

Diagnosis of Bacterial Endophthalmitis by Nested- PCR in Comparison with Routine Microbiological Culture

Maleki AR, MD; Naserpoor Farivar T, PhD; Tavallali A, MD

Purpose: To ascertain whether the use of nested-PCR (nested polymerase chain reaction) technique leads to more rapid and accurate diagnosis of bacterial endophthalmitis.

Methods: The aqueous humor and vitreous samples of 24 eyes of 24 patients with bacterial endophthalmitis were evaluated by microscopy, diagnostic aerobic culture, and Nested- PCR to detect the infectious agent.

Results: Aerobic cultures of the aqueous humor and the vitreous were positive in 1 eye (4%) and 6 eyes (25%), respectively. Using Nested-PCR, an infectious agent was detected in the aqueous humor of 14 eyes (58%) and in the vitreous of 17 eyes (70%). Nested-PCR for eubacterial genome showed 100% correlation with bacteriologically positive specimens. Eubacterial genome was detected in 11 of 18 bacteriologically negative cultures of the vitreous.

Conclusions: Nested-PCR on aqueous humor and vitreous samples is a powerful and reliable tool for the diagnosis of bacterial endophthalmitis particularly in smear and culture negative specimens.

Key words: bacterial endophthalmitis, nested polymerase chain reaction (nested-PCR)

- Bina J Ophthalmol 2005; 10 (2): 207-213.

تشخیص آندوفتالمیت‌های باکتریایی به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در مقایسه با کشت هوازی میکروبی‌شناسی

دکتر علیرضا مالکی^۱، دکتر تقی ناصرپور فریور^۲ و دکتر علی تولی^۳

چکیده

هدف: ارزیابی سرعت و دقت واکنش زنجیره‌ای پلیمرز از نوع Nested-PCR در تشخیص آندوفتالمیت باکتریایی در مقایسه با کشت هوازی میکروبی‌شناختی.

روش پژوهش: این مطالعه از نوع آینده‌نگر تحلیلی و مقایسه‌ای بر روی ۲۴ چشم از ۲۴ بیمار مبتلا به آندوفتالمیت بستری در بیمارستان فوق تخصصی چشم‌پزشکی الزهرا انجام شد. زلالیه و زجاجیه بیماران مورد بررسی میکروسکوپی، کشت معمول میکروبی‌شناسی هوازی و Nested-PCR قرار گرفتند و سپس نتایج حاصل با یکدیگر مقایسه شدند.

یافته‌ها: کشت هوازی زجاجیه در ۶ مورد (۲۵ درصد) و کشت زلالیه در یک مورد (۴ درصد) مثبت شد. براساس Nested-PCR، عامل عفونی در زلالیه ۱۴ چشم (۵۸ درصد) و در زجاجیه ۱۷ چشم (۷۰ درصد) مشخص گردید. همه موارد کشت مثبت، در PCR نیز مثبت بودند ولی در ۶۱ درصد نمونه‌های زجاجیه‌ای کشت منفی، عفونت باکتریایی به وسیله PCR شناسایی شد.

نتیجه‌گیری: Nested-PCR؛ زلالیه و زجاجیه برای تشخیص آندوفتالمیت باکتریایی، روش موفقیت‌آمیزی است؛ به ویژه در نمونه‌های کشت منفی. انجام تحقیقات بیش‌تر با مدل‌های دیگر PCR بر روی سایر انواع آندوفتالمیت توصیه می‌گردد.

• مجله چشم‌پزشکی بینا ۱۳۸۳؛ سال ۱۰، شماره ۲: ۲۰۷-۲۱۳.

• پاسخ گو: دکتر علی توللی

bp: base pair
NTP: nucleotide-tri-Phosphate
SDS: sodium dodecylsulfate
TE: Tris-HCL&EDTA

۱- استادیار- چشم پزشکی- فلوشیپ زجاجیه و شبکیه- دانشگاه علوم پزشکی زاهدان

۲- استادیار- PhD میکروبی شناسی- دانشگاه علوم پزشکی زاهدان

۳- فلوشیپ شبکیه و زجاجیه- چشم پزشکی- دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

• تامین بودجه: قطب مرکز تحقیقات چشم پزشکی کشور- بیمارستان چشم پزشکی الزهرا (س)

زاهدان- بیمارستان چشم پزشکی الزهرا (س)

تاریخ دریافت مقاله: ۶ اردیبهشت ۱۳۸۲

تاریخ تایید مقاله: ۲۹ آبان ۱۳۸۲

مقدمه

آندوفتالمیت باکتریایی جدی ترین شکل عفونت چشمی است که بینایی را به خطر می اندازد و ممکن است به دنبال جراحی، ضربه یا کراتیت باکتریایی ایجاد گردد و یا منشا درون زاد داشته باشد^{۱-۳}.

نتیجه کشت یا بررسی میکروسکوپی در نزدیک به ۴۰ درصد از چشم هایی که تشخیص بالینی آندوفتالمیت عفونی داشته اند، مثبت بوده است^۴. شرایطی که به دنبال آندوفتالمیت به وجود می آیند و شدت علائم بالینی، عمدتاً بسته به زمان ظهور علائم، مقدار باکتری تلقیح شده و گونه های آلوده کننده متغیر است^{۵،۶}. اگر مقدار عفونت کم باشد، تشخیص این بیماری عفونی از بیماری صرفاً التهابی چشم (آندوفتالمیت استریل) مشکل می شود^۷.

ارزش کشت نمونه های مایع زجاجیه و زلالیه در تشخیص آندوفتالمیت عفونی، به خوبی ثابت شده است^{۸،۹} اما در اغلب موارد، مواجه شدن با کشت های منفی منجر به یک سردرگمی بالینی در تشخیص آندوفتالمیت استریل از باکتریایی می گردد و چون انتخاب روش درمانی استروئیدی یا آنتی بیوتیکی نیاز به تشخیص استریل یا عفونی بودن التهاب دارد؛ تشخیص عامل سبب شناسی در چنین مواردی بسیار مهم است^{۱۰}.

از دلایل متعدد منفی شدن کشت می توان به کم بودن حجم نمونه، باقی ماندن باکتری ها بر روی سطوح جامد (مثل لنزهای داخل چشمی) که منجر به کم شدن تعداد باکتری ها در نمونه مایع می شود، استفاده از آنتی بیوتیک قبل از نمونه گیری و مشکل پسند بودن بعضی از عوامل عفونت داخل چشمی اشاره کرد^{۱۱-۱۵}. بنابراین استفاده از روش های مولکولی به منظور

پیش برد میزان تشخیص و کاهش زمان تشخیص، مورد توجه قرار گرفته است.

پیشرفت حاصل در تکثیر DNA توسط PCR، تاثیر زیادی بر روی سرعت و صحت آزمایش شناسایی یک گونه یا سویه باکتری داشته است. اکنون به جای تکیه بر قسمت های وقت گیر شناسایی فنوتیپی، امکان تکثیر نواحی خاصی از ژنوم باکتری توسط PCR و مقایسه آن ها در سطوح توالی بازهای این ژن ها به وجود آمده است^{۱۶،۱۷}. این روش، مزیت عدم وابستگی به زنده بودن جرم را نیز به همراه دارد و منجر به طبقه بندی مجدد بعضی از جرم ها شده است^{۱۸}.

PCR علاوه بر تکرار پذیری، حساس نیز می باشد و تنها به تعداد کمی ارگانیزم برای انجام فرآیند تحلیلی نیاز دارد. این حساسیت، اساس تعدادی از آزمایش های تشخیصی شده است که از جمله این موارد می توان به آشکار سازی عوامل بیماری زا^{۱۸-۲۰} و تعیین سازوکار مقاومت به داروهای خاص^{۲۱،۲۲} اشاره کرد. حساسیت گزارش شده در روش PCR متفاوت است اما آشکار سازی یک جرم یا DNA معادل یک ارگانیزم نیز توسط PCR گزارش شده است^۷. در حال حاضر، PCR حساس ترین روش تشخیصی در میکروبی شناسی است^{۲۲}، دارای بیش ترین بهترین گسترش است و فراوان ترین روش مورد استفاده، آمپلیفیکاسیون اسید نوکلئیک می باشد. حساسیت و ویژگی قابل توجه PCR سبب می شود که عدم رعایت موازین دقیق کار با روش های بیولوژی مولکولی، نتایج مثبت کاذب به همراه داشته باشد. اساس روش PCR، بر پایه چرخه های تکرار شده ای از توالی های اسید نوکلئیک انتخاب شده و افزایش یافته استوار است^{۲۳،۲۴}. روش Nested-PCR، عمدتاً برای افزایش حساسیت طراحی شده است (مشخص کردن مقادیر کوچک هدف)؛ به

ارتشاح زجاجیه تمام بیماران با اکوگرافی نمایان شد. نمونه‌گیری از زلالیه و زجاجیه چشم بیماران در اتاق عمل، تحت شرایط استریل و با حضور متخصص بی‌هوشی به صورت آماده به اقدام، انجام شد. نمونه‌گیری زلالیه تحت بی‌حسی موضعی با سوزن ۲۷ گاژ (قطر ۰/۳۳ میلی‌متر) انجام گردید و مقدار ۲۰۰-۱۰۰ میکرولیتر زلالیه از ناحیه لیمبوس کشیده شد.

نمونه‌گیری زجاجیه به صورت پارس پلانا انجام شد؛ بدین صورت که با سوزن ۲۳ گاژ در چشم‌های سودوفاک یا آفاک از ۳ میلی‌متری و در چشم‌های فاکیک از ۴ میلی‌متری خلف لیمبوس در ناحیه اینفروتمپورال، از طریق پارس پلانا وارد زجاجیه می‌شدیم و ۴۰۰-۳۰۰ میکرولیتر از مایع زجاجیه را می‌کشیدیم.

نمونه‌های گرفته‌شده از زلالیه و زجاجیه، بلافاصله در لوله‌های استریل جداگانه ریخته می‌شدند و در لوله‌ها به طور محکم بسته می‌شد و با برچسب مخصوص، نام بیمار و نوع نمونه مشخص می‌گردید و بلافاصله به آزمایشگاه بیمارستان انتقال می‌یافت.

روش کار آزمایشگاه

الف) روش کشت: محلول ارسال شده، سانتریفوژ می‌شد و کمی از ته‌نشین، برای اسمیر و کشت و بقیه به قسمت استخراج DNA منتقل می‌گردید. اسمیر و لام به روش گرم رنگ‌آمیزی می‌شد. برای کشت، از محیط‌های متداول هوازی مانند آگار خونی و شکلاتی استفاده شد و پس از رشد باکتری، به وسیله آزمایش‌های بیوشیمیایی مناسب، باکتری شناسایی می‌گردید.

ب) استخراج DNA: به ۵۰ میکرولیتر از نمونه‌های زجاجیه و زلالیه ارسال شده، ۱۵۰ میکرولیتر از بافر TE (بافر TE شامل ۱ mM EDTA، pH=۸ و ۱۰ mM TRIS-HCL می‌باشد) حاوی پروتییناز K (۲۰ mg/ml) و ۰/۵ درصد SDS افزودیم و به مدت یک ساعت در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد قرار دادیم. سپس هم‌حجم آن از مخلوط فنل، کلروفرم و ایزوآمیل به آن اضافه کردیم و به مدت ۵ دقیقه در ۱۵۶۰۰ g سانتریفوژ نمودیم. فاز آبی را به لوله جدید منتقل کردیم و به آن استات سدیم و اتانول مطلق افزودیم. بدین ترتیب، DNA موجود در نمونه را رسوب دادیم و رسوب حاصل را به مدت ۳۰ دقیقه در دمای

ویژه در زمانی که درجه بالایی از حساسیت مورد نظر است (برای مثال در مورد عفونت چشم). در این روش، از دو گروه پرایمر برای آمپلیفیکاسیون استفاده می‌گردد؛ این دو گروه به ترتیبی طراحی می‌شوند که پرایمر دور دوم PCR، مکمل جزیی از محصولات تکثیری دور اول PCR باشد. در مواردی که از پرایمرهای پان‌باکتریال برای PCR استفاده می‌شود، امکان تشخیص نوع باکتری به دلیل تشابه ژنتیکی مورد استفاده در طراحی پرایمرها وجود ندارد؛ لذا در صورتی که هدف تشخیص نوع باکتری باشد، نیاز به استفاده از روش‌های چندگانه (مولتی پلکس) می‌باشد^{۲۵،۲۶}. پرایمر، اولیگونوکلوئیدی است که به صورت شیمیایی ساخته شده است.

در مطالعه هم‌گروهی Lohmann و همکاران^{۲۲}، نتایج مثبت PCR با نتایج مثبت میکروسکوپی، کشت تشخیصی، یا هر دو مطابقت داشت. هیچ کشت مثبتی، نتیجه منفی PCR ندارد. یافته‌های PCR به ویژه در موارد آندوفتالمیت دیررس، کمک‌کننده‌اند. در مطالعه Therese و همکاران^۱، حساسیت مشخص کردن عامل باکتریایی با PCR به ۶۳/۸ درصد افزایش یافته است.

این تحقیق با هدف تشخیص آندوفتالمیت‌های باکتریایی به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز از نوع Nested-PCR و مقایسه آن با نتایج کشت معمول میکروبی‌شناسی و ارزیابی کارایی آن در موارد نمونه‌های کشت منفی انجام شده است.

روش پژوهش

این پژوهش به روش آینده‌نگر تحلیلی و مقایسه‌ای بر روی ۲۴ چشم از ۲۴ بیمار مبتلا به آندوفتالمیت که طی یک سال از مهر ماه سال ۱۳۸۰ لغایت پایان شهریورماه سال ۱۳۸۱ در بیمارستان فوق تخصصی چشم‌پزشکی الزهرا (س) زاهدان بستری شدند، انجام گردید.

تشخیص آندوفتالمیت باکتریایی براساس تاریخچه، معاینه و یافته‌های بالینی بود که شامل موارد زیر می‌باشند: کاهش دید، درد اطراف چشم، هایپرمی منتشر ملتحمه بولبی، کیموز، التهاب شدید و واکنش‌های فیبرینوپورولانت در اتاق قدامی، خلفی و زجاجیه.

این پرایمرها، پرایمرهای یوباکتریال یونیورسال^{۵،۱۰} می‌باشند که ویژگی گسترده‌ای برای تمام باکتری‌های گرم‌مثبت و گرم‌منفی دارند^{۶،۱۰}.

محصول PCR، الکتروفورز ژلی می‌شود و در آن به دنبال قطعات تکثیری ۴۷۰ bp می‌گردیم. از ژل‌های حاصل عکس گرفته شد (شکل ۱) و نتایج تشخیصی این مرحله با نتایج حاصل از کشت باکتری مقایسه گردید و میزان حساسیت PCR در مقایسه با کشت مشخص شد.

جهت جلوگیری از احتمال آلودگی و مشخص شدن آلودگی احتمالی در هر بار تکثیر، از دو کنترل منفی (یکی کنترل مواد و دیگری کنترل استخراج نمونه در دور اول) استفاده نمودیم. کنترل استخراج نمونه شامل استفاده از آب مقطر و بیولوژی مولکولی با همان روند استخراج نمونه بوده است و کنترل‌های دور دوم شامل کنترل مواد (تنها مواد مورد استفاده برای واکنش PCR) و یک نمونه کنترل استخراج نمونه (که یک میکرولیتر از محصولات تکثیری کنترل استخراج نمونه دور اول بود) مورد استفاده قرار گرفت. تنها زمانی که هم کنترل استخراج نمونه و هم کنترل مواد منفی بودند، نمونه وارد بررسی گردید و در غیر این صورت، نمونه از مطالعه حذف شد.

۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار دادیم. سپس این محصول را با اتانول ۷۰ درصد شستشو و خشک نمودیم. رسوب خشک‌شده را دوباره در ۲۰ میکرولیتر از تریس حل کردیم و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار دادیم.

(ج) انجام PCR: کل محلول PCR، ۵۰ میکرولیتر است که شامل مجموعه‌ای از یک واحد Supertaq polymerase (شرکت SuperTaq، انگلستان)، ۵ میکرولیتر از بافر حاوی کلریدپتاسیم ۵۰۰ میلی‌مول، تریس ۱۰۰ میلی‌مول، کلرید منیزیم ۱۵ میلی‌مول و ۰/۳۶ میلی‌مول از هر یک از پرایمرهای زیر (ساخت DNA Technology A/S، دانمارک) همراه با ۲۰۰ میکرومول از هر یک از dNTP-ها و ۵ میکرولیتر از DNA الگو می‌باشد. پرایمرها عبارتند از:

در دور اول PCR (U_۱ و rU_۱):

U_۱: ۵' TTGAGATTTGATCCTGGCTC ۳'

rU_۱: ۵' GGACTACCAGGGTATCTAA ۳'

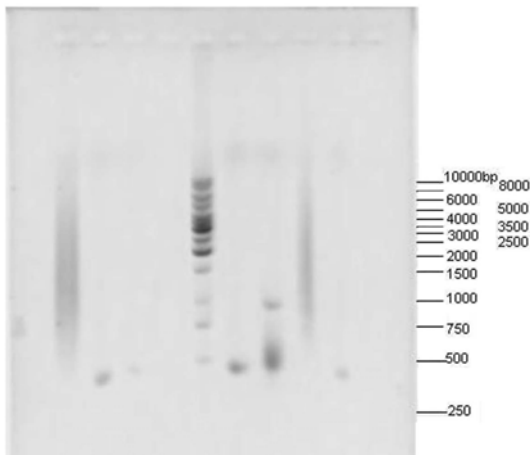
در دور دوم PCR (U_۲ و rU_۲):

U_۲: ۵' GGCGTGCTTAACACATGCAAGTCG ۳'

rU_۲: ۵' GCGGCTGGCACGTAGTTAG ۳'

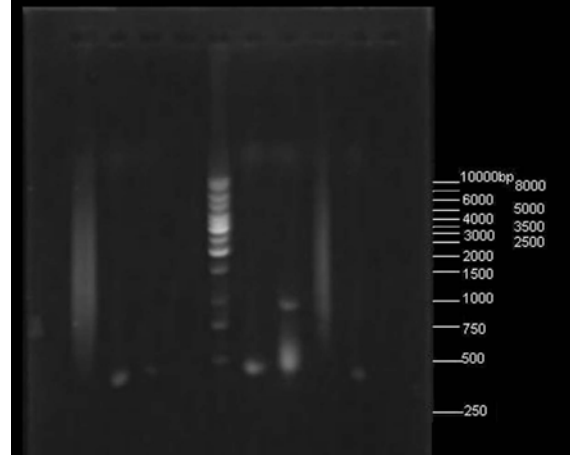
N.P = Negative Patient Sample
P.P = Positive Patient Sample
N.C = Negative Control
P.C = Positive Control
Lad = 1 Kbp DNA Ladder (Fermentas)

lane1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
N.P P.P P.P N.C Lad P.C P.P N.P P.P N.P



N.P = Negative Patient Sample
P.P = Positive Patient Sample
N.C = Negative Control
P.C = Positive Control
Lad = 1 Kbp DNA Ladder (Fermentas)

lane1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
N.P P.P P.P N.C Lad P.C P.P N.P P.P N.P

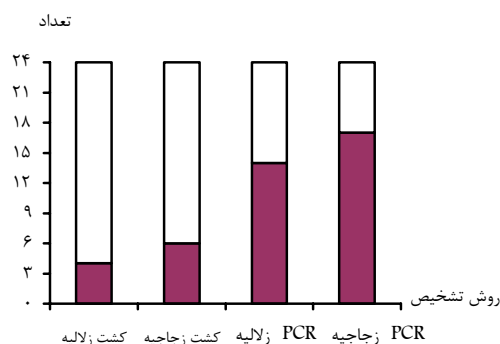


شکل ۱- نتایج Nested-PCR

ستون‌های ۱، ۸ و ۱۰: نمونه‌های منفی بیماران؛ ستون‌های ۲، ۳، ۷ و ۹: نمونه‌های مثبت بیماران؛ ستون ۴: نمونه کنترل منفی؛ ستون ۵: lad و ستون ۶: نمونه کنترل مثبت.

یافته‌ها

تعداد ۲۴ چشم مبتلا به آندوفتالمیت از ۲۴ بیمار تحت بررسی قرار گرفت. همه بیماران مورد بررسی از نظر بالینی به آندوفتالمیت باکتریایی آگزوزن مبتلا بودند و نوع دیگری از آندوفتالمیت قارچی، انگلی، هلمینتی یا ویروسی وجود نداشت. پرایمرهای یونیورسال U₁ و rU₄ (در دور اول) و U₂ و rU₂ (در دور دوم) به طور موفقیت‌آمیزی DNA حاصل از تمام سویه‌های باکتریایی مورد آزمایش را افزایش دادند تا به محصول bp ۷۶۶ پس از دور اول و ۴۷۰ bp پس از دور دوم رسید. کشت میکروب‌شناسی در یک مورد نمونه زلالیه (۴ درصد) و در ۶ مورد نمونه زجاجیه (۲۵ درصد) مثبت شد. PCR در ۱۴ مورد از نمونه زلالیه (۵۸ درصد) و ۱۷ مورد از نمونه زجاجیه (۷۰ درصد) مثبت گردید (نمودار ۱)؛ یعنی در ۱۳ مورد از ۲۳ نمونه کشت‌منفی زلالیه (۵۶ درصد) و ۱۱ مورد از ۱۸ نمونه کشت‌منفی زجاجیه (۶۱ درصد)، براساس PCR نمونه‌های مربوط، آندوفتالمیت باکتریایی وجود داشت.



نمودار ۱- توزیع فراوانی ۲۴ چشم براساس نتایج تشخیص آندوفتالمیت باکتریایی به تفکیک روش‌های تشخیصی

بحث

ویژگی‌های بالینی آندوفتالمیت حاد در زمان تظاهر، قدرت کافی برای پیش‌گویی گونه میکروبی و راهنمایی در تزریق داخل زجاجیه‌ای آنتی‌بیوتیک مناسب و انتخابی را ندارند.^{۲۷} پیشرفت در درمان دارویی و جراحی باعث بهبود پیش‌آگهی

آندوفتالمیت عفونی شده است اما یک تشخیص سریع و دقیق برای رسیدن به نتیجه‌ای عملی و خوب، هنوز از اهمیت حیاتی برخوردار است. به طور آرمانی، عامل عفونی باید قبل از تجویز آنتی‌بیوتیک مشخص شود. برخلاف کشت میکروب‌شناختی، PCR می‌تواند عامل عفونی را در عرض ۶-۴ ساعت مشخص نماید.^{۲۲}

تشخیص دقیق آندوفتالمیت، نیازمند توجه کافی به علایم بالینی و آزمایش‌های میکروب‌شناسی است که به طور مناسب انتخاب شده‌اند. در حال حاضر بهترین آزمایش استاندارد برای مشخص کردن جرم عفونی، کشت میکروب‌شناختی است زیرا به طور مستقیم، عوامل عفونی در حال رشد را مشخص می‌کند. در تشخیص آندوفتالمیت عفونی، نمونه‌های زجاجیه اغلب بیش‌تر از نمونه‌های زلالیه، نتایج مثبت از خود نشان می‌دهند.^{۲۸} تحقیقات نشان می‌دهند که تقریباً ۵۴ درصد (۸۴-۲۷ درصد) از چشم‌های مبتلا به آندوفتالمیت عفونی، دارای کشت زجاجیه مثبت هستند. این میزان برای کشت زلالیه، به ۳۷ درصد کاهش می‌یابد.^{۱۰،۲۹}

اما در مطالعه ما، عامل عفونی در نمونه‌های زجاجیه به وسیله کشت میکروب‌شناسی، در ۲۵ درصد موارد مشخص شد. علت اختلاف با تحقیقات دیگر این است که در این مطالعه فقط از کشت هوازی استفاده شد و علت احتمالی دیگر، درمان با آنتی‌بیوتیک قبل از مراجعه بیماران به مرکز ما بوده است.

در مطالعه ما، اکثر بیماران (۷۵ درصد) با بررسی‌های میکروب‌شناسی معمول برای مشخص کردن باکتری در زجاجیه، منفی بوده‌اند اما PCR توانست در ۱۷ مورد (۷۰ درصد) از کل بیماران، ژنوم باکتری را مشخص نماید و نقش مهم باکتری را به عنوان علت شایع آندوفتالمیت مشخص سازد که با دیگر مطالعات هم‌خوانی دارد.^{۱۰}

التهاب‌های غیرعفونی پس از عمل، به علل متفاوت زیادی مانند شکل و طرح لنزها، دست‌کاری‌های جراحی، باقی‌ماندن قشر عدسی، سندرم عدسی سمی و یوویت فیکوژنیک نسبت داده شده‌اند.^{۳۰}

در موارد آندوفتالمیت پس از ضربه، غالباً تمایز التهاب ناشی از مصدومیت، از التهاب عفونی مشکل است و مشخص کردن سبب‌شناسی در این موارد، بسیار سرنوشت‌ساز خواهد بود. مشخص کردن آندوفتالمیت عفونی یا استریل، نوع درمان را

مطالعات بیش‌تری برای مشخص کردن گونه خاص باکتری در نمونه حاوی ژنوم باکتری لازم است. با آن‌که PCR یک آزمایش مستقیم برای اثبات وجود و حضور عامل عفونی است ولی به طور مستقیم نمی‌تواند بیماری‌زایی و توانایی عامل عفونی را در تکثیر و ازدیاد فعال، مشخص سازد. اما در آینده، پیش‌رفت در PCR ممکن است بتواند جهش در ژنوم بیماری‌زا را نشان دهد (که کاربرد آن، در جداسازی گونه‌های مقاوم به درمان آنتی‌بیوتیکی می‌باشد) و یا بتواند mRNA خاصی را نشان دهد که با آن، عفونت فعال، عفونت نهفته و یا عفونت قبلی مشخص و متمایز گردد.

نتیجه‌گیری و پیشنهادها

مطالعه ما به طور واضح نشان داد که Nested-PCR نمونه‌های درون چشمی و به ویژه زلالیه به عنوان آزمایش تشخیصی، دارای ارزش زیادی است و می‌تواند به عنوان جایگزینی برای کشت در نمونه‌هایی که با روش‌های معمول میکروبی‌شناسی منفی گزارش شده‌اند یا در شرایطی که هنوز تشخیص بالینی مورد شک است، مورد استفاده قرار گیرد. انجام مطالعات بیش‌تر با کشت‌های میکروبی‌شناسی کامل‌تر و جامع‌تر و انواع دیگر PCR بر روی سایر انواع آندوفتالمیت، به ویژه آندوفتالمیت دیررس پس از عمل و آندوفتالمیت قارچی توصیه می‌گردد.

تعیین می‌نماید. سبب‌شناسی عفونی، تنها با تعیین کردن عامل عفونی در نمونه داخل چشمی ثابت می‌شود. در مطالعات گذشته^{۱۱،۳۱} نشان داده شده است که در آندوفتالمیت، نتایج کشت مثبت حاصل از زجاجیه رقیق‌نشده بیش‌تر از زلالیه است و حاکی از آن است که در صورت شک بالینی به آندوفتالمیت عفونی، بهتر است نمونه کشت از زجاجیه گرفته شود.^۱ دلیل این تفاوت، توانایی اتاق قدامی در حذف عوامل عفونی است.^{۱۱} در مطالعه ما، PCR مایع زلالیه در ۵۸ درصد موارد و PCR زجاجیه در ۷۰ درصد موارد قادر به مشخص کردن ژنوم باکتری بوده است و اگرچه ۱۲ درصد اختلاف به نفع PCR زجاجیه وجود دارد ولی حساسیت PCR مایع زلالیه نسبت به کشت معمول میکروبی‌شناختی مایع زجاجیه (۲۵ درصد موارد مثبت)، بسیار بیش‌تر است. این یافته‌ها بسیار مهمند، چرا که پاراسنتز اتاق قدامی نسبت به پاراسنتز زجاجیه، روش ساده‌تر و ایمن‌تری است و امکان انجام آن در مطب نیز وجود دارد. بنابراین پاراسنتز اتاق قدامی می‌تواند به عنوان روش انتخابی در تشخیص آندوفتالمیت به کار رود؛ البته به شرطی که روش‌های مولکولی بسیار حساس مانند PCR در دسترس باشند. در بررسی نمونه‌های درون چشمی در مطالعه حاضر، PCR در تمام موارد کشت مثبت، مثبت بود به علاوه با کمک PCR، عفونت باکتریایی در ۶۱ درصد نمونه‌های زجاجیه‌ای که از نظر کشت باکتری‌شناسی منفی بوده‌اند، شناسایی گردید (موارد کشت منفی و PCR-مثبت آندوفتالمیت باکتریایی).

منابع

- 1- Puliafito CA, Baker AS, Haaf J, Foster CS. Infectious endophthalmitis: review of 36 cases. *Ophthalmology* 1982;89:921-929.
- 2- Cowen CL, Maddin WM, Hatem GF. Endogenous bacillus cereus endophthalmitis. *Ann Ophthalmol* 1982;19:65-68.
- 3- Ormerod LD, Paton BG, Haff J. Anaerobic bacterial endophthalmitis. *Ophthalmology* 1982;94:799-808.
- 4- Lohmann CP, Linde HI, Reischl U. Rapid diagnosis of infectious endophthalmitis using polymerase chain reaction (PCR): a supplement to conventional microbiological diagnostic method. *J Klin Monatsbl Augenheilkd* 1997;211:22-27(Abstract).
- 5- Hughes DS, Hill RJ. Infectious endophthalmitis after cataract surgery. *Br J Ophthalmol* 1994;78:227-232.
- 6- Okhravi N, Towler HMA, Hykin P, Matheson MM, Lightman S. Assessment of a standard treatment protocol on visual outcome following presumed bacterial endophthalmitis. *Br J Ophthalmol* 1997;81:719-725.
- 7- Carroll NM, Jaeger EEM, Choudhury S. Detection of and discrimination between gram positive and gram negative bacteria in intraocular samples by using nested-PCR. *J Clin Microbiol*

- 2000;38:1753-1757.
- 8- Forster RK. Endophthalmitis: diagnostic cultures and visual results. *Arch Ophthalmol* 1974;92:387-392.
 - 9- Rowsey JJ, Newson DL, Sexton DJ. Endophthalmitis current approaches. *Ophthalmology* 1982;89:1055-1066.
 - 10- Therese KL, Anand AR, Madhavan HN. Polymerase chain reaction in the diagnosis of bacterial endophthalmitis. *Br J Ophthalmol* 1998;82:1078-1082.
 - 11- Bazra M, Pavan PR, Doft BH. Evaluation of microbiological diagnostic techniques in postoperative endophthalmitis in the endophthalmitis vitrectomy study. *Arch Ophthalmol* 1997;115:1142-1150.
 - 12- Records RE, Iwen PC. Experimental bacterial endophthalmitis following extracapsular lens extraction. *Exp Eye Res* 1989;49:729-737.
 - 13- Rogers NK, Fox PD, Noble BA. Aggressive management of an epidemic of chronic pseudophakic endophthalmitis: results and literature survey. *Br J Ophthalmol* 1994;78:115-119.
 - 14- Kalicharan DWL, Jongebloed LIL, Worst JGF. (An)aerobic bacteria found in the secondary-cataract material. A SEM/TEM Study. *Doc Ophthalmol* 1992;82:125-133.
 - 15- Busin M, Cusumano A, Spitznas M. Intraocular lens removal from eyes with chronic low-grade endophthalmitis. *J Cataract Refract Surg* 1995;21:679-684.
 - 16- Olive DM, Bean P. Principle and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol* 1999;37:1661-1669.
 - 17- Van Belkum A. DNA fingerprinting of medically important microorganisms by use of PCR. *Clin Microbiol Rev* 1994;7:174-184.
 - 18- Kawamura Y, HOU X, Sultana F. Distribution of staphylococcus spp. among human clinical specimens and emended description of staphylococcus caprae. *J Clin Microbiol* 1998;36:2038-2042.
 - 19- Carroll NM, Okhravi N, Adamson P. Elimination of bacterial DNA from taqDNA polymerase using restriction endonuclease digestion. *J Clin Microbiol* 1999;37:3402-3404.
 - 20- Greisen K, Loeffelholz M, Leong D. PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 1994;32:335-351.
 - 21- Visser MR, Fluit AC. Amplification methods for the detection of bacterial resistance genes. *J Microbiol Methods* 1995;23:105-116.
 - 22- Lohmann CP, Heeb M, Linde HJ. Diagnosis of infectious endophthalmitis after cataract surgery by polymerase chain reaction. *J Cataract Refract Surg* 1998;24:821-826.
 - 23- Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase-catalyzed reaction. *Methods Enzymol* 1987;155:335-350.
 - 24- Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am* 1990;262:56-65.
 - 25- Erlich HA, Gelfand D, Sninsky JJ. Recent advances in the polymerase chain reaction [Review]. *Science* 1991;252:1643-1651.
 - 26- Haqqi TM, Sarkar G, David CS, Simmer SS. Specific amplification of a refractory segment of genomic DNA. *Nucleic Acids Res* 1988;16:11844.
 - 27- Johnson MW, Doft BH, Kelsey SF. The Endophthalmitis Vitrectomy Study. Relationship between clinical presentation and microbiologic spectrum. *Ophthalmology* 1997;104:261-272.
 - 28- Peyman GA, Bassili SS. A practical guideline for management of endophthalmitis. *Ophthalmic Surg* 1995;26:294-303.
 - 29- Forster RK, Abbott RL, Gelender H. Management of infectious endophthalmitis. *Ophthalmology* 1980;87: 313-319.
 - 30- Meltzer DW. Sterile hypopyon after intraocular surgery. *Arch Ophthalmol* 1980;98:100-104.
 - 31- Bohigian GM, Olk RJ. Factors associated with a poor visual result in endophthalmitis. *Am J Ophthalmol* 1986;101:332-341.