	شماره سویه	محل تهیه
Escherichia coli	ATCC-35218	از نمایندگی شرکت Mast
Neisseria meningitidis	ATCC-13090	
Haemophilus influenzae Type b	ATCC 49766	
Neisseria meningitidis	PTCC 1507	از مرکز کلکسیون باکتری‌ها در سازمان پژوهش‌های علمی صنعتی ایران
Stereptococcus pyogenes group A	PTCC 1447	
Kelebsiella pneumonia capsular type	PTCC 1290	
Stereptococcus faecium	PTCC.1238	
Stereptococcus fecalis	PTCC.1293	
Shigella dysentriae serotype 6	PTCC.1238	
Salmonella typhi	PTCC.1639	
Staphylococcus epidermidis	PTCC.1435	
Stereptococcus pneumoniae	ATCC.49619	آزمایشگاه مرکز رفرانس وزارت بهداشت
Heamophilus influenzae	ATCC.49766	
Klebsiella pneumoniae	--	از آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...
Pseudomonas aeroginosa	--	
Streptococcus pneumoniae	--	
Listeria monocytogenes	--	
Staphylococcus aureus	--	
Staphylococcus saprophyticus	--	
Neisseria meningitidis sero groupe C	--	

جدول ۲- سکانس پرایمرهای عمومی انتخاب شده به منظور ردیابی ژنوم باکتری‌ها

Primers	Position 16srRNA Sequence of E.coli (region)	Sequences(5' to 3')
U3	509-533	AACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAA
U8	1541-1517	AAGGAGGTGATCCAGCCGCAGGTTC

[3] Central nervus system (CNS)

[Downloaded from hakim.tums.ac.ir on 2026-01-26]

استخراج ژنوم از محیط کشت: ۱ میلی‌لیتر از هر یک از نمونه‌های باکتریایی موجود در محیط BHI broth به میکروتیوپ‌ها منتقل و به مدت ۵ دقیقه با دور g ×۵۰۰۰ سانتریفیوژ شد. مایع رویی تخلیه و به رسوب ۲۰۰ میکرولیتر بافر STE (1 mM EDTA, 0.1 M Nacl, 10 mMtrisHcl, pH= 8) اضافه و به‌طور کامل مخلوط گردید. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در حرارت آزمایشگاه قرار داده شد. پس از آن ۲۰۰ میکرولیتر استات سدیم ۳ مولار با pH= ۵/۲ اضافه گردید. سپس هر یک از تیوب‌های فوق را ۱۰ بار سر و ته نموده و به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ (g ×۵۰۰۰ و دمای $^{\circ}C$۴) شد. مایع رویی را به لوله‌های دیگر منتقل و سه برابر حجم آن اتانل ۱۰۰ درجه اضافه و مدت ۱۰ دقیقه در منهای $^{\circ}C$ ۲۰ قرار داده شد. سپس نمونه‌ها را از فریزر خارج و ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده و سانتریفیوژ (g ×۱۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه و دمای $^{\circ}C$۴) شدند. مایع رویی دور ریخته و به رسوب ۲۰۰ میکرولیتر الکل ۷۰ درجه اضافه گردید. و پس از ۵ دقیقه قرار گرفتن در دمای آزمایشگاه سانتریفیوژ (g ×۱۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه و دمای $^{\circ}C$۴) گردید. مایع رویی تخلیه و لوله‌ها را به‌صورت وارونه در آزمایش قرار داده تا خشک شود. پس از آن ۵۰ میکرولیتر آب مقطر تزریقی به رسوب اضافه شد و کاملاً مخلوط و تا زمان انجام PCR در منهای $^{\circ}C$ ۲۰ نگهداری شدند.

روش تخمین مقدار DNA بر اساس تعداد باکتری (CFU) انجام شد. از آنجایی که هر باکتری دارای یک کروموزوم است و در صورتی که کشت داده شود، هر باکتری قادر به تولید یک کلونی می‌باشد. از سوسپانسیون باکتری رقت تهیه گردید و بر اساس روش Misra & Miles میزان باکتری در واحد حجم بر اساس CFU تخمین زده شد. روش تعیین مقدار DNA بر اساس میزان حساسیت رنگ اتیدیوم بروماید؛ با توجه به این که توانایی روش الکتروفورز در رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید در تعیین DNA در بهترین شرایط یک نانوگرم می‌باشد صورت گرفت (۱۰). لذا نمونه خالص شده از محیط کشت به صورت رقت سریالی یک دوم تا یک هشتادم رقیق گردید و ضعیف‌ترین باند انتخاب شد.

انجام واکنش PCR و بهینه‌سازی آن: برای رسیدن به این هدف بیش از ۷۸ بار فرآیند PCR با ژنوم سویه‌های استاندارد انجام شد. در هر مرحله یکی از غلظت‌های مواد اولیه (پرایمرها،MgCl2، dNTP و آنزیم Taq پلی‌مراز) و یا شرایط فیزیکی از جمله درجه حرارت استفاده شد و در نهایت مناسب‌ترین مقادیر مواد لازم برای انجام PCR انتخاب گردید.

دمای اتصال پرایمرها، پروفایل‌های حرارتی و زمان در واکنش تغییر داده شد تا بهترین شرایط PCR فراهم گردد. جهت بهینه‌سازی دمای اتصال پرایمرها (Annealing) از درجه حرارت‌های ۵۶، ۵۷ و ۵۸/۸، ۵۹/۹، ۶۱/۲، ۶۲/۷،۶۳/۲، ۶۵، ۶۷، ۶۹، ۷۰، ۷۱، ۷۲، ۷۳، ۷۴ درجه سانتیگراد استفاده شد.

نتایج

بررسی محیط‌های کشت نشان داد هر یک از سویه‌های مورد استفاده فاقد آلودگی بوده و تنها از یک جمعیت تشکیل شده بود. شمارش تعداد باکتری‌های موجود در هر میلی‌لیتر هر یک از محیط‌های کشت ^{6}۱۰ عدد باکتری تعیین گردید. نتایج استفاده از پرایمر عمومی و بیهنه‌سازی شرایط، دماها، دوره زمانی و غلظت‌های مختلف مواد برای دستیابی به بهترین نتیجه PCR و ردیابی باکتری‌های مورد آزمایش در جدول ۳ و ۴ نشان داده شده است. شرایط بهینه شده دوره‌های زمانی دستگاه PCR در جدول ۳ ارایه شده است. در این تحقیق شرایط مطلوب به دست آمده عبارت بود از: مراحل Primary denaturation و Anealing Final تنها شامل یک سیکل؛ مراحل ۲، ۳ و ۴ به تعداد ۲۸ سیکل حاصل گردید. برای انجام PCR در این تحقیق تنظیم و تناسب غلظت مواد مصرفی از قبیل غلظت پرایمرها، آنزیم Tag پلی‌مراز، MgCL و dNTPs طی ۷۸ مرحله تکرار آزمایش به دست آمد (جدول ۴).

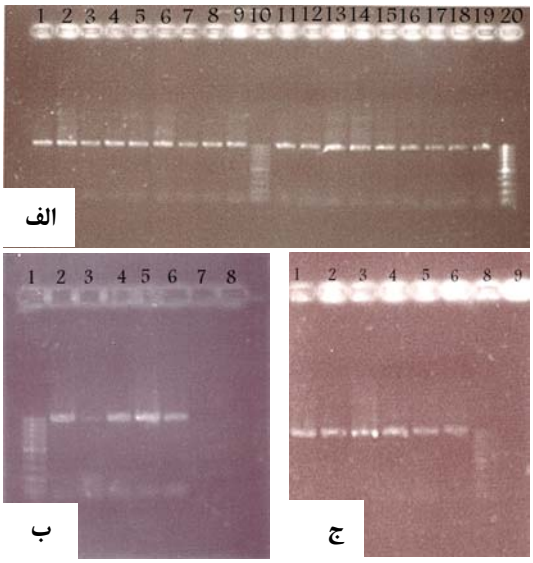
جدول ۳- درجه حرارت‌های مختلف جهت تنظیم دوره زمانی و ایجاد شرایط اُپتیموم برای PCR

ردیف	مرحله	درجه حرارت	زمان (دقیقه)
۱	Primery denaturation	۹۴ درجه سانتی‌گراد	۶
۲	denaturation	۹۴ درجه سانتی‌گراد	۱
۳	Annealing	۷۲ درجه سانتی‌گراد	۱
۴	Primery Extention	۷۲ درجه سانتی‌گراد	۱
۵	Final Extention	۷۲ درجه سانتی‌گراد	۷

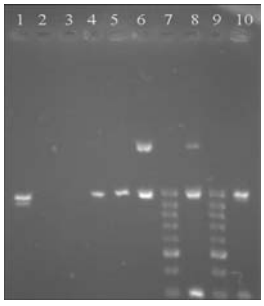
جدول ۴- ایجاد شرایط مطلوب (اپتیمایز شده) جهت دستیابی به بهترین نتیجه واکنش PCR

غلظت و ترکیب واکنشگرها		
ماده مورد استفاده	مقدار	غلظت نهایی
Primer U8	۰/۸ میکرولیتر	۰/۸ پیکومول بر میکرولیتر
Primer U3	۰/۸ میکرولیتر	۰/۸ پیکومول بر میکرولیتر
Tag Polymerase (5u/ul)	۰/۷ میکرولیتر	۳۰۵ واحد در میکرولیتر
PCR baffer 10X	۱/۶ میکرولیتر	۰/۰۸
dNTP 10mM	۰/۷ میکرولیتر	۰/۳۵ میلی مول
Bacterial Genume	۰/۸ میکرولیتر	--
D.W	۱۳/۸ میکرولیتر	--
MgCL 50mM	۰/۸ میکرولیتر	۰/۲ میلی مول
Primer U8	حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر	۰/۸ پیکومول بر میکرولیتر

[Downloaded from hakim.tums.ac.ir on 2026-01-26]



شکل۱- الکتروفورز محصول واکنش PCR از ژنوم باکتری‌ها؛ قسمت الف) خطهای ۱۰ و ۲۰ استاندارد وزن مولکولی است. خطوط ۱تا ۹ و ۱۱ تا ۱۹ ژنوم استخراج شده باکتری‌های ارایه شده در جدول ۱ را نشان می‌دهد. چنانچه نشان داده شده است در همه موارد استفاده از پرایمرهای U8 و U3 منجر به تکثیر یک قطعه از ژن رمزکننده 16S rRNA مشترک در همه باکتری‌ها می‌گردد. در قسمت ب) تکثیر ژنوم باکتری‌های شایع در منتژیت را نشان می‌دهد. در این شکل خط ۱ استاندارد راهنما و خطوط ۲ تا ٦ ژنوم باکتری‌های شایع در منتژیت می‌باشد. خطوط ۷ و ۸ کنترل منفی آزمایش است. در کنترل منفی همه اجزای آزمایش PCR بجز ژنوم باکتری وجود داشت. در قسمت ج) خطوط ۱ الی ٦ PCR تعدادی از باکتری‌های شایع عامل منتژیت را نشان می‌دهد. خطوط ۸ و ۹ کنترل منفی هستند.



شکل۲- الکتروفورز محصول PCR ژنوم باکتری‌های شایع منتژیت را نشان می‌دهد. خطوط ۷ و ۹ استاندارد راهنما با وزن مولکولی ۱۰۰(یعنی بالاترین باند ۱۰۰۰ و پایین‌ترین باند ۱۰۰ جفت باز دارد) است. خطوط ۲ و ۳ کنترل منفی هستند و خطوط ۱، ٤، ٥، ٦، ۸، و ۱۰ ژنوم باکتری‌ها به ترتیب می‌باشد. چنانچه ملاحظه می‌شود همه باکتری‌ها باند ۱۰۰۰ bp را نشان می‌دهند. ژنوم برخی از باکتری‌ها ممکن است به دلیل ناکافی بودن دمای اولیه دناتوراسیون به خوبی باز نشده و باند بیش از ۱۰۰۰ جفت باز ایجاد نماید است. به خطهای ٦ و ۸ نگاه کنید.

پس از ایجاد شرایط مطلوب برای انجام واکنش PCR و ردیابی ژنوم باکتری‌های مختلف، محصول واکنش بر ژل آگارز ۱٪ منتقل و با ۸۰ ولت به مدت ۴۰ دقیقه الکتروفورز شد. سپس ژل با محلول ایتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی (به مدت ۱۰ دقیقه) و در دستگاه ژل‌داکت، تحت تابش نور ماورای بنفش عکس‌برداری انجام گردید (شکل‌های ۱ و ۲). پس از رنگ‌آمیزی و مشاهده صفحات ژل باندهایی یکنواخت و با وزن مولکولی یکسان (حدود ۱۰۰۰ bp) حاصل گردید که نشان‌دهنده تکثیر بخش مورد نظر از ژن 16SrRNA می‌باشد. همه سویه‌های مورد استفاده این باند را ایجاد نمودند. در حالی که در نمونه‌های کنترل منفی هیچ باندی مشاهده نشد.

بحث و نتیجه‌گیری

امروزه تشخیص سریع و درمان به موقع منتژیت یکی از اورژانس‌های مهم پزشکی است که می‌تواند از بروز عوارض و پیامدهای ناگوار این بیماری پیشگیری نماید. نشان داده شده است که روش‌های تشخیص مبتنی بر اسیدهای نوکلئیک از ویژگی‌های سرعت عمل و حساسیت بالا برخوردار بوده و می‌توان با کمک این روش‌ها، مستقیماً عامل عفونی را در نمونه‌های بالینی تشخیص داد. افزون براین، تشخیص منتژیت باکتریال از منتژیت ویرال اهمیت بسزایی در طراحی پروتکل‌های درمانی دارد.

از این رو، در سال‌های اخیر به منظور دست‌یابی به روش‌های مؤثر تشخیص عفونت‌های میکروبی تحقیقات گسترده‌ای انجام شده است. و روش‌های مختلف تشخیصی مبتنی بر PCR طراحی و حتی به کیت تبدیل شده‌اند. افزون بر این، در برخی از کشورها کاربرد روش پیشرفته Real-time PCR در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی مورد ارزیابی و تأیید قرار گرفته است (۴ و ۱۱). با این حال، روش‌های ساده PCR یا آنقدر اختصاصی هستند که تنها به دنبال یافتن یک ارگانیسم خاص می‌باشند و در نتیجه قابلیت کاربرد در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی را ندارند و یا آنقدر پیچیده و تخصصی هستند که استفاده از آنها مقرون به صرفه نیست. همچنین، امکان تکمیل ظرفیت برای آنها وجود ندارد. با این حال نشان داده شده است که استفاده از این تکنولوژی اجتناب‌ناپذیر است. بنابراین، به نظر می‌رسد، طراحی روش‌های مبتنی بر نیازها و امکانات موجود بتواند بخشی از مشکلات تشخیص و درمان را بدون تحمیل هزینه‌های اضافی حل نماید و باعث ارتقای سطح بهداشت و سلامت شود. لذا، اساس برخی از روش‌های مولکولی بر استفاده از پرایمرهای فراگیر استوار شده است.

[Downloaded from hakim.tums.ac.ir on 2026-01-26]

از آنجا که در باکتری‌ها برخی از مناطق رمزکننده ژن 16SrRNA و نیز ژن 23SrRNA محافظت شده و در بسیاری از باکتری‌ها تشابه فراوان بین ترادف آنها وجود دارد، به عنوان ابزار مناسب برای ردیابی باکتری‌ها در نمونه‌های بالینی به ویژه در نمونه‌های CSF معرفی شده‌اند. لذا، چنانچه در این تحقیق و نیز تحقیقات مشابه دیگر نشان داده شده است؛ با استفاده از پرایمر ساخته شده از این ژن می‌توان برای نشان دادن وجود باکتری در نمونه‌ها سود جست. احتمالاً، از آنجا که در موارد بسیاری سرعت تشخیص و تعیین باکتریایی بودن عفونت برای بیمار و پزشک از اهمیت حیاتی برخوردار می‌باشد (۱۲). و علاوه بر آن تعیین نام ارگانیسم و گونه آن در ابتدای امر کمکی به پزشک نمی‌نماید، لذا استفاده از این گونه پرایمرها که قادرند طیف وسیعی از باکتری‌ها را در نمونه‌های بیمار نشان دهند و بین باکتریایی بودن یا غیرباکتریایی بودن عفونت افتراق ایجاد نمایند، بیشتر به پزشک و بیمار کمک می‌نماید. هر چند همیشه خطر آلودگی و نتیجه مثبت یا حتی منفی کاذب وجود دارد ولی در این تحقیق، چنانچه در قسمت ب و ج شکل ۱ و نیز شکل ۲ نشان داده شده است؛ حتی کار همزمان با ۲۰ باکتری فاقد نتیجه مثبت یا منفی کاذب بوده است. در هر حال، می‌توان با ایجاد تمهیداتی از بروز پاسخ‌های ناخواسته پیشگیری نمود. چنانچه، پایداری DNA در نمونه‌های مختلف و نگهداری آن را در $۴^{\circ}C$ امکان‌پذیر می‌باشد. همچنین، سه بار انجماد بر DNA موجود در نمونه‌ها بی‌تأثیر است (۱۳). در هر حال، باید توجه داشت نگهداری مناسب و دستکاری هر نمونه‌ای جهت تشخیص باکتری‌ها با PCR یک مرحله اساسی است.

روش کلاسیک استخراج DNA مبتنی بر انحلال ارگانیسم در حلال‌های آلی از قبیل فنل- کلرفرم و رسوب با اتانول است. رسوب حاصل از برخی نمونه‌ها ممکن است به قدری کم باشد که قابل رویت نباشد. بنابراین، دستکاری رسوب مستلزم اعتماد به وجود ژنوم ارگانیسم به ویژه در جریان شستشو می‌باشد. بنابراین به نظر می‌رسد، نتیجه به دست 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 (universal) انجام شود. و نواحی حفاظت شده‌ای را تکثیر نمایند که در انواع باکتری‌ها یافت می‌گردد. در حقیقت با یک پرایمر فراگیر می‌توان وجود انواع مختلف باکتری را در نمونه رد یابی کرد (۱۴). البته نظر به این که این روش از حساسیت زیادی برخوردار است. می‌تواند حتی باکتری‌های فلور طبیعی از جمله کوکوسی‌های گرم مثبت را نیز تشخیص داد. 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 افتراق منژیت باکتریال از غیرباکتریال امکان‌پذیر است. به علاوه می‌توان با توسعه این روش و استفاده از پرایمرهای اختصاصی به‌طور همزمان آن را به Multiplex PCR تبدیل نموده و حتی وجود مقاومت آنتی‌بیوتیکی را نیز نشان داده و پزشک را در انتخاب درمان مناسب یاری نمود.

References

1- Baron EJ. Implications of new technology for infectious diseases practice. Clin Infect Dis 2006; 43: 1318- 1323.

2- Peters RP, van Agtmael MA, Danner SA, et al. New developments in the diagnosis of bloodstream infections. Lancet Infect Dis 2004; 4: 751- 60.

3- Charles J Dorman. *Genetics of bacterial Virulence*. Blackwell Scientific Publications. 1994: 114- 138.

4- Espy JM, Uhl RJ, Sloan ML, et al. Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. Clinical Microbiology Rrview 2006; 10 (1); 165- 256.

5- Doern GV, Vautour R, Gaudet M, et al. Clinical impact of rapid in vitro susceptibility testing and bacterial identification. J Clin Microbiol 1994; 32:1757- 1762.

6- Fong IW. Emerging relations between infectious diseases and coronary artery disease and atherosclerosis. CMAJ 2000; 163: 49- 56.

7- Balin BJ, Gerard HC, Arking EJ, et al. Identification and localization of Chlamydia pneumoniae in the Alzheimer's brain. Med Microbiol Immunol 1998; 187: 23- 42.

8- Sriram S, Stratton CW, Yao S, et al. Chlamydia pneumoniae infection of the central nervous system in multiple sclerosis. Ann Neurol 1999; 46: 6- 14.

9- Lu JJ, Perng CL, Lee SY, et al. 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: 2076- 2080.

10- Sambrook J. Russell David W: *Molecular cloning* (a laboratory manual). Gold Spring.4 th ed Apendix, 2001: 1, 4, 6, 8, 9, 11.

11- Bankowski MJ, Anderson SM. Real- time nucleic acid amplification in clinical microbiology. Clin Microbiol News 2004; 26: 9- 15.

12- Fuureted K, Arpi M, Erlinq Lindblab B, et al. Broad- range PCR as a supplement to culture for detection of bacterial pathogens in patients with a clinically diagnosed spinal infection. Scand J Infect Dis 2008; 16: 1- 6.

13- 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: 2117- 2119.

14- Radstrom P, Backman A, Qian N, et al. 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: 2738- 2744.

[Downloaded from hakim.tums.ac.ir on 2026-01-26]

[Downloaded from hakim.tums.ac.ir on 2026-01-26]